INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA CONSERVAÇÃO E BIOLOGIA EVOLUTIVA – GCBEv

Evolução e diversificação cromossômica no gênero *Ancistrus* (Siluriformes, Loricariidae, Ancistrini) através da caracterização e mapeamento de DNA repetitivo

Ramon Marin Favarato

Manaus, Amazonas

Fevereiro, 2014

Ramon Marin Favarato

Evolução e diversificação cromossômica no gênero *Ancistrus* (Siluriformes, Loricariidae, Ancistrini) através da caracterização e mapeamento de DNA repetitivo

Orientadora: Dra. Daniele Aparecida Matoso

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

Manaus, Amazonas

Fevereiro, 2014

FICHA CATALOGRÁFICA

F272 Favarato, Ramon Marin

Evolução e diversificação cromossômica no gênero Ancistrus (Siluriformes, Loricariidae, Ancistrini) através da caracterização e mapeamento de DNA repetitivo / Ramon Marin Favarato. --- Manaus: [s.n.], 2014.

x, 73 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado) --- INPA, Manaus, 2014.

Orientador : Daniele Aparecida Matoso.

Área de concentração : Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

1. Evolução cariotípica. 2. Elementos transponíveis. 3. Peixe Cascudo. I.Título.

CDD 597.015

Sinopse: Espécies do gênero *Ancistrus,* conhecidos popurlamente como bodós foram estudas por meio de análises de citogenética molecular, hibridização fluorecente *in situ* (FISH) de sequências de DNA repetivo em tandem e disperso. Os resultados mostram que os sítios de DNAr e sequências repetitivas estão envolvidas na evolução da macroestrutura cariotípica do gênero. E a apesar da ocorrência de diversos sistemas de cromossomos sexuais, essas sequências não parecem desempenhar nenhum papel no surgimento e diferenciação dos mesmos.

Palavras chave: Evolução cariotípica; Fish; Elementos transponíveis; Cascudo

AGRADECIMENTOS

Primeiramente queria agradecer aos meus pais, Luzimar Marin Favarato e Antônio Augusto Favarato, por todo apoio e por depositar em mim toda confiança, porque sem eles nada disso seria possível.

A minha orientadora Prof(a). Dra. Daniela Aparecida Matoso por ter acreditado na minha capacidade e me orientado. Além da amizade e de todos os conhecimentos que tornaram possível o desenvolvimento desse trabalho.

A Prof(a). Dra. Eliana Feldberg por ter cedido toda a estrutura do Laboratório de Genética Animal (LGA), além de todo apoio e amizade ao longo desses dois anos.

A todo pessoal do LGA, Maelin da Silva, Carlos Eduardo Faresin e Silva, Lucas Barros, Eduardo Eller, Milena Ferreira dos Santos, Leandro Marajó, Leila Braga, Arlindo, Cebola, por toda a ajuda e paciência nos ensinamentos das técnicas. Além da amizade e das discussões sempre muito proveitosas e bastante divertidas.

A todos meus colegas de turma que sempre estiveram juntos nos momentos de dificuldade e principalmente de alegria que tornaram esses dois anos de mestrado muito prazerosos e divertidos.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro e concessão da bolsa de estudos.

Ao INPA e ao Programa de Pós-graduação em Genética Conservação e Biologia Evolutiva pelo suporte e auxilio no desenvolvimento deste trabalho.

Enfim, a todos que de alguma maneira contribuíram e ajudaram para a realização desse trabalho fosse possível.

Muito Obrigado!

RESUMO

A família Loricariidae está subdividida em seis subfamílias sendo elas: Lithogeneinae, Neoplecostominae, Hypoptomatinae, Loricariinae, Delturinae e Hypostominae. Dentro da subfamília Hypostominae, encontra-se o gênero *Ancistrus,* com cerca de 62 espécies. Os dados citogenéticos a cerca desse gênero mostram uma grande variação no numero diploide, variando de 2n=34 a 2n=54 cromossomos, além da ocorrência de sistemas de determinação sexual, tanto do tipo simples quanto múltiplo. Entretanto, os dados citogenéticos são basicamente relacionados à citogenética clássica. Em vista disso, o presente trabalho teve como objetivo mapear, por meio da citogenética molecular, sequências de DNA repetitivo em oito espécies do gênero *Ancistrus*, utilizando sondas de rDNA 18S e 5S, sequências teloméricas e de retrotransposons *Rex*1, *Rex*3 e *Rex*6. Os dados referentes aos rDNA revelaram uma conservação dos sítios de 18S, sempre marcando um único par cromossômico. Já, para o 5S os resultados apresentaram maiores variações, com os sítios variando de um a treze pares cromossômicos marcados, sendo ainda relatada a ocorrência de sintenia com o 18S em cinco das oito espécies. As sequências teloméricas foram visualizadas apenas na porção terminal dos cromossomos na maioria espécies, porém sequências teloméricas intersticiais (ITS) foram detectadas em *Ancistrus* sp. 3 “Barcelos” e *Ancistrus* sp. 7 “Dimona”, possivelmente ocasionados por rearranjos cromossômicos. Em relação aos retroelementos, os resultados mostraram um padrão de dispersão bastante singular para os três *Rex* analisados, com uma distribuição em clusters tanto em regiões heterocromáticas quanto eucromáticas. Não foram visualizadas marcações dos três retroelementos nos cromossomos sexuais das espécies, sugerindo que eles não estejam diretamente ligados ao processo de surgimento dos sistemas de cromossomos sexuais nas espécies analisadas. Os dados mostram uma variedade cariotípica presente no gênero *Ancistrus*, onde as sequências repetitivas estão contribuindo para toda essa diversidade genômica presente no gênero.

