

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

Departamento de Morfologia

Maria Lígia Marques de Oliveira

**Mapeamento físico dos genes ribossomais 18S e 5S em peixes do gênero
Trichomycterus (Teleostei, Trichomycteridae)**

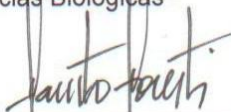
Botucatu

2011

Maria Lígia Marques de Oliveira

**Mapeamento físico dos genes ribossomais 18S e 5S em peixes do gênero
Trichomycterus (Teleostei, Trichomycteridae)**

Monografia apresentada ao Departamento de
Morfologia do Instituto de Biociências da
Universidade Estadual Paulista como requisito
parcial para conclusão do curso de Bacharelado
Ciências Biológicas



Orientador: Prof. Dr. Fausto Foresti

Botucatu 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Oliveira, Maria Lígia Marques.

Mapeamento físico dos genes ribossomais 18S e 5S em peixes do gênero *Trichomycterus* (Teleostei, Trichomycteridae) / Maria Lígia Marques de Oliveira. – Botucatu : [s. n.], 2011

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Fausto Foresti

Capes: 20204000

1. Peixe. 2. Teleosteos. 3. Heterocromatina. 4. Evolução (Biologia).
5. Citogenética animal.

Palavras-chave: DNAr 18S e 5S; Heterocromatina; *Trichomycterus*.

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, agradeço a DEUS, que sempre iluminou e guiou meus passos durante toda essa caminhada.

Gostaria de agradecer ao Prof.^o Fausto pela oportunidade de me deixar fazer parte do Laboratório de Genética e Citogenética de Peixes, pela confiança que depositou em mim, além de todo o tempo dedicado a me ajudar com a realização deste trabalho. Muito obrigada ao José Carlos Pansonato Alves, meu co-orientador, um brilhante profissional, que tanto contribuiu em minha formação, além de ter se tornado um grande amigo.

Meu mais que obrigada por todo amor, carinho e apoio dos meus pais Jorge e Mara, sem os quais não teria chegado ao fim de mais uma etapa de minha vida. Além de todo apoio financeiro, me deram também todo respaldo emocional para suportar tantas mudanças e nunca deixaram de acreditar em mim. Meus agradecimentos à minha irmã Ana Elisa, companheira de muitas horas de desabafo e conselhos, que esteve todo tempo ao meu lado. Vocês três sempre serão as peças fundamentais em minha vida!

Não posso deixar de dizer muito obrigada a três pessoas muito especiais e que sem dúvida alguma se fizeram presentes também durante esse tempo, aconselhando e torcendo por mim; Amélia Calceta (minha avó), Aparecida Cipriani (minha tia – madrinha) e Roque Cipriani (tio e padrinho).

Obrigada também aos grandes e verdadeiros amigos que fiz durante o tempo que realizei meu estágio; Vanessa Paes, Érica Serrano, Priscila Cardim, Ricardo, Cristian e Duílio. Com vocês pude aprender muito sobre citogenética e molecular de peixes, mas aprendi também que os momentos mais difíceis que a vida nos coloca, se tornam simples e fáceis de enfrentar quando estamos próximos de pessoas tão especiais. Vocês fizeram a diferença em minha vida!

À minhas amigas Lívia, Flávia, Luana e Débora, obrigada pelas farras, por tantas risadas e momentos inesquecíveis que tive ao lado de vocês durante todo esse tempo.

Obrigada André Nobile pelas horas de paciência, carinho e dedicação que teve por mim durante a conclusão deste trabalho.

Com certeza muitas outras pessoas passaram em minha vida durante todo esse período, então para vocês também meus agradecimentos e minha admiração.

E não poderia deixar de finalizar estes agradecimentos lembrando de alguém que infelizmente não está mais presente em nosso mundo, mas que com certeza lá de cima

torce com cada conquista que obtenho e me protege sempre com suas mãos abençoadas. Obrigada Antônio Marques! Muito obrigada por me ensinar os caminhos retos da vida e acima de tudo, que nunca devemos desistir dos nossos sonhos, mesmo que pareçam muito distantes devemos lutar até o final.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
1. INTRODUÇÃO	8
1.1 Considerações gerais sobre a Citogenética de Peixes Neotropicais	8
1.2 Considerações sobre a família Trichomycteridae	10
2. OBJETIVOS.....	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.1 Materiais	13
3.2 Métodos	14
3.2.1 Obtenção de cromossomos metafásicos mitóticos	14
3.2.2 Detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs) pela impregnação com nitrito de Prata (AgNO ₃)	15
3.2.3 Identificação da heterocromatina constitutiva	16
3.2.4 Preparação das sondas de DNAr 18S e 5S	16
3.2.5 Hibridação Fluorescente <i>in situ</i>	17
3.2.6 Montagem dos cariótipos.....	18

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo a análise citogenética em nível estrutural e molecular de quatro espécies de peixes do gênero *Trichomycterus*: *T. diabolus*, *T. iheringi*, *T. zonatus* e *T. cf. mimonha*, coletados em diferentes bacias hidrográficas do Brasil. Foram utilizadas técnicas citogenéticas clássicas (Giemsa, impregnação por nitrato de Prata e Bandamento C) e moleculares, com a localização cromossômica dos genes de DNAr 18S e 5S. Todos os indivíduos analisados apresentaram número diplóide de 54 cromossomos e cariótipo constituído por cromossomos dos tipos metacêntricos, submetacêntricos e subtlocêntricos. A heterocromatina constitutiva, identificada pelo bandamento C, foi observada em pequenos blocos em dois pares cromossômicos no cariótipo de *T. diabolus* e em grandes blocos centroméricos em vários pares cromossômicos nos cariótipos de *T. iheringi*, *T. zonatus* e *T. cf. mimonha*. A impregnação pelo nitrato de Prata e a hibridação com a sonda de DNAr 18S evidenciaram a existência de apenas um par portador de regiões organizadoras de nucléolo (RONs) nas espécies em *T. diabolus*, *T. iheringi* e *T. cf. mimonha*, e de dois pares portadores de DNAr 18S em *T. zonatus*. O DNAr 5S foi observado em posição intersticial do par 6 em *T. iheringi*, em sintonia com ao DNAr 18S no par dois de *T. diabolus*, em posição pericentromérica de dois pares submetacêntricos, sendo um deles em sintonia com o DNAr 18S em *T. zonatus* e em *T. cf. mimonha*, este DNAr foi localizado nos pares 3, 18 e 25, sendo sintênico ao DNAr 18S no par 18. Apesar dos representantes destas quatro espécies de *Trichomycterus* apresentarem número diplóide e fórmula cariotípica conservados, observa-se padrões específicos quanto a distribuição da heterocromatina e localização das sequências de DNAr, indicando que eventos de diferenciação cromossômica neste grupo de peixes estejam atuando diretamente sobre estas porções genômicas.

