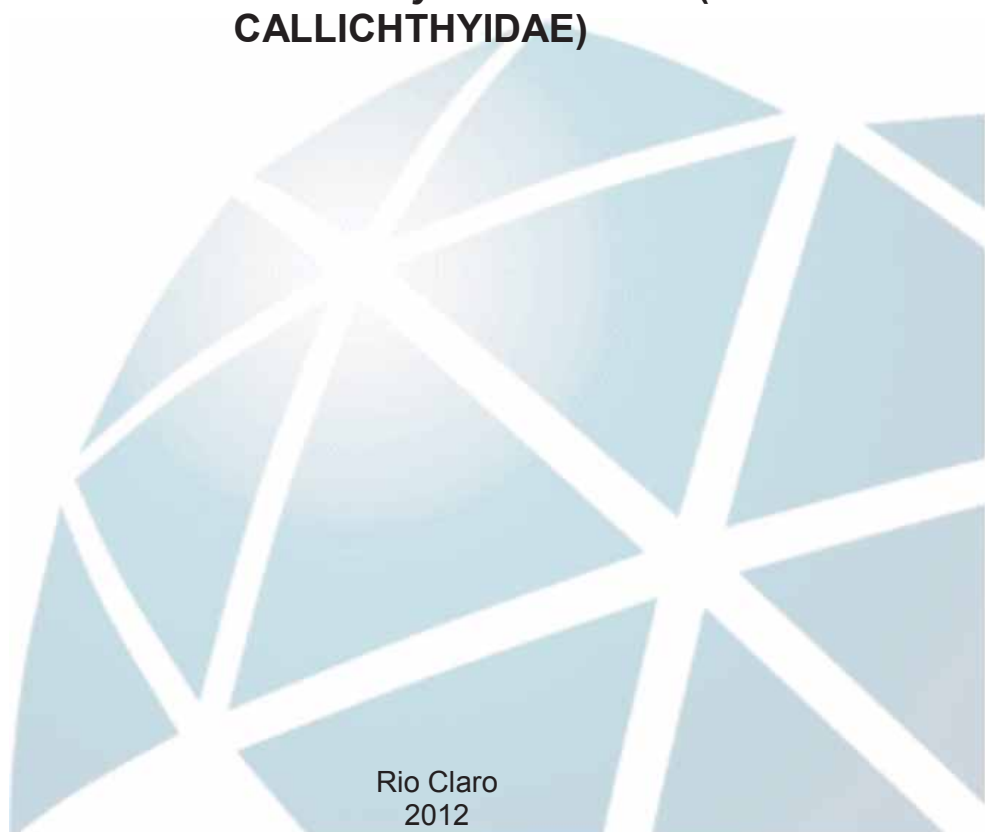

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ANA CAROLINA SALES PACHECO

**VARIAÇÃO INTER-SEXUAL NA FREQUÊNCIA DE
CROMOSSOMOS Bs EM *Corydoras aeneus* (TELEOSTEI:
CALLICHTHYIDAE)**



Rio Claro
2012

ANA CAROLINA SALES PACHECO

VARIAÇÃO INTER-SEXUAL NA FREQUÊNCIA DE CROMOSSOMOS
Bs EM *Corydoras aeneus* (SILURIFORMES: CALLICHTHYIDAE)

Orientadora: Dra. Patrícia Parise Pasquali-Maltempi

Co-orientador: MSc. Edson Lourenço da Silva

Projeto de Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Biociências da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho” - Câmpus de Rio Claro, para obtenção do
grau de Bacharel e Licenciatura em Ciências
Biológicas.

Rio Claro
2012

597 Pacheco, Ana Carolina Sales
P379v Variação inter-sexual na frequência de cromossomos Bs
em *Corydoras aeneus* (TELEOSTEI: CALLICHTHYIDAE) /
Ana Carolina Sales Pacheco. - Rio Claro : [s.n.], 2012
27 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (licenciatura e
bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual
Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientador: Patrícia Parise Pasquali-Maltempi

Co-Orientador: Edson Lourenço da Silva

1. Peixe. 2. Citogenética. 3. Cromossomo supranumerário.
4. Instabilidade mitótica. 5. Nor e Banda C. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

**“Dedico meu trabalho aos meus pais
Rosana Machado e Hélio Sales Pacheco, Pai
e Mãe muito obrigada, estaremos sempre
juntos, amor eterno”.**

Agradecimentos:

Gostaria primeiramente de agradecer a mãe natureza que abençoou o nosso planeta com tantas belezas e tanta diversidade.

As minhas famílias caiçara e a caipira (Baixada santista, São José do rio pardo e Bananal) que tiveram papel imprescindível no meu trabalho, me apoiando sempre e me mostrando formas melhores de se viver a vida.

As minhas mães, Rosana, Vó Onda e Vó Tete que sempre se fizeram presentes me guiando e me mostrando que caminhos eu poderia seguir.

Aos meu pais, Hélio, Vô Pacheco e Vô Cide, por me ensinarem o quanto é importante aproveitar todos os momentos da vida pois estes momentos são únicos.

A equipe de trabalho, mas mais que isso a equipe de amigos Mão, Play, Jaque, Franco, Mudinho, Dani, Chico e outros que passaram pelo laboratório e fizeram parte deste trabalho.

A Patrícia Parise Pasquali-Maltempi, minha orientadora e amiga. Pati muito obrigada pelo apoio sempre.

Ao meu co-orientador e amigo Edson Lourenço, pela orientação no trabalho, pela dedicação, responsabilidade, competência, paciência, apoio, amizade e aprendizado.

Ao Guilherme Gomes pela ajuda SIGNIFICATIVA nos cálculos e pela amizade e apoio.

Ao pessoal da zoologia, Gil, Alberto, Ganso, Cris, Professor Franscisco Braga, Dani, Spok, Mari, pela amizade, por me ajudarem a entender um pouco sobre morfologia interna de peixes e entender a importância do diálogo entre os departamentos.

A todos os funcionários do departamento e da universidade a minha gratidão pela amizade e por fazer este sistema funcionar.

Ao meu orientador Anderson Luis Alves por ter me ensinado algo que com certeza levarei para o resto de minha vida, a importância da amizade, honestidade e respeito dentro da pesquisa.

A Simone Gruber pelo apoio, amizade e pela confiança, Si muito obrigada por tudo.

A três mulheres fortes, os pilares que me ajudaram sempre Professora Carmen (Carmão), Tamaris e Matraca pela orientação, força e objetivação.

Ao Rafael Splendore, pela parceria, amizade, companherismo e pela mão abençoada na citogenética.

Ao projeto de extensão PEJA (Projeto de Educação de Jovens e alunos) todos meus alunos e companheiros, muito obrigada pelas experiências significativas e por todo o aprendizado.

Ao projeto de extensão Danças e Ritmos Brasileiros, a todas as flores e amores o meu muito obrigada por fazerem dos meus dias mais coloridos e por fazerem as flores mais perfumadas.

Ao projeto de extensão Coral uirapuru, muito obrigada por me ensinarem algo que não é só um ditado e sim uma realidade, “quem canta seus males espanta” e quem canta afinado então...

Ao pessoal da biblioteca, por tudo sempre pela atenção, educação disponibilidade, ajuda dicas e principalmente pela amizade.