ABSTRACT

Loricariidae family is subdivided in six subfamilies: Lithogeneinae, Neoplecostominae, Hypoptomatinae, Loricariinae, Delturinae and Hypostominae. Within Hypostominae family, there is the Ancistrus genus with about 62 species. Cytogenetic data about this genus show a great variation in diploid number, from 2n=34 to 2n=54 chromosomes, besides the occurrence of sexual determination systems, both of simple and multiple types. However, cytogenetic data are basically related to classic cytogenetics. In views of this, the present work had as objective mapping, by molecular cytogenetics, sequences of repetitive DNA in eight species of Ancistrus genus, using 18S and 5S rDNA, telomeric sequences and Rex1, Rex3 and Rex6 retrotransposons. Data referring to rDNA reveal a conservation of the 18S sites, always marking a single chromosome pair. Yet, for the 5S, the results presented greater variations, with sites varying from one to thirteen chromosome pairs marked, being also mentioned the occurrence of synteny in five out of the eight species. The telomeric sequences were visualized only in the terminal portion of the chromosomes in the most of the species, but interstitial telomeric sequences (ITS) were detected in Ancistrus sp. 3 “Barcelos” and Ancistrus sp. 7 “Dimona”, possibly occasioned by chromosomal rearrangements. Concerning to retroelements, the results showed a very singular dispersion pattern for the three analyzed Rex, with a clusters distribution both in heterochromatic and euchromatic regions. No retroelements markings were viewed in the sexual chromosomes of any species, suggesting that they are not directly to the process of chromosome sexual systems appearance in the analyzed species. Data show great variations and karyotypic variety present in the *Ancistrus* genus, in which the repetitive sequences are contributing to all of such genomic diversity present in the genus.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 11
1.1 Aspectos gerais da bacia amazônica 11
1.2 Ordem Siluriformes 11
1.3 Família Loricariidae 12
1.4 Gênero *Ancistrus* Kner, 1854 13
1.4 Citogenética em peixes 14
1.5 DNA Repetitivo 18
2. OBJETIVO 22
2.1 Objetivo Geral 22
2.2 Objetivos Específicos 22
3. MATERIAL E MÉTODOS 23
3.1 Material 23
3.2 Métodos 25
3.2.1 Preparação das sondas de DNA hibridação fluorescente *in situ* (FISH) 25
3.2.2.1 Preparação das sondas de DNAr 18S e 5S 25
3.2.2.2 Preparação da sonda telomérica 25
3.2.2.3 Isolamento de elementos transponíveis através da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) 26
3.2.2.4 Marcação das Sondas 26
3.2.2.5 Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) 26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 28
4.1 Capítulo I 29
4.2 Capítulo II 45
5. CONCLUSÕES 58
6. REFERÊNCIAS 59

Lista de figuras

Material e Métodos

Figura 1. Espécies estudadas (Nome e valores de comprimento total). A) *Ancistrus ranunculus*, B*) Ancistrus* sp.1 “Purus”, C) *Ancistrus* sp.2 “Catalão” , D) *Ancistrus* sp.3 “Barcelos”, E) *Ancistrus* sp.4 “Vermelho”, F) *Ancistrus* sp.5 “Rio Branco”, G) *Ancistrus* sp.6 “Piagaçu”, H) Ancistrus sp.7 “Dimona”, I) Ancistrus sp.8 “Balbina”..... 25

Capitulo I

Figura 1. Cariótipos de 8 espécies de *Ancistrus* submetidas a double-FISH com sondas de rDNA 18S (vermelho) e rDNA 5S (verde) e contracoradas com DAPI. Em A, *Ancistrus* sp. 1 “Purus”; B - *Ancistrus* sp. 2 “Catalão”; C - *Ancistrus* sp. 8 “Balbina”; D - *Ancistrus* sp. 6 “Rio Branco”; E - *Ancistrus ranunculus*; F - *Ancistrus* sp. 3 “Barcelos”; G - *Ancistrus* sp. 5 “Piagaçu”..... 37

Figura 2. Cariótipo de *Ancistrus* sp.7 “Dimona” submetidas a double-FISH com sondas de rDNA 18S (vermelho) e rDNA 5S (verde) e contracoradas com DAPI. Em A, o cariótipo da fêmea e em B do macho..... 38

Figura 3. Cariótipo *Ancistrus* sp. 3 “Barcelos” submetidas a FISH com sonda teloméricas e contracoradas com DAPI. Em A fêmea e em B macho..... 38

Figura 4. Metáfases de sete espécies de *Ancistrus* submetidas a FISH com sonda teloméricas e contracoradas com DAPI. Em A, *Ancistrus* sp. 1 “Purus”; B - *Ancistrus* sp. 2 “Catalão”; C - *Ancistrus* sp. 8 “Balbina”; D - *Ancistrus* sp. 6 “Rio Branco”; E - *Ancistrus ranunculus*; F - *Ancistrus* sp. 5 “Piagaçu”; G - Fêmea *Ancistrus* sp.7 “Dimona”; H - Macho *Ancistrus* sp.7 “Dimona”..... 39

Capitulo II

Figura 1. Cariótipos de 8 espécies de *Ancistrus* evidenciando o retroelemento Rex1. Em A*, Ancistrus* sp. 1 “Purus”; B - *Ancistrus* sp. 2 “Catalão”; C - *Ancistrus* sp. 8 “Balbina”; D - *Ancistrus* sp. 6 “Rio Branco”; E - *Ancistrus ranunculus*; F - *Ancistrus* sp. 7 “Dimona” G - *Ancistrus* sp. 3 “Barcelos”; H - *Ancistrus* sp. 5 “Piagaçu”..... 54

Figura 2. Cariótipos de 8 espécies de *Ancistrus* submetidas a FISH com sondas de Rex3 e contracoradas com DAPI. Em A, *Ancistrus* sp. 1 “Purus”; B - *Ancistrus* sp. 2 “Catalão”; C - *Ancistrus* sp. 8 “Balbina”; D - *Ancistrus* sp. 6 “Rio Branco”; E -

Ancistrus ranunculus; F - *Ancistrus* sp. 7 “Dimona” G - *Ancistrus* sp. 3 “Barcelos”; H - *Ancistrus* sp. 5 “Piagaçu”..... 55

Figura 3. Cariótipos de 8 espécies de *Ancistrus* submetidas a FISH com sondas de Rex6 e contracoradas com DAPI. Em A, *Ancistrus* sp. 1 “Purus”; B - *Ancistrus* sp. 2 “Catalão”; C - *Ancistrus* sp. 8 “Balbina”; D - *Ancistrus* sp. 6 “Rio Branco”; E - *Ancistrus ranunculus*; F - *Ancistrus* sp. 7 “Dimona” G - *Ancistrus* sp. 3 “Barcelos”; H - *Ancistrus* sp. 5 “Piagaçu”..... 56

Lista de Tabelas

Introdução

Tabela 1. Informações citogenéticas sobre Ancistrini..... 16

Capitulo I

Tabela 1. Estudos relacionados ao mapeamento de sítios rDNA 5S e 18S para o gênero *Ancistrus*..... 42

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais da bacia amazônica

A bacia amazônica possui uma área de drenagem com aproximadamente 7.000.000 km² e com cerca de 23.000 km² de rios navegáveis, o que a torna o maior sistema fluvial que se conhece (Santos e Ferreira, 1999). Ela apresenta um número variado de habitats bastante heterogêneos, que são influenciados não só por sua grande extensão, mas também pelo fato da bacia amazônica ser formada por diversas outras bacias menores que possuem diferentes regimes pluviais, alternando períodos de seca e cheia, algo muito comum na região (Goulding *et al*., 2003). Essa heterogeneidade de ambientes não só da bacia amazônica, mas também de outras regiões tropicais, é um dos fatores responsáveis pela enorme variedade de peixes da região Neotropical, que varia de 6.025 a 8.000 espécies (Vari e Malabarba, 1998; Reis *et al*., 2003). A região amazônica apresenta a mais diversificada ictiofauna de água doce do mundo, que mesmo não estando totalmente conhecida abrange cerca de 54 famílias as quais não se distribuem uniformemente ao longo da bacia (Santos e Ferreira, 1999).