Palavras - chave: *Trichomycterus*, heterocromatina, DNAr 18S e 5S

ABSTRACT

The present study aimed to cytogenetic analysis and structural and molecular level of four fish species of the genus *Trichomycterus*: *T. diabolus*, *T. iheringi*, *T. zonatus* and *T. cf. mimonha* collected in different river basins in Brazil. Techniques were used for classical cytogenetic (Giemsa, Silver nitrate impregnation, C-banding) and molecular with the chromosomal location of genes for 18S and 5S rDNA. All individuals examined had a diploid number 54 chromosomes and karyotype consisting of types of metacentric, submetacentric and subtelocentric. The constitutive heterochromatin identified by C-banding was observed in two small blocks in the karyotype of *T. diabolus* and large blocks of centromeric several pairs in chromosomal karyotypes of *T. iheringi*, *T. zonatus* and *T. cf. mimonha*. The Silver nitrate impregnation and hybridization with 18S rDNA probe revealed the existence of only a couple carrying nucleolar organizing regions (NORs) on the species *T. diabolus*, *T. iheringi* and *T. cf. mimonha*, and two pairs carrying 18S rDNA in *T. zonatus*. The 5S rDNA was observed in interstitial position 6 of the pair in *T. iheringi*, the synteny with the two pair in 18S rDNA of *T. diabolus* in pericentromeric position of and two pairs submetacentric, one being also a case of synteny with the 18S rDNA in *T. zonatus* and *T. cf. mimonha*, this rDNA was located in the pairs 3, 18 and 25, and synteny in the 18S rDNA pair 18. Although representatives of these four species *Trichomycterus* present diploid number and karyotypic formula preserved, there is specific about the distribution patterns of heterochromatin and location of rDNA sequences, indicating that chromosomal differentiation events in this group of fish are acting directly on these genomic portions.

Key-words: *Trichomycterus*, heterochromatin, 18S and 5S rDNA.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais sobre a Citogenética de Peixes Neotropicais

Os estudos citogenéticos tiveram um grande desenvolvimento nos últimos anos, devido basicamente à utilização de novas técnicas para análise cromossômica, o que tem possibilitado à Citogenética contribuir mais efetivamente não só para estudos taxonômicos e filogenéticos, como também para uma melhor compreensão da estrutura cromossômica. Estes avanços técnicos têm se refletido também nos estudos citogenéticos em peixes, resultando numa expansão considerável do número de espécies estudadas nos últimos anos. Na região Neotropical já foram analisadas cerca de 1040 espécies de peixes de água doce, sendo 475 espécies da ordem Characiformes, 318 espécies de Siluriformes, 48 espécies de Gymnotiformes e 199 espécies que não pertencem a superordem Ostariophysi (revisão em Oliveira *et al.*, 2007). Este levantamento aponta ainda que cromossomos supranumerários foram descritos para 38 espécies e que cromossomos sexuais foram relatados para 62 espécies, sendo 40 espécies com heterogametia feminina e 22 espécies com heterogametia masculina. Os resultados recentes mostram um aumento substancial das informações cariotípicas, se comparados ao levantamento realizado por Oliveira *et al.* (1988a). No entanto, estes dados são ainda incipientes ao se considerar que possam existir cerca de 6.000 espécies de peixes distribuídas nessa região biogeográfica (Reis *et al.*, 2003).

A crescente aplicação de técnicas de bandamento cromossômico nos estudos citogenéticos de peixes, notadamente as de bandas C e bandas de endonucleases de restrição, o emprego de fluorocromos base específicos, como a Cromomicina A₃ e o DAPI, permitiram não só uma melhor caracterização da diversidade cariotípica, como também o entendimento das relações evolutivas existentes entre diferentes táxons (revisão em Almeida-Toledo *et al.*, 2000). Ultimamente, o desenvolvimento de sondas específicas como aquelas para genes ribossômicos e de histonas, constituídas por DNA de moderada repetitividade, ou as de DNA altamente repetitivo (DNA satélite) (Singer, 1982; Oliveira e Wright, 1998), em associação ao advento da técnica de microdissecção cromossômica (Kao, 1990; Meltzer *et al.*, 1992), que possibilita o isolamento direto de DNA de qualquer região citogeneticamente reconhecida, tem possibilitado a hibridização em cromossomos metafásicos pela técnica denominada hibridação fluorescente *in situ* (FISH). Esse tipo de abordagem citogenética em nível molecular permite, ao se estudar porções diferenciais da cromatina nos cromossomos, obter informações mais precisas

acerca da presença ou não de determinadas sequências de DNA, detectar rearranjos cromossômicos, determinar a origem de cromossomos, construir mapas gênicos e até mesmo estabelecer relações filogenéticas entre os componentes dos diferentes grupos de organismos (revisão em Phillips e Reed, 1996; Oliveira e Wright, 1998; Henning *et al.*, 2008a).

O estudo citogenético contínuo e sistemático de determinados grupos de peixes tem levado ao esclarecimento de questões taxonômicas, à identificação de espécies crípticas, assim como a um melhor entendimento tanto da estrutura e variabilidade cromossômica quanto dos processos evolutivos envolvidos na evolução do cariótipo dos peixes Neotropicais (Oliveira *et al.*, 2007). Esse tipo de abordagem tem sido aplicado, por exemplo, em peixes da Ordem Gymnotiformes, notadamente em espécies do gênero *Eigenmannia*. Análises citogenéticas realizadas nesse grupo a partir do final da década de setenta, revelaram que a despeito da ocorrência de uma única espécie identificada como *Eigenmannia virescens* para os rios de várias bacias brasileiras, os dados citogenéticos têm indicado para a ocorrência de um complexo de espécies, com a identificação até o presente de pelo menos cinco citótipos na bacia superior do rio Paraná, dois citótipos no rio São Francisco, três na região Amazônica, além de um extenso polimorfismo cromossômico na ilha de Marajó. Além de esclarecimentos citotaxonômicos, os estudos citogenéticos nesse grupo evidenciaram a ocorrência de distintos sistemas de cromossomos sexuais morfologicamente diferenciados na maioria dos citótipos (revisão em Almeida-Toledo e Foresti, 2001).

A aplicação de técnicas moleculares em alguns desses citótipos, como a marcação pelos fluorocromos Cromomicina A₃ e Mitramicina, permitiram caracterizar as regiões heterocromáticas ligadas aos cromossomos sexuais como sendo regiões ricas em pares de bases GC em duas das espécies desse complexo. Do mesmo modo, a aplicação de fluorocromos e endonucleases de restrição, associadas às técnicas de coloração convencional, trouxe esclarecimentos acerca dos mecanismos envolvidos na formação do cromossomo Y em *Eigenmannia* sp2, corroborando com uma hipótese anteriormente postulada que sugeria que nessa espécie a diferenciação sexual estaria realmente relacionada a regiões cromossômicas GC positivas (Almeida-Toledo *et al.*, 2000).

O estudo sistematizado de outros grupos de peixes, como os efetuados em *Hoplias malabaricus* (síntese em Bertollo *et al.*, 2000; Born e Bertollo, 2002), *Astyanax* (síntese

em Kavalco, 2008), *Corydoras* (Oliveira *et al.*, 1988b; 1992), *Triportheus* (Artoni *et al.*, 2001; Artoni e Bertollo, 2002; Diniz *et al.*, 2008) e *Characidium* (Alves *et al.*, 2010) dentre outros, também tem trazido importantes informações cariotípicas, muitas vezes esclarecedoras de questões genético-evolutivas relacionadas aos peixes Neotropicais.