Aos professores Sanae, Carmen, Dora e Marieli por sempre ensinarem, a genética, as técnicas, a dinâmica do laboratório e mais que isso me ensinar a viver e conviver.

Agradeço também as amigas Daniela Ferraz (Dani bio), Tainá da Rosa Vilela (ricota), Ana Cláudia Marcato (Matraca), Marília Merli Borges (Pedrita), Tatiane (Larva) pela amizade, pela compreensão e mais que tudo pelo apoio.

Agradeço a minha família Maria Cuervo, por tudo, pelo apoio, pela amizade, pelas brincadeiras e principalmente por me ajudarem a entender que família é para a vida toda, Dani, Forga, Pri, Ste, Pati, Palmitão, Sandy, Júlia e todos que passaram por essa casa.

Agradeço a todas as repúblicas e casas estudantis da Unesp Rio Claro dentre elas : Metazoa, rep 51, Várzea, Catota, Santapiriquita, Moradia Estudantil, rep Bananas, Cabeças, Maria Cuervo...Por me proporcionarem reflexões representativas sem deixar de lado a sociabilização.

À sala de Ciências biológicas 2007 integral, pela coletividade, pelas piadas, pelas listas de exercícios copiados e principalmente pela amizade.

Ao Marcelo Petratti Pansonato, pelo companheirismo, pela dedicação e pelo apoio principalmente nos momentos mais difíceis.

RESUMO

O gênero *Corydoras*, o maior entre os Siluriformes, é pertencente a família Callichthyidae, constituído de 177 espécies validas e amplamente distribuído na porção *cis-andina* da América do Sul. Como característica marcante possui duas séries longitudinais de placas dérmicas revestindo quase todo o corpo. Estudos citogenéticos em Callichthyidae mostram muitos rearranjos cromossômicos, incluindo eventos de poliploidia na sua história evolutiva, particularmente no gênero *Corydoras*, no qual a variação do número diplóide é de $2n=40$ a $2n=134$ cromossomos. A ausência de informação sobre a frequência de cromossomos Bs no grupo motivou o presente trabalho com a espécie *Corydoras aeneus*. Uma população proveniente da bacia do rio Tietê no Ribeirão Claro (sub-bacia do rio Corumbataí - Rio Claro, SP) foi amostrada totalizando 20 indivíduos (10 Machos e 10 Fêmeas) e 30 metáfases por indivíduo foram analisadas citogeneticamente. Foram realizadas as técnicas de impregnação pela prata (Ag-NOR). O número diplóide modal observado foi de $2n=60$ ($26m+26sm+8st$), com a ocorrência variável de 1 ou 2 cromossomos Bs em machos e 1 cromossomo B nas fêmeas, ambos acrocêntricos. Em relação à variação na frequência de cromossomos Bs, a ocorrência de 2 cromossomos B está diretamente ligada ao sexo masculino, pois não foi encontrada nenhuma fêmea amostrada com a ocorrência de 2 cromossomos Bs. A baixa frequência de Bs em fêmeas sugere que este evento possa ser esporádico neste sexo, diferente dos machos no quais este cromossomo supranumerário parece estar fixado mostrando uma frequência maior de 2 Bs do que o próprio número modal de $2n=60$. Novos estudos serão realizados para compreender a dinâmica do cromossomo B na população.

Palavras-chave: Peixe. Citogenética. Cromossomo supranumerário. Instabilidade mitótica. Nor e Banda C.

ABSTRACT

The genus *Corydoras*, the highest among the Siluriformes, Callichthyidae is owned by the family, consisting of 177 valid species and widely distributed in cis-Andean portion of South America. How striking feature has two longitudinal series of dermal plates covering almost the entire body. Cytogenetic studies in Callichthyidae show many chromosomal rearrangements, including events of polyploidy in their evolutionary history, particularly the genus *Corydoras*, in which the variation is the diploid number of $2n = 40$ to $2n = 134$ chromosomes. The absence of information on the frequency of chromosomes in the group Bs motivated this work with the species *Corydoras aeneus*. A population from the Tietê River basin in Ribeirão Claro (sub-basin Corumbataí - Rio Claro, SP) was sampled a total of 20 subjects (10 males and 10 females) and 30 metaphases per individual were analyzed cytogenetically. Were carried out by impregnation techniques silver (Ag-NOR). The observed modal diploid number was $2n = 60$ ($26m + 26sm + 8st$), with the variable occurrence of 1 or 2 Bs chromosomes in males and a B chromosome in females, both acrocentric. Regarding the variation in the frequency of chromosome Bs, the occurrence of two B chromosomes is directly linked to males, because there were no female sampled with the occurrence of two chromosomes Bs. The low frequency of Bs in females suggests that this event can be sporadic this sex, different from males in which this appears to be set supernumerary chromosome showing a higher frequency of 2 Bs than the actual modal number of $2n = 60$. Further studies will be performed to understand the dynamics of the B chromosome in the population.

Keywords: Fish. Cytogenetics. Supernumerary chromosome. Mitotic instability. Nor Banda and C.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 OBJETIVOS	12
3 MATERIAL	13
4 MÉTODOS.....	15
4.1 Técnicas de coleta.....	15
4.2 Preparações citogenéticas	15
4.3 Coloração Convencional.....	16
4.4 Análises dos dados.....	16
5 RESULTADOS.....	18
6 DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS	22
REFERÊNCIAS.....	26

1 INTRODUÇÃO

Dois terços do nosso planeta são cobertos por água e grande parte destes ambientes fornece suporte para a vida dos peixes, que correspondem à cerca de 50% dos vertebrados (NELSON, 1994). Estudos mostram que são conhecidas no planeta cerca de 24.618 espécies distribuídas em 482 famílias e destas, 40% são de água doce (NELSON, 1994). A fauna neotropical de peixes de água doce é a mais diversificada e rica, porém somente cerca de 24% das espécies foram descritas até hoje (NELSON, 1994; REIS et al. 2003). No Brasil existem cerca de 1800 espécies de água doce e 857 espécies de peixes marinhos (ROSA e MENEZES, 1996).

Os peixes de pequeno porte, geralmente com menos de 15 cm de comprimento, correspondem a cerca de 50% das espécies de peixes de água doce descritas na América do Sul mostrando um elevado grau de endemismo (CASTRO et al. 2003). Estes peixes apresentam uma distribuição geográfica restrita e pouco ou nenhum valor comercial. Estas espécies são dependentes da vegetação ripária para a alimentação, abrigo e reprodução, de modo que as atividades antrópicas como desmatamento, uso de fertilizantes e praguicidas associados a atividades agrícolas intensivas, resultam na redução da diversidade destas espécies, devido a destruição do seu hábitat natural, deixando-as em risco de extinção (CASTRO et al. 2003; CASTRO et al. 2005). Nesse sentido, de acordo com Castro et al. (2005) as pesquisas direcionadas a diversidade na ictiofauna de riachos são extremamente urgentes e necessárias.

A importância de estudos com peixes abrange desde exploração e manejo consciente dos estoques pesqueiros, sem esgotamento destes até o conhecimento detalhado de aspectos da biologia e da genética.