1.2 Ordem Siluriformes

A ordem Siluriformes está incluída na superordem Ostariophysi. Essa superordem corresponde a cerca de 25% das espécies de teleósteos e 75% da ictiofauna de água doce mundial (Fink e Fink, 1981), estando dividida em cinco ordens, totalizando 63 famílias, cerca de 1000 gêneros e aproximadamente 6500 espécies (Nelson, 2006). Os Siluriformes, que são conhecidos popularmente por cascudos, mandis e bagres, são considerados um dos maiores grupos de Teleostei e possuem cerca de 36 famílias, 478 gêneros e 3093 espécies (Ferraris, 2007). Essa ordem possui algumas características morfológicas bem distintas que permitem uma fácil identificação, como: corpo nu envolto por uma pele espessa ou coberto por placas ósseas; nadadeiras raiadas e bem separadas, sendo o primeiro raio das nadadeiras peitorais e da dorsal portador de um acúleo forte e pungente, o qual, muitas vezes produz uma toxina associada à glândula de veneno; presença de nadadeira adiposa geralmente bem desenvolvida e nadadeira caudal assumindo formatos variáveis e de um a quatro pares de barbilhões sensitivos (Britski *et al.,* 1988; Teugels, 1996). Estes peixes possuem em geral hábito noturno e crepuscular,

além de habitarem o fundo de rios e lagos, permanecendo entre troncos e rochas (Ferraris, 1998, 2007).

A grande maioria das espécies dessa ordem concentra-se principalmente nas regiões tropicais e neotropicais, América do Sul e África, e no sul e sudeste da Ásia (Burgess, 1989; Teugels, 1996; Ferraris, 1998; de Pinna, 1998; Arratia *et al.,* 2003), sendo raras as que alcançam os extremos Norte e Sul, da América do Norte e da América do Sul, respectivamente (Nelson, 2006). Segundo Reis *et a*l. (2003) os Siluriformes representam aproximadamente 1648 espécies neotropicais conhecidas, que estão distribuídas em 15 famílias, sendo que, segundo o mesmo autor devido a sua elevada diversificação e ampla distribuição, essa ordem poderia representar mais de 35% do total de espécies neotropicais.

Dentro da ordem Siluriformes temos a superfamília Loricarioidea que é o maior grupo monofilético da região neotropical (de Pinna, 1998; Britto, 2002), com um número aproximado de 1200 espécies (Ferraris, 2007). De acordo com de Pinna (1998), Nelson (2006), Armbruster (2011) Loricarioidea está divida em seis famílias: Nematogenyidae (1 espécie), Trichomycteridae (201 espécies), Callichthyidae (177 espécies), Scoloplacidae (4 espécies), Astroblepidae (54 espécies) e Loricariidae (800 espécies).

1.3 Família Loricariidae

A família Loricariidae é a maior dentre os Siluriformes, com aproximadamente 100 gêneros e 872 espécies (Eschmeyer e Fong, 2014), ocorrendo em toda a região neotropical, na América do Sul e Central (Armbruster, 2011).

Essa família caracteriza-se por apresentar o corpo totalmente recoberto por placas ósseas, dispostas em várias séries; boca situada em posição ventral e em forma de ventosa (“suckermouth”); dentes alongados e geralmente bífidos, ou em forma de colher, dispostos em uma única série em cada maxila. Possuem intestino enovelado e extremamente longo, reflexo de seus hábitos alimentares, predominantemente, detritívoros-iliófagos (Power, 1990; Ferreira *et al*., 1998). Os Loricariidae são bagres de pequeno e médio porte, com indivíduos que variam de 20 a 700 mm. Algumas espécies dessa família apresentam respiração acessória ou aérea, que é realizada pelo estômago, o que permite que esses peixes sobrevivam em ambientes com pouca disponibilidade de oxigênio, ou até mesmo fora da água por determinado período de tempo (Armbruster, 1998; Lowe-McConnell, 1999).

Devido a essa variedade de características e adaptações, os Loricariidae são capazes de habitar os mais diversos tipos de habitat que vão desde o leito dos grandes rios, áreas de várzeas e de igapós, até igarapés de terra-firme (Junk *et al*., 1983; Sabino e Zuanon, 1998; Anjos, 2005). Porém, os integrantes dessa família ocupam as regiões bentônicas, em bancos de areia e leitos rochosos, além de possuírem hábitos noturnos, sendo que durante o dia permanecem entre pedras ou troncos de árvores (Weber, 2003).

A família Loricariidae devido ao grande número de espécies e a elevada diversidade foi subdividida em subfamílias. Schaefer (1987) reconheceu seis subfamílias, sendo elas: Lithogeneinae, Neoplecostominae, Hypoptomatinae, Loricariinae, Ancistrinae e Hypostominae. Porém, Armbruster (2004), em um estudo sobre os loricariídeos com base em caracteres de osteologia, morfologia externa e anatomia do trato digestivo, apresentou uma nova hipótese com a inclusão da subfamília Ancistrinae como tribo (Ancistrini) dentro da subfamília Hypostominae. Reis *et al.* (2006) descreveram uma sexta subfamília, denominada Delturinae, com apenas dois gêneros *Delturus e Hemipsilichthys*. Armbruster (2004) dividiu a subfamília Hypostominae em cinco tribos: Corymbophanini, Rhinelepini, Hypostomini, Pterygoplichthini e Ancistrini.

A tribo Ancistrini Kner, 1853 possui divergências entre alguns autores em relação ao número de gêneros. Em geral Ancistrini não se caracteriza por caracteres únicos. Segundo Armbruster (2004) a maioria dos táxons da tribo pode ser suportada por uma sinapomorfia, que consiste na modificação do opérculo em forma de uma barra ou de uma estrutura em forma de foice.

1.4 Gênero *Ancistrus* Kner, 1854

O gênero *Ancistrus*, integrante da tribo Ancistrini, está amplamente distribuído na região Neotropical. Segundo Ferraris (2007) o gênero possui 62 espécies.

Oliveira (2006) descreve o gênero com as seguintes características: possuem o corpo largo e deprimido, cuja largura pode ser cinco a seis vezes maior que a sua altura; cabeça grande; focinho largo com borda nua (sem placas), sendo a borda nua mais estreita nas fêmeas e mais larga nos machos. Apresentam um número

variável de tentáculos cutâneos dispostos sobre o focinho, sendo pequenos nas fêmeas e maiores e bifurcados nos machos. As espécies são geralmente de pequeno porte, podendo atingir 15 cm de comprimento (Burgess, 1989). Sabaj *et al.* (1999) sugerem a hipótese de que os tentáculos cutâneos podem ser imitadores larvais. Segundo Armbruster (2011), os machos podem utilizar esses tentáculos para enganar as fêmeas levando-as a achar que eles possuem filhotes em seu ninho, isto porque os machos de *Ancistrus* protegem as crias até que absorvam o saco vitelínico, e consequentemente possuem cuidado parental significando que esse macho pode ser um bom parceiro para a reprodução.