1.2 Considerações sobre a família Trichomycteridae

A família Trichomycteridae representa um dos mais importantes componentes taxonômicos de Loricarioidea. Com cerca de 210 espécies conhecidas (Ferraris, 2007) e numerosas formas ainda não descritas, esta família de peixes está dividida em oito subfamílias: Copionodontinae, Glanapteryginae, Sarcoglanidinae, Stegophilinae (incluindo Pareiodontinae), Trichogeninae, Trichomycterinae, Tridentinae e Vandelliinae (de Pinna, 1998).

A família Trichomycteridae (de Pinna 1998), caracteriza-se como um grupo monofilético porque exibe sete sinapomorfias, a maioria das quais estão concentradas no arco opercular suspensivo, estrutura altamente modificada que permite que esses peixes possam ancorar em qualquer substrato ou em qualquer tecido de seus hospedeiros. Já a subfamília Trichomycterinae caracteriza-se como um grupo não monofilético que inclui atualmente oito gêneros e aproximadamente 100 espécies (Wosiacki, 2002). O gênero *Trichomycterus*, o mais especioso entre os Trichomycterinae, com mais de 50 espécies reconhecidas (de Pinna e Wosiacki, 2003), caracteriza-se por apresentar grande diversidade de formas, abrangente distribuição geográfica e que geralmente forma populações geograficamente isoladas, na maioria das vezes em cabeceiras de riachos, resultando num elevado grau de endemismo (de Pinna e Wosiacki, 2003; Wosiacki e Garavello, 2004; Wosiacki e de Pinna, 2007).

Apesar do grande número de espécies e da ampla distribuição dos Trichomycteridae pela região Neotropical, apenas alguns estudos citogenéticos foram realizados em representantes desse grupo (Arratia e Campos, 1997; Borin e Martins-Santos, 1999; Sato *et al.*, 2004; Torres *et al.*, 2004, entre outros). O número diplóide varia de $2n=50$ em *Trichomycterus* sp. (Arratia e Campos, 1997) até $2n=64$ em *Vandellia cirrhosa* (Scheel, 1973), embora a maioria das espécies desta família apresente $2n=54$

cromossomos (Sato *et al.*, 2004). Entre as espécies do gênero *Trichomycterus* ocorre significativa diferenciação em seus números diplóides, sendo $2n=50$ em *Trichomycterus* sp. (Arratia e Campos, 1997), $2n= 52$ em *T. chiltoni* (Arratia e Campos, 1997), $2n=54$ em *T. davisii*, *T. paolence*, *T. spegazzini*, *T. stawiarski*, *T. auroguttatus*, *T. florensis*, *T. reinhardti*, (Borin e Martins-Santos, 1999; Torres *et al.*, 1998; Gonzo *et al.*, 2000; Sato *et al.*, 2004), $2n=56$ em *T. areolatus* e *T. diabolus* (Arratia e Campos, 1997; Torres *et al.*, 2004), $2n=58$ em *T. laucaensis* (Arratia e Campos, 1997) e $2n=62$ em *T. laucaensis* (Arratia e Veloso, 1980), bem como espécies com cromossomos B (Borin e Martins-Santos, 2000; Torres *et al.*, 2002) e casos de triploidia natural (Borin *et al.*, 2002)

O conhecimento da estrutura molecular dos cromossomos das espécies e a realização do mapeamento genético de indivíduos de diferentes espécies e populações de *Trichomycterus*, realizados com base na localização de sítios repetitivos como dos genes ribossômicos 5S, 18S forneceram informações relevantes sobre a dinâmica destes genes e sobre os mecanismos de diversificação cromossômica, contribuindo com estudos filogenéticos e evolutivos neste grupo de peixes.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos desenvolver a análise do cariótipo e aprofundar os estudos citogenético-moleculares em espécies e populações de peixes do gênero *Trichomycterus* que ocorrem nos componentes hidrográficos das bacias dos rios Tietê, Paranapanema e rio Grande, com a finalidade de:

- a) ampliar o conhecimento sobre este grupo de peixes, estabelecendo e comparando a constituição cariotípica de espécies que ocorrem nos componentes das bacias hidrográficas dos rios Tietê, Paranapanema e Grande;
- b) mapear a localização dos genes de DNA repetitivo (DNA ribossômico 5S e 18S) identificando sua posição cromossômica e relação entre espécies e populações, com a utilização da técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH);
- c) identificar os mecanismos cromossômicos ocorridos na diferenciação deste grupo de peixes envolvidos no seu processo evolutivo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Análises cromossômicas foram realizadas em 120 metáfases de *T. iheringi* (8 espécimes: 5 fêmeas e 3 machos); 90 metáfases de *T. diabolus* (10 espécimes: 4 fêmeas e 6 machos), 190 metáfases de *T. zonatus* (17 espécimes: 4 fêmeas e 13 machos) e em 84 metáfases de *T. cf. mimonha* (17 espécimes: 6 fêmeas e 11 machos). Os espécimes foram coletados em riachos de três bacias hidrográficas diferentes (Tabela 1 e Figura 1) e após identificação, foram depositados na coleção de peixes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes de Botucatu.

Tabela 1: Exemplos de *Trichomycterus* analisados. F: fêmeas e M: machos.

n° do lote	Espécie	Rio, Bacia, Município	F	M	Coordenadas
LBP 10878	<i>T. iheringi</i>	Rio Roseira - rio Tietê -Bofete – SP	5	3	23°01'30"S - 48°19'50" O
LBP 10879	<i>T. diabolus</i>	Rio Hortelã – rio Paranapanema – Botucatu - SP	4	6	22°55'24"S - 48°32'43" O
LBP 10877	<i>T. zonatus</i>	Rio Grande – Costeira do Sudeste – Ubatuba - SP	4	13	23°23'41"S - 45°07'17" O
LBP 10876	<i>T. cf. mimonha</i>	Rio Muzambo – rio Grande – Muzambinho – MG	6	11	21°20'46,8"S -46°30'47,1"O



Figura 1: Mapa indicando os locais de coleta das espécies de *Trichomycterus*. 1. Rio Roseira, bacia do rio Tietê, município de Bofete, SP (*T. iheringi*); 2. Rio Hortelã, bacia do rio Paranapanema, município de Botucatu, SP (*T. diabolus*); 3. Rio Grande, bacia Costeira do Sudeste, Ubatuba, SP (*T. zonatus*); 4. Rio Muzambo, bacia do rio Grande, município de Muzambinho, MG (*T. cf. mimonha*).