O estado de São Paulo abriga 30% destas espécies sendo aproximadamente 66% marinhas e 34% de água doce (CASTRO e MENEZES, 1998). Devido aos processos geomorfológicos que se iniciaram ao fim do cretáceo e durante o cenozóico hoje temos esta grande diversidade de peixes de água doce (LUNDBERG et al., 1998). Purdom (1993) observou as mais diversas especializações de morfologia, fisiologia, e comportamento, isso se dá pelo fato de que os peixes possuem uma considerável capacidade de adaptação biológica aos diversos tipos de habitat que ocupam.

A Bacia do rio Corumbataí pertencente à bacia do rio Piracicaba (figura 1), está localizada na porção centro-leste do Estado de São Paulo na depressão periférica. Possui grande importância localmente, pois é uma das últimas do estado que apresenta água em bom estado. Consistindo desta forma, para vários municípios da região como uma alternativa de abastecimento, tornando seu manejo e preservação de extrema importância tanto para a região quanto para o estado (GARCIA et al., 2004).

A ordem Siluriformes compreende um grupo de peixes extremamente grande, diverso e amplamente distribuído nas regiões tropicais de todo o mundo (BURQUES, 1989). A ordem é formada por peixes ósseos que somam algo em torno de três quartos de todas as espécies de peixes de água doce, sendo o foco de muitos estudos devido a sua grande diversidade ecológica (FINK e FINK 1981, DE PINNA 1998, BRITTO 2003). Atualmente a ordem é formada por 37 famílias, 416 gêneros e mais de 2500 espécies (DE PINNA 1998, DIOGO 2003). Na região Neotropical são conhecidas atualmente 15 famílias formadas por 1648 espécies (REIS et al. 2003). Estes números tendem a aumentar significativamente devido a evolução dos conhecimentos das relações filogenéticas e filogeográficas entre os grupos.

Os peixes que compõem a ordem geralmente habitam o fundo dos rios e riachos permanecendo escondidos entre as rochas e a vegetação. Possuem formas e tamanhos variados, com hábitos geralmente crepusculares e noturnos (PAXTON e ESCHMEYER 1995). Nestes peixes ocorre a total ausência de escamas sobre o corpo, sendo este revestido por uma pele espessa (couro) ou placas ósseas. Geralmente possuem três pares de barbilhões e frequentemente apresentam um forte e pungente acúleo à frente do primeiro raio das nadadeiras dorsal e peitorais (BURGES 1989). A maioria das espécies habita as regiões Tropicais e Neotropicais, sendo poucas as espécies que alcançam o extremo sul da América do Sul ou o extremo norte da América do Norte (NELSON 1994).

O gênero *Corydoras* (Siluriformes: Callichthyidae) é o maior entre os Siluriformes, é constituído de 177 espécies válidas. (REIS, 2003). Habitam grande variedade de ambientes, mas sua maior diversidade de espécies está nos rios da Amazônia e Guianas. O gênero tem distribuição por todas as principais bacias da região Cis-andina da América do sul e Trans-andina da Colômbia e do Panamá (REIS, 1998). O reconhecimento dos representantes desta família é facilmente feito

pela identificação de duas séries longitudinais de placas dérmicas que revestem quase em totalidade o corpo. A variação do tamanho e forma corporal é desprezível, ocorrendo este padrão também em outras famílias de como loricariidae e pimelodidae (SHIMABUKURO-DIAS, 2003).

Vários aspectos da biologia de representantes da espécie já foram extensivamente estudados. Dentre estes trabalhos, podem se destacar a caracterização do número cromossômico bem como informações como localização das regiões específicas do cariótipo destas como a posição das regiões organizadoras de nucléolo, o padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva, a presença de cromossomos Bs, cromossomos sexuais diferenciados e aspectos da (SHIMABUKURO-DIAS, 2003). Porém, estudos de frequência de cromossomos Bs nesta família, são escassos.

Estudos citogenéticos em Callichthyidae tem mostrado muitos rearranjos cromossômicos, incluindo eventos de poliploidia na sua história evolutiva, particularmente no gênero *Corydoras*, no qual a variação do número diplóide é de $2n=40$ a $2n=134$ cromossomos, *Corydoras nattereri* (OLIVEIRA et al., 1990) e *C. aeneus* (TURNER et al., 1992) respectivamente.

Os cromossomos Bs podem em geral variar em número, mas são em sua maioria pequenos e heterocromáticos. (GRUBER, 2002). Embora estes cromossomos possam ter sido originados de cromossomos autossômicos ou sexuais, sua recombinação não é conjunta e desta forma seguem seu próprio caminho evolutivo (CAMACHO et al 2000),.

Nas espécies de peixes brasileiros de água doce há relativamente uma grande quantidade de relatos de cromossomos Bs. Porém, estes trabalhos só tratam de relatos, sendo a maioria deles sobre a ocorrência de cromossomos Bs e sua descrição morfológica.

Esta acumulação pode não provocar consequências aparentes. Porém de acordo com estudos, há evidências de que esses cromossomos podem produzir algum tipo de efeito para o organismo que podem em sua maioria acarretar aspectos negativos ao animal. De acordo com Jones e Rees (1982) estes cromossomos podem interferir em características associadas a vigor e fertilidade.

De acordo com a descrição citogenética da espécie feita por Oliveira e colaboradores (1988), foi observada a ocorrência de cromossomos Bs nas 4

populações de do estudo. A ausência de informação sobre a frequência destes cromossomos no grupo motivou o presente trabalho com a espécie.

2 OBJETIVOS

- Analisar a frequência intrapopulacional de cromossomos Bs na espécie de *Corydoras aeneus*.
- Analisar a frequência intraindividual de cromossomos Bs na espécie de *C. aeneus*.
- verificar a existência de um possível 'padrão sexual relacionada a ocorrência destes cromossomos em *C. aeneus*.
- Entender a dinâmica deste cromossomo B na população, discutindo aspectos ligados a fatores da divisão mitótica, reprodutivos e ambientais que possam interferir na variação da frequência de cromossomos Bs e o que isto pode acarretar para a espécie.

3 MATERIAL

Amostras de uma população de *Corydoras aeneus* (fig. 2), foram coletadas no Ribeirão Claro (Rio claro, SP) (figuras 1, 3 e 4). Foram analisados 26 indivíduos (12 Machos e 14 Fêmeas), sendo 30 metáfases analisadas por indivíduo. Os peixes foram identificados e depositados na coleção do Laboratório de Genética de Peixes, Departamento de Biologia, Universidade Estadual Paulista - Instituto de Biociências, Rio Claro, São Paulo, Brasil.