As espécies de *Ancistrus* possuem hábitos noturnos, são territorialistas e apresentam cuidado parental, construindo ninhos e protegendo seus ovos e filhotes (Burgess, 1989).

1.4 Citogenética em peixes

Os organismos biológicos mantém uma estabilidade de seus sistemas através de alguns mecanismos, como por exemplo, a hereditariedade (Dobzhansky, 1970). Porém, essa estabilidade em alguns casos pode ser afetada por meio de alguns processos biológicos, como as mutações, que podem afetar tanto sequências gênicas, como também causar modificações cromossômicas (Futuyma, 1998), o que pode levar a variações cariotípicas nos organismos.

Os estudos citogenéticos relativos à caracterização do número de cromossomos, estudos de cariótipos, técnicas de citogenética molecular, dentre outros, em peixes têm gerado uma série de informações sobre as espécies que tem possibilitado o entendimento dos seus atuais estágios de desenvolvimento além das as relações taxonômicas, filogenéticas e evolutivas, que ocorrem entre as diversas espécies.

Atualmente os trabalhos têm se concentrado nas relações citadas acima, uma vez que os polimorfismos cromossômicos ocorrem em todas as populações naturais, tendo um caráter adaptativo que permite às populações responderem geneticamente às mudanças ambientais, de maneira mais eficiente se comparado a monomorfismos cromossômicos (Jonh e Lewis, 1979; Pazza, 2005).

Em peixes, as alterações do tipo Robertsonianas (fusões e fissões cêntricas) e os rearranjos cromossômicos do tipo inversões, deleções, duplicações e translocações são os efeitos mais comumente observados na evolução cromossômica desse grupo de vertebrados (Denton, 1973).

Trabalhos citogenéticos envolvendo diversas espécies de peixes mostraram uma ampla variação no número diploide desse grupo de vertebrados, variando de 2n=12 cromossomos em Gonostomatidae, *Gonostoma bathyphylum* (Kinkhardt *et al*., 1995) a 2n=446 cromossomos em Cyprinidae, *Diptychus dipogon* (Jianxun *et al.,* 1991). Já, para espécies pertencentes à ictiofauna neotropical, o menor número cromossômico diploide é encontrado em *Pterolebis longipinnis*, com 20 cromossomos e o maior em *Corydoras aeneus*, com 134 cromossomos (Oliveira *et al*., 2000). Até 2000, os estudos com espécies neotropicais já haviam determinado o número diploide de 921 espécies, 252 gêneros e 44 famílias (Oliveira *et al.,* 2000), sendo que esse número pode ser muito maior atualmente.

Em Loricariidae apesar de poucos estudos sobre a organização cariotípica, sabe-se que existe uma grande variação no número cromossômico, que pode variar de 2n=34 cromossomos em *Ancistrus* sp. 1 “Purus” (de Oliveira *et al*., 2009) a 2n=96 cromossomos em *Hemipsilichthys* sp. (Kavalco *et al.*, 2004). De acordo com Artoni e Bertollo (2001) o número diploide de 54 cromossomos é considerado basal para Loricariidae.

Levando em conta os estudos citogenéticos, a subfamília Hypostominae é a mais bem caracterizada e estudada dentro da família Loricariidae, variando seu número diploide de 2n=34 cromossomos em *Ancistrus* sp. 1 “Purus” (de Oliveira *et al*., 2009) a 2n=84 em *Hypostomus* sp. (Cereali *et al*., 2008). Essa subfamília apresenta uma característica bastante peculiar, onde podemos perceber uma relação inversa entre o número diploide e o número de cromossomos com dois braços, sugerindo que a evolução dentro desse grupo pode ser afetada por muitos eventos de fusão/fissão cêntrica, ocorrendo principalmente nos integrantes da tribo Hypostomini (Artoni e Bertollo, 2001).

A tribo Ancistrini ainda possui poucos estudos relativos à citogenética das espécies. Antes de 2003, existiam apenas os estudos de Artoni (1996), Lara (1998)

e Artoni e Bertollo (2001), para a tribo. Esses trabalhos consistiam em analisar basicamente o número diploide das espécies analisadas.

Dentre os 29 gêneros (Fisch-Muller, 2003) pertencentes à tribo Ancistrini, aproximadamente cerca de 9 deles possuem estudos citogenéticos, sendo eles*: Ancistrus, Baryancistrus, Hemiancistrus, Hypancistrus, Lasiancistrus, Megalancitrus, Panaque, Peckoltia e Scobinancistrus*. Na tabela são mostrados alguns desses estudos.

Nessa tribo as alterações cromossômicas, do tipo inversões pericêntricas e paracêntricas, são provavelmente os principais rearranjos cromossômicos envolvidos no processo de evolução cariotípica (Alves *et al*., 2003). Esses rearranjos mantêm o número modal das espécies estudadas em 2n=52 cromossomos, predominando os dos tipos metacêntrico e submetacêntrico. No entanto, de acordo com Lara (1998), Alves *et al*. (2003) e Souza (2003) a fusão cêntrica pode ser o mecanismo responsável pela redução do número diploide encontrado em algumas espécies desta tribo. Em relação às regiões organizadoras do nucléolo (RON), acredita-se que o caráter plesiomórfico seja RON simples localizada na região intersticial (Mariotto *et al.,* 2009).

Dentro da família Loricariidae, a tribo Ancistrini é a que possui provavelmente o maior número de espécies com sistema de cromossomos sexuais, como por exemplo*, Ancistrus* cf. *dubius* com sistema XX/XY (Mariotto e Myiazawa, 2006), *Ancistrus* n. sp 1 com sistema XX/X0 (Alves *et al*., 2006), *Ancistrus* cf. *dubius* (Mariotto *et al*., 2004) com sistema ZZ/ZW.

De Oliveira (2006), em seu estudo sobre a diversidade cariotípica em dez espécies do gênero *Ancistrus*, encontrou diversos tipos de sistemas sexuais, sendo alguns bastante complexos, como o encontrado em *Ancistrus* sp3 do tipo $Z_1Z_1Z_2Z_2/Z_1Z_2W_1W_2$ e em *Ancistrus* sp. 8 do tipo XX/XY_1Y_2. Nesse estudo ele também analisou outros aspectos da macroestrutura cariotípica, como os padrões de heterocromatina constitutiva e regiões organizadoras de nucléolo (RON), onde foi obeservado um par de cromossomos portadores de RONs e positivos para banda C, em todas as espécies, porém com uma grande variação entre as espécies analisada, e poucos cromossomos apresentaram heterocromatina constitutiva.

Tabela 1. Informações citogenéticas sobre Ancistrini.