3.2 Métodos

3.2.1 Obtenção de cromossomos metafásicos mitóticos

A técnica utilizada para obtenção de cromossomos metafásicos seguiu o protocolo descrito por Foresti *et al.* (1981), com algumas adaptações. Essa metodologia envolveu basicamente a inibição da polimerização dos microtúbulos pela colchicina, a hipotonização das células em suspensão e a fixação celular pela mistura de metanol/ácido acético. O procedimento consistiu em:

- a) injetar, na região intra-abdominal, solução aquosa de colchicina (0,025%) na proporção de aproximadamente 1 ml / 100 g de peso do animal;
- b) deixar o peixe em aquário bem aerado, por um período de 50 minutos;
- c) sacrificar o animal, retirando o rim e as brânquias. Transferir o material para uma pequena cuba de vidro, contendo 6 ml de solução hipotônica de KCl (0,075M);
- d) dissociar o material com o auxílio de pinças de dissecação, complementando esse processo com o auxílio de uma pipeta Pasteur, até obter uma solução aquosa homogênea;

- e) transferir a suspensão obtida para um tubo de centrífuga e deixar o tubo no interior de uma estufa a 37°C por 21 min;
- f) retirar da estufa, colocando 10 gotas de fixador gelado (metanol e ácido acético na proporção de 3:1, respectivamente); agitar levemente a mistura com uma pipeta Pasteur e deixar repousar por 5 min a temperatura ambiente;
- g) adicionar cerca de 10 ml de fixador e novamente agitar a mistura; levar à centrífuga (1000 rpm) por 10 min;
- h) retirar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em 10 ml de fixador; centrifugar por 10 min a 1.200 ± 100 rpm;
- i) pingar o material em lâminas;
- j) deixar secar ao ar.

As lâminas podem ser guardadas no congelador, servindo, assim, para aplicação de técnicas de bandamento cromossômico.

3.2.2 Detecção das Regiões Organizadoras de Nucléolos (RONs) pela impregnação com nitrato de Prata (AgNO₃)

Essa técnica caracteriza-se pela reação química da Prata metálica com as proteínas ácidas que compõem o complexo de proteínas nas Regiões Organizadoras de Nucléolos. O procedimento utilizado seguiu a técnica descrita originalmente por Howell e Black (1980), sendo utilizadas duas soluções:

Solução A (solução coloidal reveladora): 1g de gelatina muito bem dissolvida em 50ml de água destilada. Acrescenta-se 0,5ml de ácido fórmico.

Solução B (solução de nitrato de Prata): 1g de AgNO₃ dissolvida em 2ml de água destilada. Depois de preparadas essas soluções, devem ser mantidas em frascos escuros a 4°C.

O procedimento para a coloração das RONs foi o seguinte:

- a)** hidrolisar o material por 3 min em HCL 1N a 60°C;

b) secar as lâminas. Pingar uma gota da solução A e duas gotas da solução B sobre o material na lâmina e cobrir com lamínula;

c) deixar as lâminas sobre um suporte, no interior de um banho-maria a 60°C. Em alguns minutos (aproximadamente 3), a mistura das soluções se torna marrom dourada.

Lavar a lâmina em água destilada e deixar secar;

d) corar com Giemsa na proporção 1:30 em tampão fosfato (pH = 6,7) por aproximadamente 10 segundos;

e) deixar secar ao ar e corar com Giemsa a 5% por 3 minutos.

3.2.3 Identificação da heterocromatina constitutiva

Essa técnica caracteriza-se pela ação sequencial de ácido, base e solução salina para eliminar seletivamente o DNA cromossômico, permanecendo intactas somente regiões de heterocromatina, mais compactadas. O procedimento foi seguido conforme descrito por Sumner (1972), com modificações, e constitui em:

a) deixar a lâmina submersa em HCl 0,2N por 25 minutos, a temperatura ambiente;

b) lavar com água destilada, a temperatura ambiente;

c) lavar a lâmina em solução de hidróxido de Bário 5%, a 60°C, de 5 a 15 segundos;

d) lavar rapidamente em HCl 1N, a 60°C por alguns segundos;

e) incubar a lâmina em 2xSSC, a 60°C, por 25 minutos

f) lavar com água destilada à temperatura ambiente;

g) corar com Giemsa 5% por 10 minutos.

3.2.4 Preparação das sondas de DNAr 18S e 5S

Para o mapeamento dos sítios de DNAr 18S e 5S nos cromossomos metafásicos foram usadas a sonda de DNAr 18S obtida do peixe *Prochilodus argenteus* (Hatanaka e

Galetti Jr., 2004) e sonda de DNAr 5S obtida a partir da espécie *Leporinus elongatus* (Martins e Galetti Jr., 1999). Para a amplificação, foram utilizados 2µl de DNA molde, 1,5µl de cada *primer*, juntamente com 5µl de tampão da enzima Taq polimerase (10X), 0,3µl de MgCl₂ (25mM), 1,25 µl de cada dNTPs (2mM cada), 0,5µl de Taq polimerase (5U/µl) e água Milli-Q 50µl.

A sonda de DNAr 18S foi marcada com biotina 14-dATP por meio da reação de *Nick translation* (BioNick Labeling System – Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante.

A sonda de DNAr 5S foi marcada com digoxigenina 11-dUTP (Roche Applied Science) por meio de uma reação de PCR e os parâmetros para marcação foram: 2µl de DNA molde, 1,5µl de cada *primer* (10 µl), juntamente com 5µl de tampão da enzima Taq polimerase (10X), 0,3 µl de MgCl₂ (25mM), 1,25µl de dATP, dCTP e dGTP e 0,8µl dTTP (2mM cada), 0,7µl de Digoxigenina-11-dUTP, 0,5µl de Taq polimerase (5U/µl) e água Milli-Q qsq 50µl.

3.2.5 Hibridação Fluorescente *in situ*

O mapeamento do DNAr 18S e 5S, em cromossomos metafásicos, foi realizado hibridação *in situ* fluorescente de acordo com o procedimento estabelecido por Pinkel *et al.* (1986), com adaptações.

Dia 1: 3 µl de sonda marcada foram diluídos em 12 µl de solução de hibridação (10% sulfato dextrato, 50% formamida e 20xSSC e Água) e utilizados para cada lâmina. Essa solução foi desnaturada a 85°C por 10 minutos. Lâminas com preparações cromossômicas foram desnaturadas em solução de formamida 70% a 68°C por 3 minutos. As lâminas foram imediatamente lavadas em etanol 70% e desidratadas em série alcoólica (70%, 85% e 100%) a -20°C. Após a série alcoólica e a desnaturação da solução, 15µl da solução de hibridação foram colocados sobre cada lâmina que foi coberta com lamínula de vidro (24x60) e incubadas em câmara úmida e escura a 37°C por toda a noite.

Dia 2: Após hibridação, as lâminas foram lavadas duas vezes em 0,4xSSC + 0,3% Triton a 68°C por 2 minutos. Em seguida, as lâminas foram novamente lavadas duas vezes em 2xSSC + 0,1 Triton por 2 minutos a temperatura ambiente. Após essas lavagens as lâminas foram cobertas com 20 µl de solução bloqueio (Leite em pó, 20xSSC,

e Água) por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida as lâminas foram brevemente lavadas em 2xSSC e receberam 30 µl de solução de bloqueio com anticorpo (24 µl de solução de bloqueio e 6 µl de antidigoxi-rodamina) e foram incubadas por 40 minutos em câmara úmida e escura a 37°C. Após essa incubação as lâminas foram lavadas brevemente em 2xSSC e lavadas mais duas vezes em 2xSSC + 0,1 Triton por 2 minutos a 43°C. Após essa limpeza, as lâminas foram enxaguadas em 2xSSC e cobertas com 22 µl de Vectashield® Mounting Medium com DAPI (Vector). As lâminas foram analisadas em um fotomicroscópio óptico de fluorescência (Olympus BX61) e as imagens metafásicas foram capturadas usando o programa Image Pro Plus, 6.0 software (MediaCybernetics).