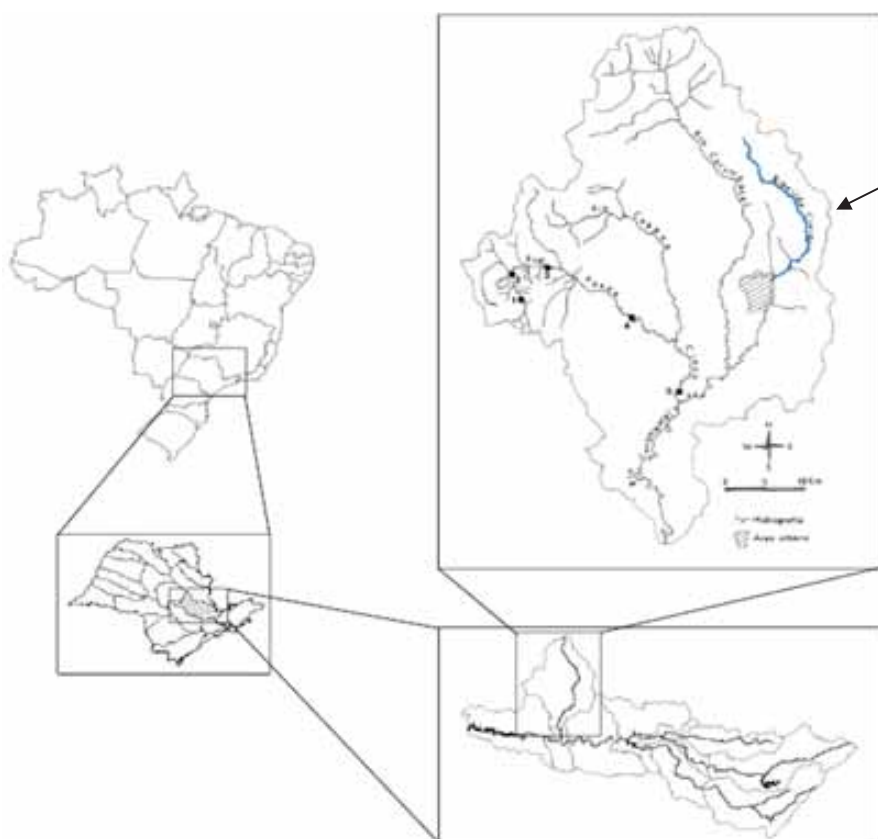


Figura 1: Mapa indicando a bacia do Corumbataí e o Ribeirão Claro em destaque de cor azul (modificado de Carmassi et al, 2009)



Figura 2. Exemplar de adultos de *Corydoras aeneus* coletado na região de estudo



Figura 3: Foto do Ribeirão Claro, bacia do rio Tietê, sub-bacia do rio Corumbataí onde as coletas foram efetuadas.

4 MÉTODOS

4.1 Técnicas de coleta

As amostras foram coletadas nos anos de 2008, 2009 e 2010, principalmente nas épocas de seca, utilizando um puçá de 1mX1m. O mesmo era colocado nos barrancos nas margens do ribeirão com a preocupação de sempre ter vegetação presente. Todas as coletas efetuadas abrangeram a mesma área do curso d'água. A área amostrada foi de aproximadamente 30 metros em ambas margens.

4.2 Preparações citogenéticas

Para a obtenção de um número maior de mitoses utilizou-se injeção de uma solução de fermento biológico, técnica descrita inicialmente para os anfíbios e répteis e depois para peixes por Oliveira (1988), a preparação cromossômica foi realizada seguindo basicamente o proposto por **Foresti (1993), conforme protocolo a seguir**

1. Injetar intraperitonealmente uma solução de colchicina 0,05% na proporção de 1ml para cada 100g de peso do animal. Deixa-lo nadando livremente por 50 minutos.
2. Sacrificar o animal retirando rins, brânquias, fígado (para posteriores estudos moleculares) e gônadas para identificação do sexo.
3. Colocar os tecidos de rins e bânquias em placa de petri contendo cerca de 7 ml de solução hipotônica (KCL 0.075M).
4. Dissociar o material, procurando a obtenção de uma suspensão de células. Para que seja eficiente esta suspensão a dissociação primeiro e feita com pinça e depois para homogeneização foi usada uma pipeta de pasteur.
5. A suspensão celular é retirada da placa de petri e colocada em um tubo de centrifuga. Este foi colocado em uma estufa por aproximadamente 21 minutos na temperatura de 37°C.
6. Depois de passados os 21 minutos a suspensão é retirada da estufa e 7 gotas de fixador gelado (metanol e ácido acético na proporção 3:1, respectivamente) são colocadas. Agitar levemente e deixar em repouso por 5 minutos á temperatura ambiente.

7. Passados 5 minutos adiciona-se mais 6 ml aproximadamente de fixados gelado e novamente agitar a mistura.

8. Levar á centrifuga 10 minutos a 1000 rpm.

9. O item oito é repetido por mais duas ou três vezes, mas com o tempo de 7 minutos ao invés de 10.

10. Pingar o material á uma distancia de mais ou menos 30 cm da pipeta para lâmina devidamente marcada e limpa.

4.3 Coloração Convencional

As lâminas serão coradas com corante de Giemsa, o procedimento utilizado será:

1. Após pingar o material na lâmina, esperar secar e corar com uma solução de giemsa a 10% em tampão fosfato (ph = 6,7) por aproximadamente 10 minutos.

4.4 Análises dos dados

Para facilitar a interpretação dos dados usou-se a mediana de distribuição do número de Bs em uma amostra de células proposta por Pardo et al. (1994).

Para quantificar a instabilidade mitótica do cromossomo B será usado o MI, índice de instabilidade mitótica que é calculado pela soma dos valores absolutos de cada desvio da quantidade de B com relação à mediana (M) e normalizada dividindo-se pela mediana e a quantidade de células analisadas (N), fazendo com que o índice fique independente do número de Bs e da amostra (Pardo et al., 1994).

$$MI = \frac{\sum(|M - n_i|f_i)}{M.N}$$

ni: número de cromossomos B nos diferentes tipos de célula.

fi: número de células estudadas.

Primeiramente o cálculo do MI será feito para cada indivíduo, após isso será comparada a freqüência de Bs e MI entre machos e fêmeas através da ANOVA one-way, utilizando Bioestat 5.0[®].

Nas análises feitas num projeto piloto, percebeu-se que os cromossomos Bs de *Corydoras aeneus* são mitoticamente instáveis, pois foram encontradas variações

intraindividual e interindividual. Além desta instabilidade, a variação intersexual da frequência de cromossomos B se mostrou bem representativa nas análises. Como este trabalho foi de análise de frequência de cromossomos B, mantiveram-se o número de metáfases analisadas por indivíduo, num total de 30 metáfases.

5 RESULTADOS

O número diplóide modal observado foi de $2n=60$ cromossomos, com a ocorrência de 1 ou 2 cromossomos Bs (figura 4). Entre os machos foi observada a frequência média de Bs: $2n = 60$ em 20%, $2n=60+1B$ em 31,94% e $2n=60+2B$ em 48,06% das metáfases analisadas e nas fêmeas $2n = 60$ em 88,88%, $2n=60+1B$ em 10,47% e $2n=60+2B$ em 0,71% (figura 5 e tabela 1). A avaliação populacional mostrou que a ocorrência de 1 cromossomo B é de 20%, de 2 cromossomos Bs de 23% e de nenhum é de 57% (figura 6).

Análises estatísticas foram feitas na tentativa de uma comparação entre machos e fêmeas. De acordo com a análise de comparação dos MIs através da ANOVA one-way, a diferença entre a instabilidade mitótica de machos e fêmeas na população estudada foi significativa ($F=30,3421$; $p=0,0004$; $GL=11$). Os dados comparativos entre machos e fêmeas podem ser observados na figura 7.