Espécies	Local/Estado	2n	C. Sexuais	Ref.
Ancistrus cuiabae	Arrombado/MT	34		11
Ancistrus sp. “Purus”	Rio Purus/AM	34		14
Ancistrus sp. “Trombetas”	Rio Trombetas/PA	38		14
Ancistrus n. sp. 1	São Francisco/ AC	38		1
Ancistrus sp. 1 “Balbina”	Manaus/ AM	38,39	XX_1/XY_1Y_2	10
Ancistrus sp. 13	Salgadinho/MT	40		12
Ancistrus cf. *dubius*	Pantanal/MT	42		2
Ancistrus cf. *dubius*	Pantanal/MT	42	XX/XY	2
Ancistrus sp. 10	Rio Vermelho/MT	42	ZZ/ZW	12
Ancistrus sp. 11	Rio Araputanga/MT	42	XX/XY	12
Ancistrus sp. 12	Sta Cruz/MT	42		12
Ancistrus sp. “Vermelho”	Rio Demeni/AM	42		14
Ancistrus cf. *dubius*	Pantanal/MT	44	ZZ/ZW	3
Ancistrus sp.	Iguaçu/PR	48		4
Ancistrus ranunculus	Xingu/PA	48		5
Ancistrus ranunculus	Xingu/PA	48		9
Ancistrus sp. 06	Matrixã/MT	50		12
Ancistrus tombador	Rio Preto/MT	50		12
Ancistrus multispinnis	Itapocu/SC	52		1
Ancistrus n. sp. 2	Betari/SP	52		1
Ancistrus sp. “Piagaçu”	Aiapuá/AM	52	ZZ/ZW	9
Ancistrus sp. “Barcelos”	Demeni/AM	52	$Z_1Z_1Z_2Z_2/Z_1Z_2W_1W_2$	10
Ancistrus sp. “Dimona”	Rio Dimona/AM	52		14
Ancistrus sp. 04	Sepotuba/MT	52		12
Ancistrus claro	Rio Coxipó	54		12
Ancistrus sp. 01	Córrego Pipa/MT	54		12
Ancistrus sp. 03	Córrego Pari/MT	54		12

Hemiancistrus sp.	Araguaia/MT	52	6
Hemiancistrus spilomma	Araguaia/MT	52	8
Hemiancistrus spinosissimus	Araguaia/MT	52	8
Megalancistrus aculeatus	Paraná/PR	52	4
Panaque cf. *nigrolineatus*	Araguaia/MT	52	6
Baryancistrus sp. 1	Jarí/PA	52	5
Baryancistrus sp. 2	Xingu/PA	52	5
Baryancistrus sp. 3	Xingu/PA	52	5
Baryancistrus cf. *niveatus*	Xingu/PA	52	5
Parancistrus sp. 1	Xingu/PA	52	5
Peckoltia vittata	Xingu/PA	52	5
Peckoltia sp. 1	Jarí/PA	52	5
Peckoltia sp. 2	Jarí/PA	52	5
Ancistrus sp.	Angra dos Reis/RJ	52	14
Lasiancistrus cf. *schomburgkii*	Massangana/RO	54	12
Lasiancistrus sp. 1	Cachoeira/MT	54	12
Scobinancistrus pariolispos	Xingu/PA	52	13
Scobinancistrus aureatus	Xingu/PA	52	13

Fonte: Modificado de Mariotto (2008):1 Alves *et al.* (2003, 2006); 2 Mariotto *et al.* (2006); 3 Mariotto *et al*. (2004); 4 Lara (1985); 5 Souza (2003); 6 Artoni e Bertollo (2001); 7 Souza *et al.* (2004); 8 de Oliveira *et al*. (2006); 9 de Oliveira *et al.* (2007); 10 de Oliveira *et al.* (2008); 11 Mariotto *et al.* (2011); 12 Mariotto (2008); 13 Cardoso *et al.* (2013); 14 de Oliveira *et al.* (2009); 15 Reis *et al*., (2012). 2n=números diploide; C. sexuais=cromossomos sexuais; Ref=referências.

1.5 DNA Repetitivo

A maioria dos organismos possui em seu genoma múltiplas cópias de DNA, que são conhecidas como DNA repetitivo. Essas sequências compreendem uma grande parte do genoma de muitos eucariotos. Por exemplo, em cebola, essas sequências representam 95% do genoma (Flavell *et al*., 1974), em humanos 50% ou mais (*International Human Genome Sequencing Consortium*, 2001). Uma das possíveis causas da enorme variação relatada no tamanho do genoma entre os

diferentes eucariotos é frequentemente associada ao acúmulo de sequências repetidas (Kidwell, 2002).

Os DNAs repetitivos podem ser divididos em alguns grupos, que são: as sequências organizadas *in tandem (*sequências que se apresentam altamente repetidas e organizadas em cadeia) como os DNAs satélites (~100 a 300 pares de base (bp)), minissatélites (~10 a 60 pb) e microssatélites (~1 a 5 pb), as sequências dispersas como os transposons (que se transpõem através da excisão de sua sequência de DNA e inserção em outra região) e retrotransposons (inserem-se em outras regiões do genoma através da cópia de sua sequência através de um intermediário de RNA) (Charlesworth *et al*., 1994) e também temos as famílias multigênicas (Martins *et al.*, 2004).

As sequências satélites são aquelas que apresentam trechos de 100 a 300 pb repetidos *in tandem*, variando de 1.000 a 100.000 cópias desses trechos, sendo localizadas nas regiões teloméricas e pericentroméricas, constituindo um importante componente da heterocromatina (Miklos, 1985; Lohe *et al*.,1993). Os DNAs satélites foram encontrados no genoma da maioria das espécies. A primeira descrição de um DNA satélite em Actinopterygii Neotropical foi realizada por Haaf *et al*. (1993) com *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae), que é endêmica da América do Sul. Estudos em diferentes espécies de peixes teleósteos têm demonstrado que repetições de DNA satélite podem ser úteis em estudos filogenéticos (La Herrán *et al*., 2001; Saito *et al.,* 2007), para clarificar citotaxonomicamente complexos de espécies (Mantovani *et al*., 2004; Vicari *et al.,* 2008; Kantek *et al*., 2009), determinar a origem de cromossomos supranumerários (Mestriner *et al*., 2000; Jesus *et al*., 2003; Ziegler *et al*., 2003; Artoni *et al.,* 2006) e caracterizar cromossomos sexuais (Nakayama *et al.,* 1994; Matsuda *et al.,* 1997; Centofante *et al.,* 2002; Vicente *et al.,* 2003; Vicari *et al.,* 2006).

Os minissatélites são sequências mais curtas de aproximadamente 10 a 60 pb, ricos em GC (Charlesworth *et al*., 1994). Com o uso da técnica de *Southern blot* ficou evidenciado que cada indivíduo apresenta um padrão particular com relação à quantidade e comprimento das cadeias de minissatélites, isso resultou num marcador polimórfico que permite a distinção entre uma espécie e outra. Essa técnica ficou conhecida como *DNA fingerprint* (Jeffreys *et al*., 1985).