3.2.6 Montagem dos cariótipos

Os cromossomos foram arranjados de acordo com os tipos metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subteloicêntricos (st) e acrocêntricos (a), seguindo a classificação estabelecida por Levan *et al.*, (1964), emparelhados com seus prováveis homólogos e organizados em ordem decrescente de tamanho, para a disposição final do cariótipo.

4.RESULTADOS

A análise citogenética das quatro espécies de *Trichomycterus* evidenciou um número diploide constante de 54 cromossomos, sendo o cariótipo constituído por cromossomos dos tipos metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos (Figura 2a, c, e, g). A heterocromatina constitutiva revelou expressiva variação com relação à sua distribuição entre as espécies analisadas. Nas preparações dos indivíduos de *T. diabolus*, foram observados apenas pequenos blocos heterocromáticos nos pares 2 e 18 (Figura 2b), já em *T. iheringi* a heterocromatina constitutiva está distribuída em grandes blocos intersticiais nos pares 2, 3, 7, 8, 18, 19 e 23 (Figura 2d). *Trichomycterus zonatus* apresentou blocos pericentroméricos heterocromáticos na maioria dos cromossomos, além de blocos intersticiais em posição coincidente com as RONS (Figura 2f), enquanto em *T. cf. mimonha* foram observados blocos reduzidos de heterocromatina na região centromérica de todos os cromossomos (Figura 2h).

O resultado da amplificação das sequências para o DNAr 18S e 5S são mostrados na figura 3 (a, b, c, d). A impregnação pelo nitrato de Prata e a hibridação com a sonda de DNAr 18S evidenciou RONS em posição intersticial no par cromossômico metacêntrico número dois em *T. diabolus*, *T. iheringi* e *T. cf. mimonha*, enquanto que em *T. zonatus*, a RONS foi marcada no par metacêntrico número um (destaque nas Figuras 2a,c,e,g e 3a,b,c,d – em vermelho). O DNAr 5S foi localizado em sintonia ao DNAr 18S em *T. diabolus* (Figura 3a – em verde), intersticialmente no par número 6 em *T. iheringi* (Figura 3b – em verde) e intersticialmente no par número 19 em *T. zonatus* (Figura 3c – em verde). Já em *T. cf. mimonha*, as marcações aparecem nos pares 3, 18 e 25, além de estar em sintonia com o DNAr 18S (Figura 3d – em verde).

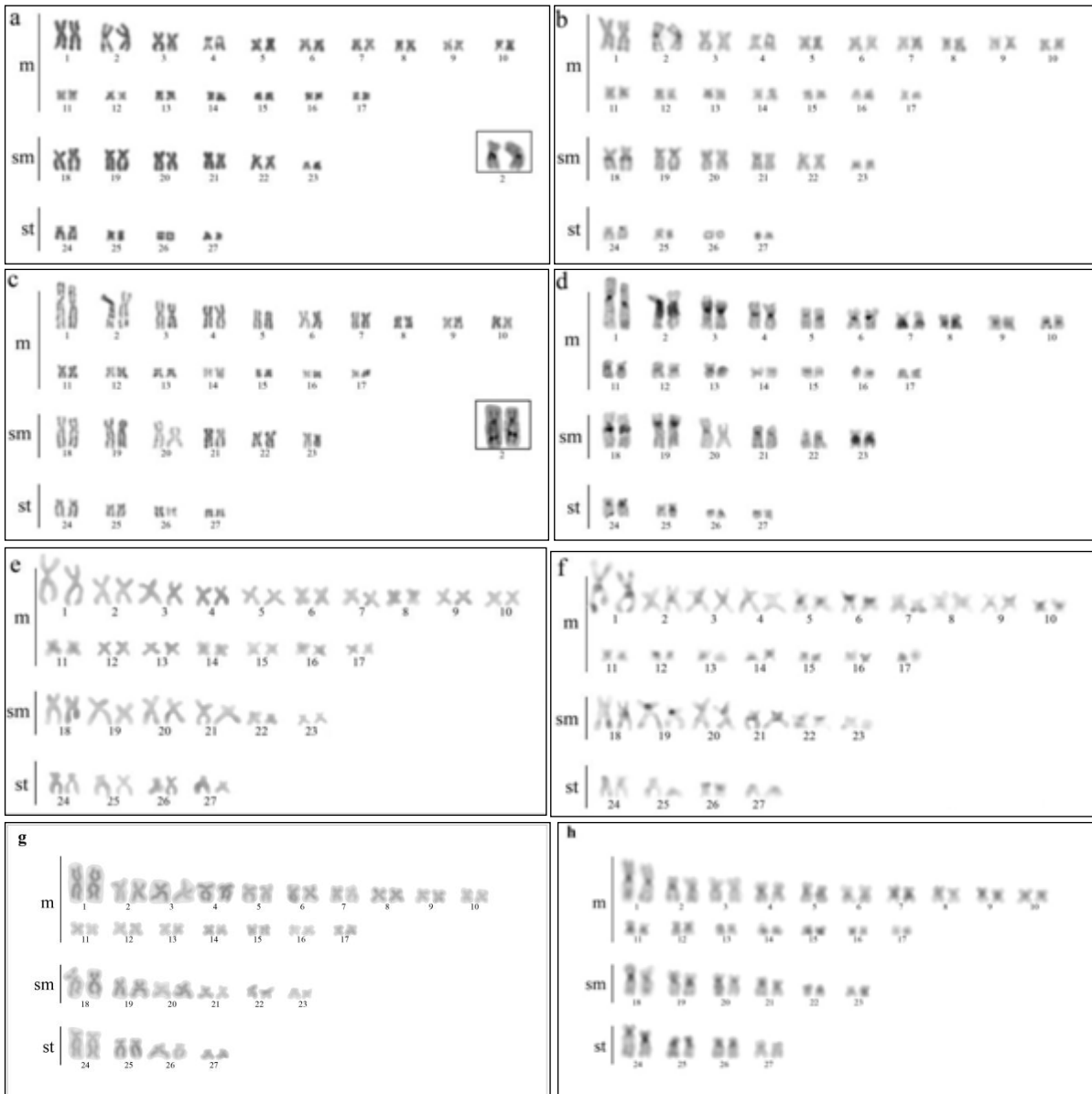


Figura 2: Cariótipos de *T. diabolus*, *T. iheringi*, *T. zonatus* e *T. cf. mimonha* após coloração convencional com Giemsa (a,c,e, g) e bandamento C (b,d,f, h), respectivamente.