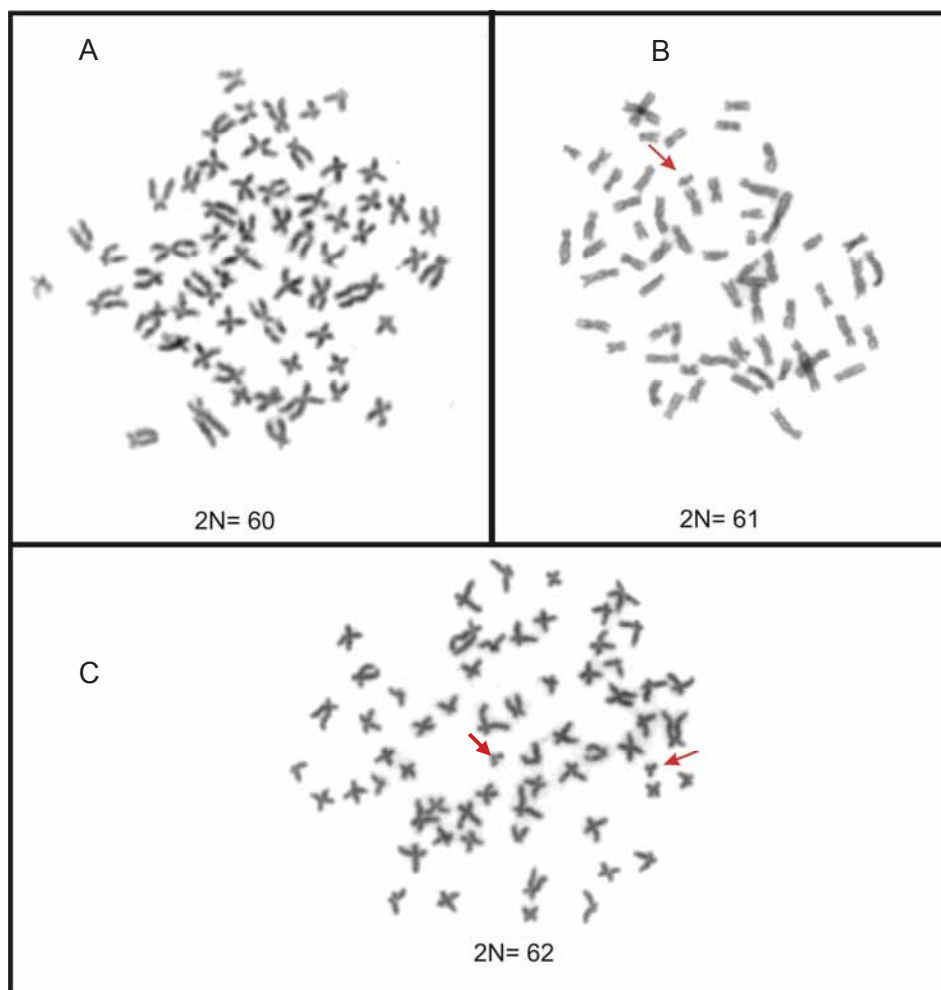


Figura 4. Metáfases com diferentes números diplóides em espécimes de *Corydoras aeneus*. Em A, $2n = 60$. B) $2n = 60+1B$. C) $2n = 60+2B$

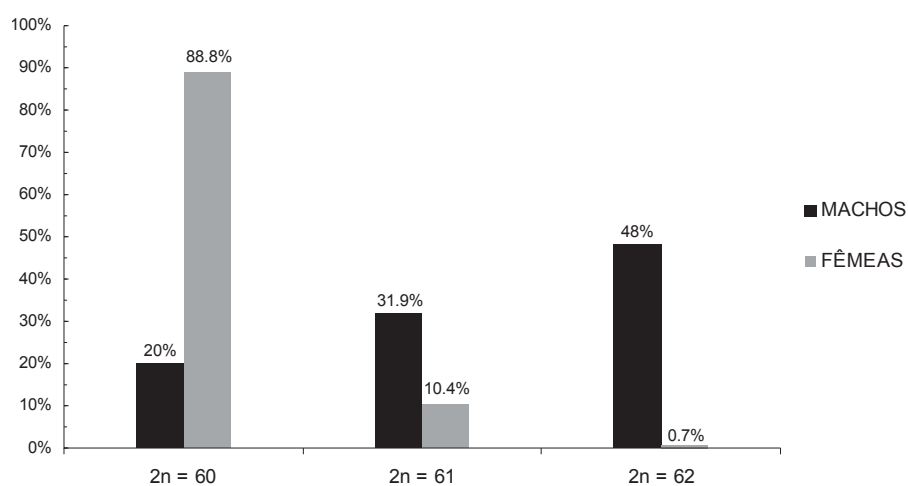


Figura 5: Frequência de cromossomos Bs em relação ao sexo masculino e feminino em *Corydoras aeneus*. Nos machos $2n = 60$ corresponde 20%, $2n=60+1B$ 31,94% e $2n=60+2B$ 48,06%. Nas fêmeas $2n = 60$ corresponde 88,80%, $2n=60+1B$ 10,47% e $2n=60+2B$ 0,71%.

Tabela 1. Indivíduos amostrados e as quantidades de cromossomo por metáfase analisados, mediana de distribuição do número de Bs e MI (Índice de instabilidade mitótica)

Identificação do indivíduo	Sexo	1B	2B	Número de metáfases	Mediana	MI
f1	♀	2	0	30	0,06	1,07777
f2	♀	5	0	30	0,16	1,0088
f3	♀	3	1	30	0,16	0,941666
f4	♀	2	0	30	0,06	1,0777
f5	♀	6	0	30	0,36666	0,9185
f6	♀	0	0	30	0,2	0,96
f7	♀	0	0	30	0	0
f8	♀	1	0	30	0,03333	0,96666
f9	♀	3	0	30	0,1	0,96666
f10	♀	4	0	30	0,13333	0,96
f11	♀	0	0	30	0	0
f12	♀	8	0	30	0,26666	0,96
f13	♀	1	0	30	0,03333	0,96666
f14	♀	2	0	30	0,06	1,07777
m1	♂	8	16	30	1,33	0,9
m2	♂	9	17	30	1,43	0,89
m3	♂	7	20	30	1,56	0,902
m4	♂	8	20	30	1,6	0,9
m5	♂	10	13	30	1,2	0,9
m6	♂	11	11	30	1,1	0,9
m7	♂	12	15	30	1,4	0,9
m8	♂	11	13	30	1,23333	0,90006
m9	♂	12	8	30	0,93333	0,9000002
m10	♂	13	12	30	1,2333	0,899999
m11	♂	8	15	30	1,2666	0,9
m12	♂	6	13	30	1,06666	0,9

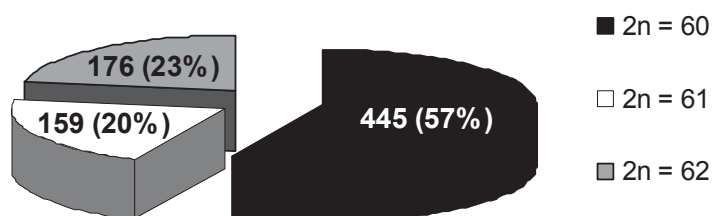


Figura 6: Análise populacional de ocorrência de cromossomos Bs em *Corydoras aeneus*.