Já, os microssatélites são formados por repetições de 1 a 5 pb. A maioria dos microssatélites apresenta repetições dinucleotídicas, sendo a mais frequente o dinucleotídeo AC (Chistiakov *et al*., 2006). Eles possuem uma elevada taxa de mutação quando comparado a regiões codificantes, 10^{-2} a 10^{-6} por loco por geração (Ellegren, 2000), contra 10^{-9} (Li, 1997), respectivamente.

As famílias multigênicas são sequências repetidas compostas por DNAs codificadores, por exemplo, temos as famílias compostas de centenas ou milhares de cópias, que codificam importantes moléculas como os RNAs ribossomais (RNAr). Uma família multigênica é constituída por um conjunto de genes com acentuada similaridade estrutural, relativo ao número e organização dos pares de bases nitrogenadas, mesmo ocorrendo casos que eles apresentem diferentes funções (Martins *et al.*, 2004). Em peixes, muitos estudos estão relacionados ao DNA ribossômico (rDNA), no mapeamento e caracterização de alguns de seus genes (Centofante *et al.,* 2006; Matoso *et al*., 2011; Schneider *et al.*, 2012).

Os elementos repetitivos compreendem além destes, outras duas classes de sequências denominadas de Elementos Repetitivos de Classe I (Retrotransposons) e Elementos de Repetitivos de Classe II (Transposons). A principal diferença entre eles é o mecanismo de transposição. O primeiro grupo possui um mecanismo que funciona da seguinte forma: primeiro ocorre a transcrição completa do elemento, dando origem a uma cópia de RNA. Esta molécula codifica uma enzima, a transcriptase reversa, que a partir da molécula de RNA origina uma fita de DNA. Esse DNA então é inserido em outra região do genoma através das enzimas integrases. Esse mecanismo conhecido como “copia e cola” é o responsável pelo grande número de cópias de retroelementos presentes no genoma (Böhne *et al*., 2008). Já, nos transposons o mecanismo é baseado em cópias da própria molécula de DNA. Inicialmente ocorre a duplicação do elemento, originando novas sequências que serão inseridas em novos locais no genoma com o auxílio da transposase. Apesar das diferenças nos mecanismos de transposição, a integrase de alguns elementos de RNA e a transposase de alguns elementos de DNA provavelmente têm uma origem comum (Capy *et al*., 1997).

Esses elementos desempenham também um papel muito importante na estrutura e organização dos cromossomos podendo induzir a formação de rearranjos

cromossômicos ou em alguns casos protegendo as sequências teloméricas de perda e danos (Charlesworth *et al*., 2001).

A identificação e caracterização destes elementos transponíveis tornaram-se algo muito importante para o estudo do genoma, visto algumas de suas possíveis funções e além de ser abundante no genoma de eucariotos (Feshcotte, 2004). Cerca de 45 a 50% do genoma dos primatas é constituído por elementos transponíveis, o genoma do rato e do camundongo contem cerca de 39 a 40% e de cachorro possui 34% do seu genoma preenchido por estes elementos móveis (Böhne *et al.,* 2008), chegando em torno de 50 a 80% em milho (Feshcotte, 2004). Alguns estudos em peixes mostraram que os elementos transponíveis também estão presentes nesse grupo, no peixe medaka 7% do seu genoma é composto por elementos transponíveis (Kasahara *et al*., 2007), *Takifugu rubripes* e *Tetraodon nigroviridis,* contém cerca de 3 a 4% dos seus genomas constituídos por transposons (Aparício *et al.*, 2002, Jaillon *et al.*, 2004).

Dentre os vários retroelementos encontrados em peixes, os da família *Rex* parecem ser abundantes em diferentes Teleósteos (Volff *et al*., 1999, 2000, 2001; Böhne *et al.*, 2008). A denominação *Rex* refere-se ao fato deles terem sido inicialmente isolados de melanoma de peixes do gênero *Xiphophorus*. *Rex1, Rex3* e *Rex6* são retrotransposons que apresentam vasta distribuição e diferentes padrões de organização no genoma de várias espécies de peixes (Volff *et al.,* 1999, 2001). Alguns trabalhos, envolvendo a caracterização e mapeamento desses retroelementos em peixes neotropicais, estão sendo realizados, buscando estabelecer a relação desses retrotransposons com o genoma das espécies (Mazzuchelli e Martins, 2009; Gross *et al*., 2009; Matoso *et al*., 2011). Segundo Ferreira *et al*. (2011a) estes três retrotransposons são atualmente os elementos retrotransponíveis mais estudados em relação à sua localização cromossômica em peixes, tendo sido fisicamente mapeados em algumas espécies de diversos grupos.

Enquanto algumas sequências de DNA repetitivo possuem funções bem definidas, tais como os DNAs ribossomais, centroméricos e teloméricos, ainda não se sabe ao certo qual o papel de grande parte do DNA repetitivo, até pouco tempo considerado como “DNA lixo” (Schmidt e Heslop-Harrison, 1998) e DNA “egoísta” (Doolittle e Sapienza, 1980; Orgel e Crick, 1980). Porém, alguns estudos têm evidenciado que estas sequências são de extrema importância para a manutenção e

estrutura do genoma e que sua formação deriva de um processo contínuo e provavelmente mais antigo que a divergência das primeiras linhagens de eucariotos (Jurka *et al*., 2005). Com os avanços das pesquisas em relação a essas sequências tem sido sugerido o envolvimento delas no processo de replicação do DNA (Li *et al.,* 2002), recombinação (Biet *et al.,* 1999), expressão gênica (Liu *et al*., 2001) e diferenciação de cromossomos sexuais (Parise-Maltempi *et al.,* 2007; Pokorna *et al*., 2011), ou seja, um envolvimento de maneira direta ou indireta na organização estrutural e funcional do genoma em geral (Kazazian, 2004; Biémont e Vieira, 2006).

Desta forma os estudos dessas sequências de DNA repetitivo, que diante de todas as evidências e estudos, podem fornecer contribuições importantes acerca da evolução e diversificação desses elementos nos variados grupos de peixes, além de seus efeitos sobre o genoma desses organismos.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo mapear fisicamente em cromossomos mitóticos, sequências de DNA repetitivo em espécies do gênero *Ancistrus*, provenientes de diversos locais da bacia amazônica, a fim de inferir sobre os mecanismos de evolução relacionados à presença de elementos repetitivos em seus genomas.