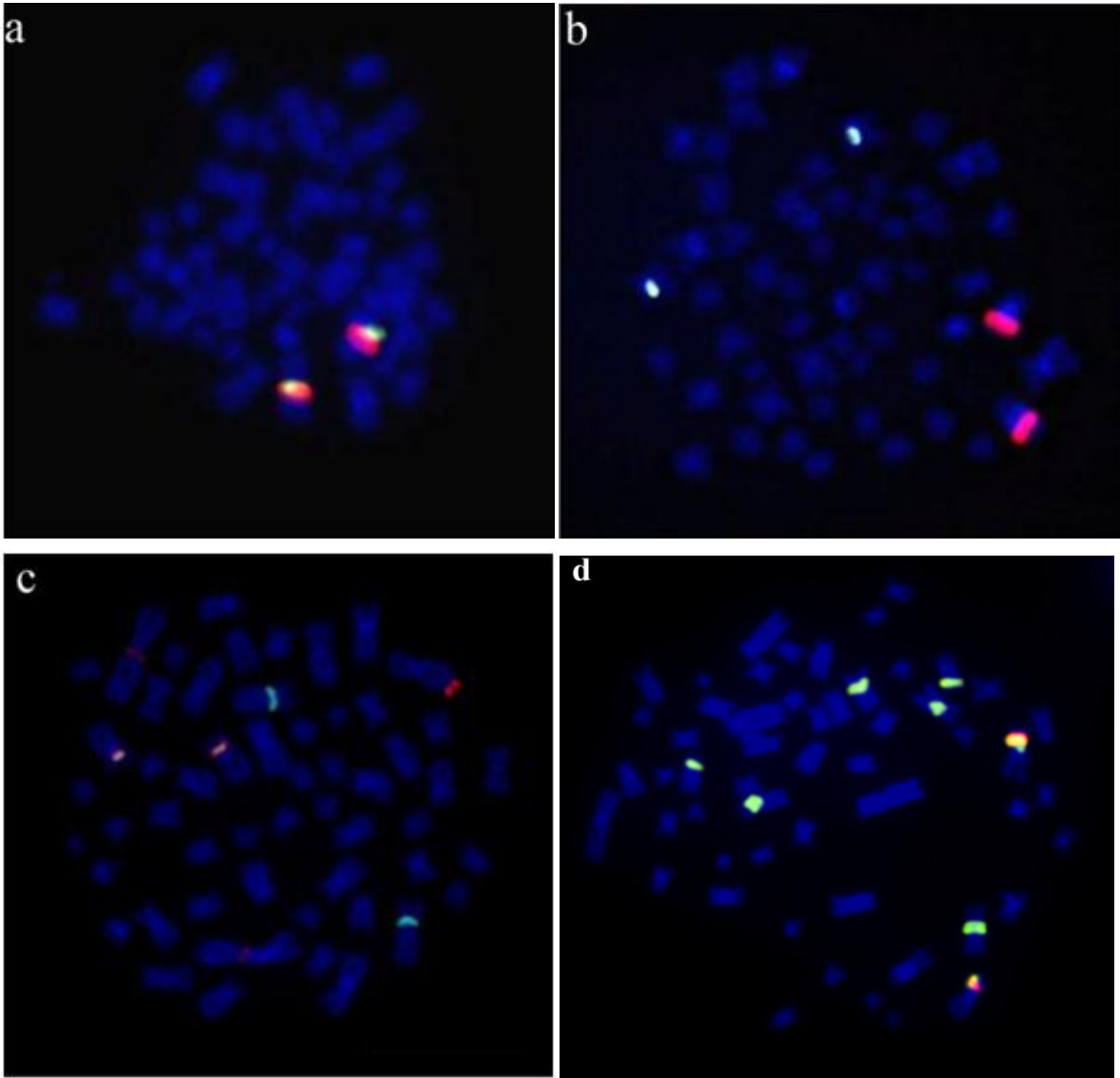


Figura 3: Hibridação *in situ* (FISH) com sondas de DNAr 18S (vermelho) e DNAr 5S (verde). Em a, metáfase de *T. diabolus*, em b, metáfase de *T. iheringi*, em c, metáfase de *T. zonatus* e em d, metáfase de *T. cf. mimonha*.

5.DISSCUSSÃO

As quatro espécies de peixes do gênero *Trichomycterus* analisadas no presente estudo apresentaram uma macroestrutura cariotípica conservada, com cariótipo formado por 54 cromossomos ($2n=54$), distribuídos em 34 cromossomos metacêntricos, 12 submetacêntricos e 8 cromossomos subtelocêntricos (Figuras 2a, c, e, g). Apesar de estas espécies apresentarem o mesmo número diplóide, também comum para as demais espécies do gênero *Trichomycterus* já estudadas, a observação cuidadosa da morfologia dos cromossomos das amostras analisadas, em comparação aos dados disponíveis na literatura, indica que a fórmula cariotípica encontrada não é compartilhada com nenhum outro representante desse grupo (revisão em Sato *et al.*, 2004).

Os dois primeiros pares metacêntricos em *T. iheringi* e *T. diabolus* possuem tamanho semelhantes e são os maiores cromossomos do cariótipo, característica compartilhada apenas com *T. davisii* e *T. stawiarski* (bacia do rio Iguaçu), descritos por Borin e Martins-Santos (2000) e *T. aff. itatiae* (bacia do rio Tibagi), caracterizada por Sato *et al.* (2004). Em *T. zonatus* e *T. cf. mimonha* o maior par cromossômico é o primeiro metacêntrico, que difere em tamanho dos demais, sendo maior também que o segundo par, característica encontrada em *T. florensis* (bacia do rio Paraíba do Sul), *T. reinhardti* (bacia do rio Grande) e *T. auroguttatus* (bacia do rio Doce) (Sato *et al.*, 2004), *T. paolence* (bacia do rio Paranapanema) (Torres *et al.*, 1998), *T. spegazzini* (Nordeste da Argentina) (Gonzo *et al.*, 2000) e *Trichogenes longipinnis* (Ubatuba, SP) (Lima e Galetti Jr., 1990).

As variações de tamanho observadas entre os pares cromossômicos 1 e 2 de diferentes espécies de *Trichomycterus* podem se caracterizar como significativos marcadores para grupos de espécies diretamente relacionadas. Já polimorfismos numéricos, como os cromossomos extras relatados ocorrerem em *T. paolence* (Torres *et al.*, 2002) e *T. davisii* (Borin e Martins-Santos, 2000), não foram detectados nas espécies estudadas no presente trabalho. A variabilidade cariotípica observada entre diferentes espécies de *Trichomycterus* parece indicar que rearranjos cromossômicos estruturais tiveram um papel importante na diversidade cariotípica destas espécies e que inversões pericêntricas (além de adições e exclusões) podem ter sido os mecanismos principais responsáveis pela diferenciação cariotípica deste grupo de peixes (Borin e Martins-Santos, 2000).