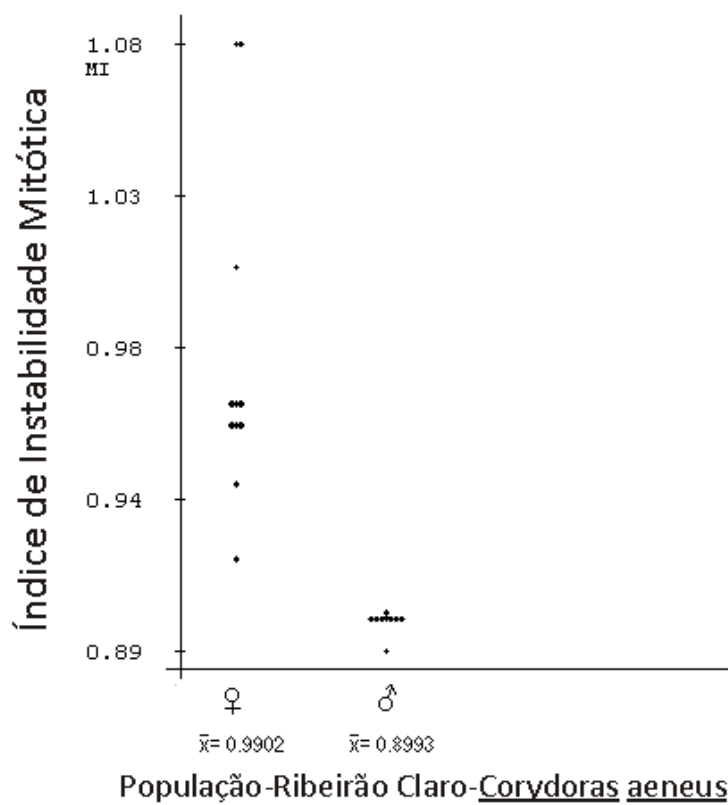


Figura 7: Média dos índices de instabilidade mitótica (MI) na amostra do Ribeirão Claro comparando a frequência dos machos com a das fêmeas. Os pontos mais agrupados correspondem aos machos.

6 DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A alta frequência de Bs em machos (cerca de 80%) e o fato de a ocorrência de 2Bs estar mais restrita aos machos, permitem sugerir que estes cromossomos possam estar relacionados ao sexo masculino nesta espécie. No sexo feminino, devido à baixa frequência destes cromossomos (cerca de 10%) pode-se dizer que sua ocorrência trata-se de um evento esporádico. A ocorrência de dois cromossomos Bs em indivíduos fêmeas foi vista somente em uma metáfase do material de um indivíduo reforçando a afirmativa de que este possa estar ligado ao sexo masculino.

Este padrão de maior frequência de ocorrência em machos também foi visto pela primeira vez na espécie de peixe *Astyanax scabripinnis* (ROCON-STANGE e ALMEIDA-TOLEDO, 1993). Nesta espécie, entretanto, diferente do observado no presente trabalho, os cromossomos Bs de *Astyanax scabripinnis* observados foram do tipo microcromossomos. Em *Corydoras*, apesar de serem o menor par do cariótipo, possuem um tamanho que possibilita observar estruturas como braços e centrômero.

Pela primeira vez nesta família foi visto um padrão onde a frequência de dois cromossomos Bs é muito mais abundante nos indivíduos machos. Através do cálculo do índice de instabilidade mitótica houve uma diferença significativa entre o índice dos machos e das fêmeas ($F=30,3421$; $p=0,0004$; $GL=11$). As fêmeas possuem um MI com variação maior, já os indivíduos machos têm um valor de MI muito próximo, o que indica que os cromossomos Bs neste sexo é mais estável comparando com as fêmeas.

Na tentativa de justificar esta diferenciação de frequências entre machos e fêmeas há uma proposta de mecanismo de eliminação das células somáticas no estudo com *Astyanax scabripinnis*. (ROCON-STANGE e ALMEIDA-TOLEDO, 1993). Em “hagfishes” foi observada a eliminação cromossômica nas células somáticas, relatando-se a ocorrência de diferenças entre número de cromossomos nas células somáticas e germinativas em quatro espécies e supõe que durante a clivagem precoce aconteça a eliminação de cromossomos somente nas células somáticas (NAKAI et al., 1991 apud ROCON-STANGE e ALMEIDA-TOLEDO, 1993).

A explicação para este resultado pode ser: (1) a preferência por espermatogônias no caso do acúmulo nos machos, (2) o mecanismo de eliminação

ser mais eficiente nas fêmeas, (3) características genéticas que permitem a supressão deste cromossomo nas fêmeas e não nos machos.

A origem deste tipo cromossômico ainda é controversa não apenas em peixes como em outros animais e plantas, sendo desconhecida a função dos cromossomos supranumerários (PORTO-FORESTI, 1997).

Hipóteses sugerem que estes cromossomos possam conferir algum tipo de adaptação ambiental ao organismo ou ao sexo. A frequência de cromossomos B é muito variável em populações de peixes, variando de 3,6% em *Characidium cf zebra* a 100% em *Moenkhausia sanctaefilomenae* (SALVADOR e MOREIRA-FILHO, 1992). No presente estudo, como a análise não seguiu periodicidade e não foi coletada nenhuma característica ambiental, não é seguro ligar a frequência de cromossomos B a alguma característica temporal ou do ambiente.

Uma característica importante dos cromossomos B é sua instabilidade nas divisões celulares, já que estes cromossomos não seguem uma segregação mendeliana, o B não se emparelha com nenhum outro elemento durante a meiose. No presente trabalho foi encontrada uma frequência bastante considerável de dois cromossomos Bs, então estes podem estar associados entre si e permanecendo nas células. O acúmulo deste cromossomo pode estar ocorrendo no decorrer das gerações por consequência desta instabilidade mitótica. De acordo com Camacho e colaboradores (2000) este acúmulo pode ser sexo específico, pois esta acumulação foi vista em machos do gafanhoto *Locustra migratória*, onde células com maiores quantidades de B tendem a formar espermatogônias. Algo similar pode estar acontecendo na população *Corydoras aeneus* estudada.

Em populações naturais, como no caso do atual estudo, os cromossomos Bs podem se acumular, atingindo frequências muito altas, dependendo da tolerância da espécie a elementos adicionais (CAMACHO et al., 2000). A frequência pode ser considerada como o efeito de duas forças que se opõem: 1 – Acumulação de B, tendendo a aumentar a frequência e, 2- Os efeitos danosos sobre os indivíduos que trazem consigo o cromossomo B, neste caso tendendo a uma diminuição da frequência (CAMACHO et al., 2000). Normalmente, nos trabalhos nesta área são feitas comparações entre populações, mostram diferenças de frequência sexo específica, mas não são feitas comparações intersexuais na mesma população.

Como a frequência é muito mais abundante nos machos de pelo menos um cromossomo B, este pode ao longo das gerações tornar-se restrito aos machos e

acabar caracterizando um cromossomo sexual. Para isso, novos trabalhos devem ser feitos para entender os processos meióticos e quais genes este cromossomo carrega.