2.2 Objetivos Específicos

a) Realizar o mapeamento fisico cromossômico indicando a localização dos genes de DNA repetitivo ribossomais, 18S e 5S e sequências teloméricas.

b) Mapear a localização cromossômica dos elementos retrotransponíveis *Rex1, Rex3 e Rex6,* buscando estabelecer efeitos desses elementos sobre as espécies analisadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Nesse estudo foram analisadas oito espécies do gênero *Ancistrus,* as quais foram previamente coletadas em diversos pontos ao longo da bacia amazônica para estudos realizados anteriormente e encontram-se depositadas no banco de suspensões celulares do Laboratório de Genética Animal (LGA), como relatado abaixo:

Ancistrus ranunculus : cinco exemplares (3 ♂ e 2 ♀) foram adquiridos junto a exportadores de peixes ornamentais (Turkys Aquarium), originários do rio Xingu, região de Altamira, Pará (Figura 1A);

Ancistrus sp.1 “Purus”: 12 exemplares (5 ♂ e 7 ♀) foram adquiridos junto a exportadores de peixes ornamentais (K2), originários do rio Purus na região de (Santa Maria) (Figura 1B);

Ancistrus sp.2 “Catalão”: 12 exemplares (5 ♂ e 7 ♀) foram coletados no Lago Catalão, localizado na região de confluência dos rios Solimões e Negro (S03º10’45.0”, W059º54’25.4”) (Figura 1C);

Ancistrus sp.3 “Barcelos”: 11 exemplares (7 ♂ e 4 ♀) foram coletados no rio Demeni, médio rio Negro(Figura 1D);

Ancistrus sp.5 “Rio Branco”: 12 exemplares (6 ♂ e 6 ♀) foram coletados no igarapé Macoari, afluente do rio Branco, no estado de Roraima (S01º10’30,9”, W061º51’05,3) (Figura 1F);

Ancistrus sp.6 “Piagaçu”: sete exemplares (3 ♂ e 4 ♀) foram coletados no Lago Aiapuá, localizado na margem esquerda do rio Purus, na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Piagaçú-Purus (S04º27’26”, W062º11’56”) (Figura 1G);

Ancistrus sp.7 “Dimona”: oito exemplares (6 ♂ e 2 ♀) foram coletados em um igarapé localizado a 80 km ao norte de Manaus, na Fazenda Dimona (S02º19’45,5”,W60°04’39,0”) (Figura 1H);

Ancistrus. sp.8 “Balbina”: 12 exemplares (6 ♂ e 6 ♀) foram coletados no igarapé Barretinho, município de Balbina à 180 km ao norte de Manaus, (S01º58’20”, W059º29’48”) (Figura 1I);

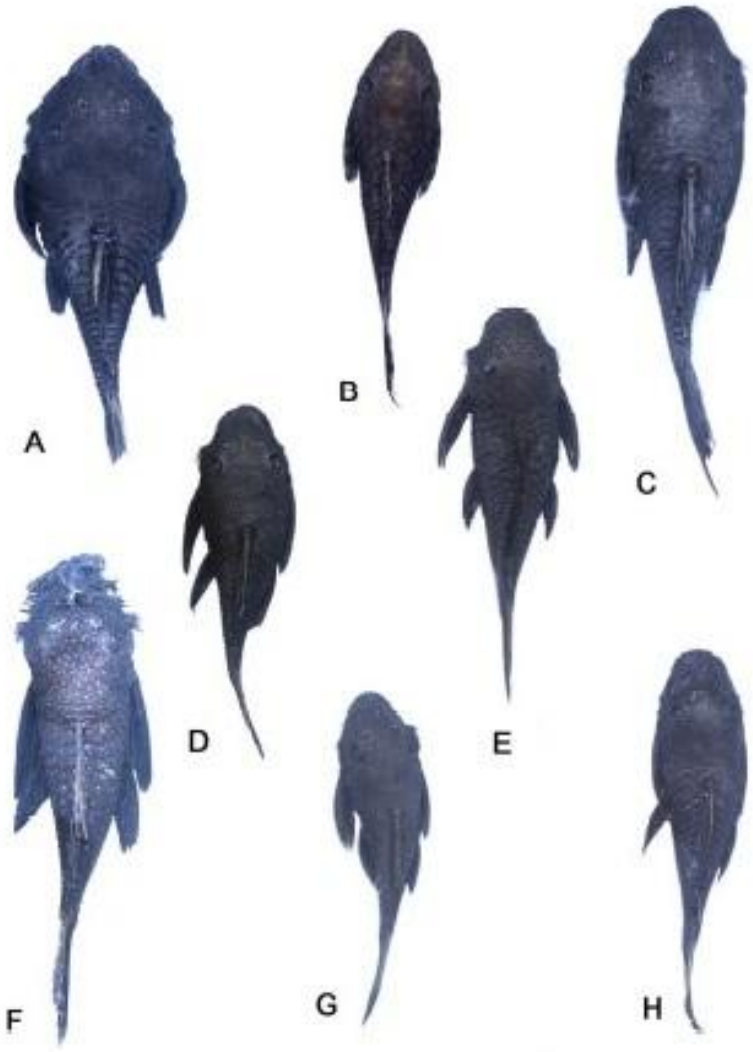

Figura 1. Espécies estudadas (Nome e valores de comprimento total). A) *Ancistrus ranunculus*, B) *Ancistrus* sp.1 “Purus”, C) *Ancistrus* sp.2 “Catalão” , D) *Ancistrus* sp.3 “Barcelos”, E) *Ancistrus* sp.8 “Balbina”, F) *Ancistrus* sp.5 “Rio Branco”, G) *Ancistrus* sp.6 “Piagaçu”, H) *Ancistrus* sp.7 “Dimona”.

3.2 Métodos

3.2.1 Preparação das sondas de DNA hibridação fluorescente *in situ* (FISH)

3.2.2.1 Preparação das sondas de DNAr 18S e 5S

O DNA genômico foi extraído a partir de tecido muscular das espécies do *Ancistrus* preservado em etanol 100% utilizando o protocolo descrito por Sambrook *et al*. (1989). Os DNAr 18S e 5S foram amplificados por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando 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) e 5Sa (5' -TAC GCC CGA TCT CGT CCG ATC) e 5Sb (5' –CAGGCT GGT ATG GCC GTA AGC- 3') (Komiya e Takemura 1979), respectivamente. As reações foram conduzidas em um volume final de 25 µl consistindo de 1 µl de DNA genômico (100 ng), 2,5 µl de tampão 10× com cloreto de magnésio (1,5 mM), 0,5 µl de Taq DNA Polimerase (5 U/µl), 1,5 µl de dNTP (1 mM), 1,5 µl de cada primer (5 mM) e água ultra pura para completar o volume. Os ciclos de amplificação seguiram as seguintes etapas: DNAr 18S: 1 minuto a 95 ºC (desnaturação); 35 ciclos de 1 minuto a 94 ºC, 1 minuto a 56 ºC (anelamento) e 1 minuto e 30 segundos a 72 ºC (amplificação) e 5 minutos a 72 ºC (extensão final). DNAr 5S: 1 minuto a 94 ºC (desnaturação); 35 ciclos de 1 minuto a 94 ºC, 1 minuto a 54 ºC (anelamento) e 1 minuto e 30 segundos a 72 ºC (amplificação) e 5 minutos a 72 ºC (extensão final).

Os produtos gerados foram checados em gel de agarose 1%.