Outro marcador comum das espécies de *T. iheringi*, *T. diabolus* e *T. cf. mimonha* analisadas, é a presença de RONS simples em posição intersticial dos braços longos do par cromossômico número dois (Figura 2a e 2c, quadro), característica confirmada pela marcação obtida com a sonda de DNAr 18S. Essa característica também é compartilhada com *T. aff. itatiae* (Sato *et al.*, 2004) e *Trichogenes longininnis* (Lima e Galetti Jr., 1990). Já em *T. zonatus*, a RON foi localizada no braço longo do primeiro par metacêntrico. Por outro lado, *T. reinhardti* e *T. auroguttatus* apresentam RONS em posição intersticial dos braços curtos de um par submetacêntrico. Os dados apresentados evidenciam que RONS localizadas em apenas um par cromossômico (RONS simples) constituem uma característica marcante do gênero *Trichomycterus* e as variações observadas quanto a localização cromossômica deste DNAr podem estar relacionadas a rearranjos estruturais ocorridos durante o processo de diferenciação de alguns representantes desse grupo de peixes.

O bandamento C revelou significativas diferenças quanto à quantidade e ao padrão de distribuição de heterocromatina constitutiva nas espécies analisadas, sendo que *T. iheringi* possui grande quantidade dessa porção cromatínica espalhada pelo cariótipo (Figura 2d) e *T. diabolus* possui apenas dois pares cromossômicos com pequenos blocos heterocromáticos (Figura 2b). Em *T. zonatus*, assim como nas espécies *T. davisii*, *T. stawiarski* e *Trichomycterus sp.* (Borins e Martins-Santos, 2000) também são observados grandes blocos heterocromáticos em vários pares cromossômicos (Figura 2f). E *T. cf. mimonha*, apresentou blocos reduzidos de heterocromatina, na região centromérica de todos os cromossomos (Figura 2h). Segundo Borin e Martins-Santos (2000), a ocorrência de cromossomos com grandes blocos heterocromáticos em espécies diretamente relacionadas dentro dos Trichomycteridae poderia reforçar a hipótese de monofiletismo para esta família. Nas espécies *T. iheringi*, *T. diabolus* e *T. cf. mimonha* do presente trabalho, assim como *Trichogenes longipinnis* (Lima e Galetti, 1990), *Trichomycterus paolence* (Torres, Foresti e Oliveira, 1998), *T. davisii*, *T. stawiarski* e *Trichomycterus sp* (Borin e Martins-Santos, 1999) apresentam um bloco de heterocromatina marcando a região intersticial do braço longo do primeiro par submetacêntrico. Este mesmo par cromossômico apresentou, além das marcações intersticiais, blocos em região telomérica em *T. zonatus*.

A conservação no número diplóide, da fórmula cariotípica e do padrão de distribuição das RONS entre as espécies de *Trichomycterus* analisadas neste estudo, em contraposição aos diferentes padrões de distribuição da heterocromatina, apontam que essa porção cromatínica pode estar desempenhando um papel importante no processo de diversificação destas espécies.

Experimentos de hibridação *in situ* fluorescente usando sonda para DNAr 5S revelaram a localização desta sequência gênica em cromossomos distintos em *T. iheringi* e *T. diabolus*. O DNAr 5S normalmente se localiza em cromossomos distintos do DNAr 18S em eucariotos superiores (Martins e Galetti, 1999). Esta condição possivelmente se deve ao fato de que, se localizadas em *loci* cromossômicos distintos, estas sequências poderiam evoluir independentemente. Por outro lado, deve ser considerado que estes segmentos de DNA ribossomal possuem dinâmicas funcionais diferentes e acabam por requerer distanciamento físico (Martins e Galetti, 2000). No entanto em *T. iheringi* o DNAr 5S foi localizado intersticialmente em um par metacêntrico, independente do DNAr 18S, em *T. diabolus* essas sequências gênicas foram localizadas em sintonia, estando ambas co-localizadas no par de cromossomos número 2. Já em *T. zonatus*, o 18S foi localizado na região pericêntrica do par 1, em posição terminal dos braços longos de um dos homólogos do par 18 e no par cromossômico número 24, em sintonia com o DNAr 5S, que também aparece em uma marcação individual, no par 19. Na espécie *T. cf. mimonha* o DNAr 18S foi evidenciado em posição intersticial do braço curto no par 24, enquanto o DNAr 5S apareceu nos pares 3, 18 e 25, além de marcar uma sintonia ao DNA repetitivo 18S. Os distintos padrões de heterocromatinização cromossômica observados podem ter contribuído para a ocorrência de rearranjos que determinaram a redistribuição destas sequências ribossômicas ao longo do processo de diversificação das espécies.

Embora diferentes eventos possam ter atuado no processo de diversificação cariotípica entre as espécies *T. iheringi*, *T. diabolus*, *T. zonatus* e *T. cf. mimonha*, a heterocromatina constitutiva parece exercer papel predominante no processo de diferenciação cromossômica, determinando um processo dinâmico na microestrutura dos elementos genômicos nestas espécies. Considera-se, pois, que o estudo desta porção cromatínica com o uso de técnicas moleculares poderá trazer importantes informações e possibilitar um melhor entendimento das relações evolutivas existentes nesse grupo de peixes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida Toledo LF, Foresti F, Toledo-Filho SA. Karyotypic evolution in Neotropical freshwater fish. In **Chromosome Today**. 2000a; 13: 169-182.

Almeida Toledo LF, Foresti F, Daniel MFZ, Toledo-Filho SA. Sex chromosome evolution in fish: the formation of the neo-Y chromosome in *Eigenmannia* (Gymnotiformes). **Chromosoma**. 2000b; 109: 197-200.

Almeida-Toledo LF, Foresti F. Morphologically differentiated sex chromosomes in Neotropical freshwater fish. **Genetica**. 2001; 111: 1-3.

Pansonato-Alves, JC, Paiva, LRS, Oliveira, C, Foresti, F Interspecific chromosomal divergences in the genus *Characidium* (Teleostei: Characiformes: Crenuchidae). **Neotropical Ichthyology**. 2010; 8:77-86.

Arratia G, Veloso A. Cariótipos de peces tricomictéridos (Siluriformes). **Arch Biol Med Exp**. 1980; 13:137.

Arratia G, Campos H. Karyotype of diplomystid and certain loricarioid catfishes. **International Symposium on Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. 1997; pp 53-54.

Artoni RF, Falcão JDN, Moreira-Filho O, Bertollo LAC. An uncommon condition for a sex chromosome system in Characidae fish. Distribution and differentiation of the ZZ/ZW system in *Triportheus*. **Chromosome Research**. 2001; 9: 449-456.

Artoni RF, Bertollo LAC. Evolutionary aspects of the ZZ/ZW sex chromosome system in the Characidae fish, genus *Triportheus*. A monophyletic state and NOR. **Heredity** 2002;89:15-19.

Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira-Filho O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Rev Bras Genet**. 1978; 1: 103-120.