Diversos autores consideram cromossomos Bs genomas parasitas que são mantidos naturalmente nas populações como resultado de um mecanismo acumulativo, aumentando a frequência, podendo causar até efeitos nocivos ao genoma do hospedeiro (ÚSTERGREN, 1945; NUR, 1966 e 1977; JONES, 1985; WERREN et al., 1987).

O acúmulo desta carga genética no núcleo celular, pode não ser prejudicial, mas há mais evidências citando suas desvantagens do que suas vantagens para as populações estudadas. De acordo com estudos de Camacho (2000) os sistemas estudados de cromossomos B em sua maioria se encaixam no modelo parasítico.

Apesar do trabalho não ter seguido uma periodicidade declarada as coletas foram efetuadas nos anos de 2008, 2009 e 2010 como dito acima e foi percebido um aumento da quantidade de Bs nos indivíduos coletados.

Camacho (2000) traz em seu trabalho uma proposta de dinâmica dos cromossomos Bs para *L. migratória*. Neste trabalho mostra quatro fases do ciclo de vida do cromossomo B, começando com a fase parasitária, neste caso o cromossomo possui certa facilidade de se estabelecer e acumular na população e pode ser considerado prejudicial aos portadores. A próxima fase é referente à supressão destes na população, provavelmente através de genes específicos fase chamada de neutralização, neste caso dependendo da capacidade de tolerância de cada população e de cada indivíduo, assim o cromossomo tem, em bem menores quantidades, a capacidade de se estabelecer na população, causando menores efeitos aos portadores. Então esses cromossomos são carregados aleatoriamente em menos quantidade pela população, podendo ocorrer uma diminuição do estoque deste cromossomo. Neste passeio aleatório o B está sujeito a mudanças, a mutações, podendo surgir uma nova variedade capaz de se estabelecer novamente na população regenerando o polimorfismo e dando início ao ciclo novamente.

Como a frequência de cromossomos B no presente trabalho é bastante expressiva na população talvez estes estejam passando pela fase onde a capacidade de invasão é grande, como há diferença entre machos e fêmeas supõe-se que os mecanismos de neutralização da fêmea é diferente do macho, dado que a frequência é significativamente menor. Não é possível saber se estes cromossomos Bs estão na sua primeira invasão, mas de acordo com os dados há uma tendência de o processo

de neutralização nas fêmeas ocorrer anteriormente ao processo dos machos. Este mecanismo pode estar ligado a genes caracteristicamente femininos.

A função destes cromossomos ainda é controversa e bastante questionada, estudos mostram que a frequência deste cromossomo pode interferir em processos fisiológicos e celulares. De acordo com Porto-Foresti e colaboradores (1997), em estudos de frequência de cromossomos Bs em diferentes pontos de um córrego, foi mostrado que em um determinado trecho a frequência de Bs é maior nas fêmeas se comparado com os outros trechos, talvez os cromossomos Bs possam estar conferindo alguma vantagem adaptativa para as fêmeas daquele trecho.

Em *Corydoras aeneus* pode estar ocorrendo algo parecido, talvez os cromossomos B nos machos possam estar conferindo alguma vantagem adaptativa para o gênero e desta forma preservado na população.

A importância destes cromossomos nos genomas eucarióticos primariamente parece de certa forma supérflua (CAMACHO et al., 2000). Porém estudos mostram que estes são importantes em diversas características, tanto ambientais, como morfológicas e funcionais, tanto proporcionando vantagens como prejuízos ao portador. A verdade é que esses genomas que se perpetuam de forma acumulativa são considerados genes egoístas, e, de acordo com Camacho e colaboradores (2000) muitos cromossomos podem ter surgido da evolução, porém somente os genes egoístas possam ter originado os Bs.

Na tentativa de solucionar as questões que surgiram neste trabalho, outros trabalhos poderão ser realizados na tentativa de se entender principalmente a dinâmica dos cromossomos B na população com a diferenciação da frequência entre machos e fêmeas. Trabalhos que incluíssem também análises moleculares, variáveis ambientais e um estudo que trabalhasse com mais gerações seriam interessantes para que a dinâmica destes cromossomos na população com relação à diferença sexual pudesse ser mais bem entendida.

REFERÊNCIAS

ABREU, T.X.; BOCKMANN, F.A.; DARDIS, G.Z.P.; STOPIGLIA, R. e LANGEANI, F. Estrutura e composição da ictiofauna de riachos da bacia do rio Grande no estado de São Paulo, sudeste do Brasil. **Biota Neotropica**, v.4, n.1 2004 Via http://www.biotaneotropica.org.br/v4n1/pt/abstract?article+BN017_04012004 Acesso em: 10 jun 2011.

BRITTO, M.R. **Análise filogenética da ordem Siluriformes com ênfase nas relações da superfamília Loricarioidea (Teleostei: Ostariophysi)**. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade Estadual de São Paulo, p. 512, 2003.

BURGES, W.E. An atlas of freshwater and marine catfishes a preliminary survey of the Siluriformes. **T.F.H. Publications**, Neptune, NJ. 1989

CAMACHO, J.P.M. et al. B-chromosome evolution. **Philosophical Transactions of the Royal Society**. v.355, p.163–178, 2000.

CARMASSI A. L. Fish, Passa Cinco stream, Corumbataí river basin, state of São Paulo, Brazil. **Check List**, v. 5(1), p. 112–117, 2009.

CASTRO R. M. C. et al. Structure and composition of the stream ichthyofauna of four tributary rivers of upper Rio Paraná basin, Brazil. **Ichthyol. Explor. Freshwaters**, v. 6(3), p. 193-214, 2005.

CASTRO, R. M. C. et al. Estrutura e composição da ictiofauna de riachos do rio Paranapanema, sudeste e sul do Brasil. **Biota Neotropica**, v. 3(1), p. 1-31, 2003.

CASTRO, R.M.C., Menezes, N.A. Estudo diagnóstico da diversidade de peixes do estado de São Paulo In: JOLTC A.; BICUDO, C.E.M. (Orgs.). **Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: Síntese do conhecimento ao final do século XX**, São Paulo: FAPESP, 1998, v.6, p. 3-13.

CASTRO, R. M. C.; CASATTI, L.; SANTOS, H.F.; VARI, R.P. e MELO A.L.A. Structure and composition of the stream ichthyofauna of four tributary rivers of upper Rio Paraná basin, Brazil. **Ichthyology Exploration Freshwaters**, v.6, n.3, p.193-214, 2005.

CASTRO, R.M.C.; CASATTI, L.; SANTOS, H.F.; FERREIRA, K.M.; RIBEIRO, A.C.; BENINE, R.C.; DARDIS, G.Z.P.; MELO, A.L.A.; ABREU, T.X.; BOCKMANN, F.A., CARVALHO, M.; GIBRAN, F.Z. e LIMA, F.C.T.. Estrutura e composição da ictiofauna de riachos do Rio Paranapanema, sudeste e sul do Brasil. **Biota Neotropica**, v.3, n.1, 2003 http://www.biotaneotropica.org.br/v3n1/pt/abstract?article+BN017_03012003 Acesso em: 10 jun 2011.