- Bertollo LAC, Born GG, Dergam JA, Fenocchio AS, Moreira-Filho O. A biodiversity approach in the Neotropical fish *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomic considerations. **Chromosome Res.** 2000; 8: 603-613.
- Borin LA, Martins-Santos IC. Karyotype characterization of three species of the genus *Trichomycterus* (Teleostei, Siluriformes) from the Iguaçú River basin. **Genetica.** 1999; 106:215-221.
- Borin LA, Martins-Santos IC. Intra-individual numerical chromosomal polymorphism in *Trichomycterus davisi* (Siluriformes, Trichomycteridae) from the Iguaçú River basin in Brazil. **Genet Mol Biol.** 2000; 23:605-607.
- Borin LA, Martins-Santos IC, Oliveira C. A natural triploid in *Trichomycterus davisi* (Siluriformes, Trichomycteridae): mitotic and meiotic characterization by chromosome banding and synaptonemal complex analyses. **Genetica.** 2002; 115: 253–258.
- Born GG, Bertollo LAC. An XX/XY sex chromosome system in a fish species, *Hoplias malabaricus*, with a polymorphic NOR-bearing X chromosome. **Chromosome Research.** 2000; 8:111-118.
- Cole CJ, Levans CR. Chromosome preparations of amphibians and reptiles: improved technique. **Herpetol. Rev.** 1971; 3: p 102.
- Diniz D, Moreira-Filho O, Bertollo LAC. Molecular cytogenetics and characterization of a ZZ/ZW sex chromosome system in *Triportheus nematurus* (Characiformes, Characidae) **Genetica.** 2008; 133: 85-91.
- Ferraris CJ. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. **Zootaxa.** 2007; 1418: 1-628.
- Foresti F, Almeida-Toledo LF, Toledo-Filho SA. Polymorphic nature of nucleolus organizer regions in fishes. **Cytogenetics and Cell Genetics.** 1981; 31:137-144.
- Gonzo GM, Fenocchio AS, Pastori C. Chromosome characterization of *Trichomycterus spegazzini* (Siluriformes, Trichomycteridae) from three hydrographic basins of the Northwest of Argentina. **Caryologia.** 2000; 53:39-43.

- Hatanaka T, Galetti Jr. PM. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetica**. 2004; 122:239-244.
- Henning F, Trifonov V, Ferguson-Smith MA, Almeida-Toledo LF. Non-homologous sex chromosomes in two species of the genus *Eigenmannia* (Teleostei: Gymnotiformes). **Cytogenet Genome Res**. 2008; 121: 55-58.
- Howell WM, Black DA. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: A 1-step method. **Experientia**. 1980; 36: 1014-1015.
- Kao TT. Microdissection and microcloning of human chromosome 21. **Proceedings of Clinical and Biological Research**. 1990; 360: 89-104.
- Kavalco KF. **Estudos Evolutivos no gênero *Astyanax* (Pisces, Characidae)**. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo. 2008; 197p.
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**. 1964; 52: 201-220.
- Martins C, Galetti Jr. PM. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Research**. 1999; 7:363-367.
- Meltzer PS, Guan XY, Burgess A, Trent JM. Rapid generation of region specific probes by chromosome microdissection and their application. **Nature Genetics**. 1992; 1: 24-28.
- Oliveira C, Almeida-Toledo LF, Foresti F, Britski HA, Toledo-Filho SA. Chromosome formulae of Neotropical freshwater fishes. **Rev. Brasil. Genet**. 1988a; 11: 577-624.
- Oliveira C, Almeida-Toledo LF, Foresti F, Toledo-Filho SA. Supernumerary chromosomes, Robertsonian rearrangements and multiple NORs in *Corydoras aeneus* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). **Caryologia**. 1988b; 41: 227-236.
- Oliveira C, Almeida-Toledo LF, Mori L, Toledo-Filho SA. Extensive chromosomal rearrangements and nucleolar DNA content changes in the evolution of the armoured

catfishes genus *Corydoras* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). **J. Fish Biol.** 1992; 40: 419-431.

Oliveira C, Wright JM. Molecular cytogenetic analysis of heterochromatin in the chromosomes of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). **Chromosome Res.** 1998; 6: 205-11.

Oliveira C, Foresti F, Almeida-Toledo LF. Karyotypic evolution in Neotropical fishes. In: **Fish Cytogenetics**. Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG. eds. Enfield, Science Publisher, Inc. 2007; 111-164.

Phillips RB, Reed KM. Application of fluorescence in situ hybridization (FISH) techniques to fish genetics: a review. **Aquaculture.** 1996; 140: 197-216

Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proc Natl Acad Sci.** 1986; 83: 2934-2938.

de Pinna MCC. Phylogenetic relationship of Neotropical Siluriformes: Historical overview and synthesis of hypotheses. pp. 279-330. In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CA. **Phylogeny and classification of Neotropical fishes**. EDIPUCRS, Porto Alegre. 1998; 603p.

de Pinna MCC, Wosiacki, WB. Family Trichomycteridae (pencil or parasitic catfishes), pp 270-290. In Reis RE, Kullander SO, Ferraris Jr. CJ (eds.) **Checklist of the freshwater fishes of South and Central America**, Edipucrs, Porto Alegre, Brasil. 2003.

Reis RE, Kullander SO, Ferraris C. **Check List of freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: Edipucrs. 2003; 742p.

Sato LR, Oliveira C, Foresti F. Karyotype description of five species of *Trichomycterus* (Teleostei, Siluriformes, Trichomycteridae). **Genetics and Molecular Biology.** 2004. 27(1): 45-50.

Scheel JJ. **Internal Report of Danmarks Akvarium**, Charlottenlund, Denmark. 1973; 22 pp.

Singer MF. Highly repeated sequences in mammalian genomes. **Int. Rev. Cytol.** 1982; 76: 67-112.

Schweizer D. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. **Chromosoma.** 1976; 58: 307-324.

Schweizer D, Ambros P, Andrlé M. Modification of DAPI banding on human chromosomes by prestaining with a DNA-binding oligopeptide antibiotic, Distamycin A. **Experimental Cell Research.** 1978; 111: 327-332.

Sumner AT. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research.** 1972; 75: 304-306.

Torres RA, Foresti F, Oliveira C. Comparative cytogenetic studies in allopatric populations of *Trichomycterus paolence* Eigenmann, 1918 from Southeastern Brazil (Siluriformes, Trichomycteridae). **Cytologia.** 1998; 63: 107-114.

Torres RA, Foresti F, Oliveira C. Occurrence of karyotypic mosaicism in *Trichomycterus paolence* (Teleostei, Trichomycteridae). **Caryologia.** 2002; 55:283-287.

Torres RA, Oliveira, C, Foresti F. Cytotaxonomic diagnosis of *Trichomycterus diabolus* (Teleostei: Trichomycteridae) with comments about its evolutionary relationships with congeneric species. **Neotropical Ichthyology.** 2004; 2(3): 123-125.

Wosiacki VB. **Estudo das relações filogenéticas de Trichomycterinae (Teleostei, Siluriformes, Trichomycteridae) com uma proposta de classificação.** Tese de Doutorado (não publicada), Universidade de São Paulo, São Paulo. 2002; 324 p.

Wosiacki VB, Garavello JC. Five new species of *Trichomycterus* from the rio Iguaçu (rio Paraná Basin), southern Brazil (Siluriformes: Trichomycteridae). **Ichthyological Exploration of Freshwaters.** 2002; 5(1): 1-16

Wosiacki VB, de Pinna MCC. Família Trichomycteridae: Trichomycterinae In: Buckup, P.A., Menezes, N. A. e Ghazzi, M. S. (Eds.) **Catálogo das Espécies de peixes de água doce do Brasil.** Rio de Janeiro, Museu Nacional. 2007; 195 p.