CASTRO, R.M.C.; CASATTI, L.; SANTOS, H.F.; MELO, A.L.A.; MARTINS, L.S.F.; FERREIRA, K.M.; GIBRAN, F.Z.; BENINE, R.C.; CARVALHO, M.; RIBEIRO, A.C.;

COSTA P.P.F., BRAGA F. M. S., GOMIEIRO L. M., VILLARES G. A. J. E GOLÇALVES F. M. F. (2010). **Dados preliminares sobre a alimentação da ictiofauna em uma lagoa marginal no leito do rio e em um trecho com despejo de esgoto do ribeirão claro**, Rio Claro, SP. p. 7016-7019. No prelo

DE PINNA, M.C.C. Phylogenetic relations of Neotropical Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi): historical overview and synthesis of hypotheses. In **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**, edited by Malabarba, L.R., Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena, Z.M.S. e Lucena, C.A.S. Edipucrs. Porto Alegre, RS, p. 279-330, 1998.

DIOGO, R. Higher-level phylogeny of Siluriformes – An overview. In: Arratia, G.; KAPOOR, B.G.; CHARDON, M. e DIOGO, R. (Eds). Catfishes. London: **Science Publishers**, p. 353-384, 2003.

FINK, S. V.; FINK, W. L. Interrelationships of the ostariophysan fishes (Teleostei). **Zoll. J. Linn. Soc**, v. 72(4), p. 297-353, 1981.

FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. A method for chromosome preparations from large specimens of fishes using in vitro short treatment with colchicine. **Experientia**, v. 49(9), p. 810-813, 1993.

GARCIA, G. J., H. D. HEBERT, J. A. J. PERINOTTO, and J. F. M. CASTRO. 2004. **Atlas ambiental da bacia do rio Corumbataí**. Disponível em <http://ceapla.rc.unesp.br/atlas/>. Baixado em 13 de março de 2004.

GRUBER, S.L. **Estudos citogenéticos em espécies do gênero *Hyla* (anura, hylidae) dos grupos com 2n=24 e 2n=30, com técnicas de coloração diferencial**. 2002. Tese (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2002

HOWELL, W.M., BLACK, D.A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia**, v. 36, p. 1014-1015, 1981.

JONES, R.N. Are B chromosomes selfish? In: Cavalier-Smith T, ed. **The Evolution of Genome Size**. London: Wiley, pp 397-425, 1985.

JONES, R. N., REES H. **B chromosomes**. London: Academic Press, 1982.

LUNDBERG, J. G., MARSHALL, L. G., GUERREIRO, J., HORTON, B., MALABARBA M. C. S. L., WESSELINGH, F. The stage for neotropical fish diversification: A history of tropical South America rivers. Pp.13-48. In: MALABARBA, L. R., R E. REIS, R. P. VARI, Z. M. S. L CENA & C. A. S. LUCENA (Eds.). **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Porto Alegre, Edipucrs, 1998, 603p.

MORAES, A.T.C.C. **Biótopos na área de proteção ambiental das cuestas de São Pedro e Analândia**. Dissertação (Mestrado em Geociências) - Instituto de Geociências e Ciências Exatas. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1985. 180p.

NELSON, J. S. **Fishes of the world**. 3rd edition, John Wiley & Sons., Inc., New York, USA. 1994.

NELSON, J. S. Fishes of the world. 3rd edition, John Wiley & Sons., Inc., New York, USA. Page RDM e Holmes EC (1998). **Molecular evolution**. A phylogenetic approach. Blackwell Science, UK, 1994.

NUR, U. Harmful B chromosomes in a mealy bug population. **Genetics**, v. 54, p. 1225-1238, 1966.

NUR, U. Maintenance of a 'parasitic' B chromosome in the grasshopper *Melanoplus femur-rubrum*. **Genetics**, v. 87, p. 499-512, 1977.

OLIVEIRA, C. et al. Comparative cytogenetic analysis of three cytotypes of *Corydoras nattereri* (Pisces, Siluriformes, callichthyidae). **Cytologia**, v.55, p. 21-26, 1990.

OLIVEIRA, C. et al. Supernumerary chromosomes, robertsonian rearrangements and multiple NORs in *Corydoras aeneus* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). **Caryologia**, v. 41, p. 227-236, 1988.

ÖSTERGREN, G. Parasitic nature of extra fragment chromosomes. **Bot Notiser**, v. 2, p. 157-163, 1945.

PARDO, M.D., CABRERO, J., CAMACHO, J.P.M. Transmission analysis of mitotically unstable B chromosomes in *Locusta migratoria*. **Genome**, v. 37, p. 1027-1034, 1994.

PAXTON, J.R. e ESCHMEYER, W.N. **Encyclopedia of fishes**. Academic Press, San Diego, 1995.

PINTO, A. L. **Estudo da potencialidade, captação, tratamento, abastecimento e potabilidade da água da bacia do Ribeirão Claro/SP**. Dissertação (Mestrado em Geociências e Meio Ambiente) – Instituto de Geociências e Ciências Exatas. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1993. 263 f.

PORTO-FORESTI F., OLIVEIRA C., MAISTRO E.L., FORESTI F. Estimated frequency of B chromosomes and population density of *Astyanax scabripinnis paranae* in a small stream. **Brazil. J. Genetics**, v. 20, p. 377-380, 1997.

PURDOM, C.E. **Genetics and Fish breeding**. Chapman and Hall editors. London, 1993.

REIS, R. E.. Anatomy and phylogenetic analysis of the neotropical callichthyid catfishes (Ostariophysi, Siluriformes). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 124(2), p.105-168, 1998.

REIS, R. E.; KULLANDER, S. O., FERRARIS Jr., C. J. **Check list of the freshwater fishes of South America**, edited by Edipucrs, Porto Alegre, 2003.

RONCON-STANGE, E.A.R., ALMEIDA-TOLEDO, L.F. Supernumerary B chromosomes restricted to males in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characiformes). **Rev. Bras. Genet**, v. 16, p. 601-615, 1993.

RONDINELI, GR., BRAGA, FMS. Biologia populacional de *Corydoras flaveolus* (Siluriformes, Callichthyidae) no rio Passa Cinco, sub-bacia do rio Corumbataí, São Paulo, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 9(4), p. 1-9, 2009.

ROSA, R.S., MENEZES, N.A. Relação preliminar das espécies de peixes (Pisces, Elasmobranchii, Actinopterygii) ameaçadas no Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 13(3), p. 647-667, 1996.

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

SHIMABUKURO-DIAS, C. K. **Análise da evolução de espécies da família Callichthyidae (Teleostei: Siluriformes) com base em caracteres cromossômicos e de DNA mitocondrial**. 2003. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Exp. Cell Res**, v.75(1), p. 304-6, 1972.

TURNER B. J., DIFFOOT N., RASCH E. M. The callichthyid catfish *Corydoras aeneus* is an unresolved diploid-tetraploid sibling complex. **Ichthyol. Explor. Freshwaters** v. 3, p. 17-23, 1992.

WERREN, J.H., NUR, U., EICKBUSH, D.G. An extrachromosomal factor causing loss of paternal chromosomes. **Nature**, v. 327, p. 75-76, 1987.