3.2.2.2 Preparação da sonda telomérica

A sonda utilizada para detecção de sequências teloméricas foi amplificada via PCR. Foram usados primers $(TTAGGG)_5$ e $(CCCTAA)_5$ e os parâmetros para marcação foram os seguintes: 2,5 µl de tampão 10× com cloreto de magnésio (1,5 mM), 0,5 µl de Taq DNA Polimerase (5 U/µl), 1,5 µl de dNTP (1 mM), 1,5 µl de cada primer (5 mM) e água ultra pura para completar o volume para 25 µl. O programa de PCR utilizado apresentava as seguintes condições: 1 minuto a 95 ºC (desnaturação); 35 ciclos de 1 minuto a 94 ºC, 1 minuto a 50 ºC (anelamento) e 1 minuto e 30 segundos a 72 ºC (amplificação) e 5 minutos a 72 ºC (extensão final).

Os produtos gerados foram checados em gel de agarose 1%

3.2.2.3 Isolamento de elementos transponíveis através da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction)

Para a amplificação de elementos transponíveis já identificados e caracterizados como conservados em outras espécies de peixes, foram utilizados os primers: *Rex*1 (RTX1-F1 5'-TTC TCC AGT GCC TTC AAC ACC-3' e RTX1-R1 5'-TCC CTC AGC AGA AAG AGT CTG CTC-3') (Volff et al. 2000), *Rex*3 (RTX3-F3 5-CGG TGA YAA AGG GCA GCC CTG-3' e RTX3-R3 5'-TGG CAG ACN GGG GTG GTG GT-3') (Volff *et al.* 1999) e *Rex*6 (Rex6-Medf1 5`-TAA AGC ATA CAT GGA GCG CCA C-3' e Rex6-Medr1 5'-GGT CCT CTA CCA GAG GCC TGGG-3') (Volff *et al.,* 2001).

As reações foram conduzidas em um volume final de 25 µl consistindo de 1 µl de DNA genômico (100 ng), 2,5 µl de tampão 10× com cloreto de magnésio (1,5 mM), 0,5 µl de Taq DNA Polimerase (5 U/µl), 1,5 µl de dNTP (1 mM), 1,5 µl de cada primer (5 mM) e água ultra pura para completar o volume. Os ciclos de amplificação seguiram as seguintes etapas: REX 1 e 3: 5 minutos a 95 ºC (desnaturação); 35 ciclos de 1 minuto a 94 ºC, 1 minuto a 54 ºC (anelamento) e 1 minuto e 30 segundos a 72 ºC (amplificação) e 5 minutos a 72 ºC (extensão final). REX 6: 5 minutos a 94 ºC (desnaturação); 35 ciclos de 1 minuto a 94 ºC, 1 minuto a 52 ºC (anelamento) e 1 minuto e 30 segundos a 72 ºC (amplificação) e 5 minutos a 72 ºC (extensão final).

Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1%.

3.2.2.4 Marcação das Sondas

Os produtos de PCR, rDNA 18S, sequência teloméricas e os retroelementos *Rex*1, *Rex*3 e *Rex*6 foram marcados por *nick translation* com digoxigenina-11-dUTP (*Dig-Nick Translation* mix; Roche) e o 5S com biotina-14-dATP (*Biotin Nick Translation* mix; Roche), seguindo as instruções do fabricante.

3.2.2.5 Hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

A aplicação da técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) foi realizada com base em procedimentos adotados por Pinkel *et al*. (1986), com algumas modificações.

As lâminas foram lavadas em tampão PBS 1x durante 5 minutos em temperatura ambiente, sendo posteriormente desidratadas em série alcoólica 70, 85

e 100%, 5 minutos cada e secas ao ar. As lâminas foram incubadas em 90 µl de RNAse (0,4% RNAse/2xSSC) a 37 °C por 1h em câmara úmida. Transcorrido este tempo, as lâminas foram lavadas três vezes em 2xSSC por 5 minutos cada e em PBS 1x pelo mesmo tempo. As lâminas foram fixadas em formaldeídeo 1% em PBS 1x/50mM MgCl2 durante 10 minutos à temperatura ambiente e em seguida lavadas em PBS 1x por 5 minutos, sendo então desidratadas em série alcoólica gelada (70,85, 100 %) por 5 minutos cada. Simultaneamente a desidratação da lâmina em série alcoólica, a solução de hibridação contendo formamida 100% (concentração final 50%), sulfato de dextrano 50%, 20xSSC (concentração final de 2xSSC), sondas marcadas e água milli-Q foi desnaturada a 99ºC por um período de 10 minutos, sendo passada imediatamente ao gelo. O DNA cromossômico foi desnaturado com formamida 70% em 2xSSC a 70 ºC por 5 minutos e desidratado em etanol gelado 70%, 85% e 100% por 5 minutos cada, secando ao ar. A solução de hibridação foi colocada sobre a lâmina com os cromossomos desnaturados e incubada em câmara úmida a 37^{o}C por aproximadamente 18 horas. Após o tempo de hibridação, as lâminas foram lavadas em formamida 15% a 42 ^{o}C durante 10 minutos e posteriormente lavadas em solução Tween 0,5%, por 5 minutos. Para detecção do sinal as lâminas foram incubadas em tampão NFDM por 15 minutos e lavar 2 vezes com Tween 0,5% temperatura ambiente por 5 minutos cada. As lâminas foram incubadas com os anticorpos específicos (antidigoxigenina e/ou estreptavidina) por 60 minutos em câmara úmida a 37 ^{o}C. Após este tempo as lâminas foram lavadas 3 vezes com Tween 0,5% temperatura ambiente por 5 minutos cada, desidratadas em série alcoólica gelada 70, 85 e 100% durante 5 minutos cada e após secas montadas com antifade e DAPI, sendo cobertas com lamínulas.

As lâminas foram analisadas em microscópio de epifluerescência Olympus BX51 e as imagens foram capturadas com câmera digital acoplada (Olympus DP71). As metáfases foram processadas no programa Adobe Photoshop CS4 e classificadas de acordo com *Levan et al.,* 1964.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos com o mapeamento de DNA repetitivo nas espécies do gênero *Ancistrus* foram descritos e discutidos em dois capítulos, mencionados a seguir:

4.1 Artigo I - **Mapeamento cromossômico de sequências repetitivas rDNA 5S, 18S e teloméricas em espécies do gênero *Ancistrus* (Siluriformes: Loricariidae) da Bacia Amazônica.**

4.2 Artigo II **- Mapeamento cromossômico dos elementos retrotransponíveis *Rex*1, *Rex*3 e *Rex*6 em oito espécies do gênero *Ancistrus* (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae)**

4.1 Capítulo I

Mapeamento cromossômico de sequências repetitivas rDNA 5S, 18S e teloméricas em espécies do gênero *Ancistrus* (Siluriformes: Loricariidae) da Bacia Amazônica

Resumo

A família Loricariidae é a maior dentre os Siluriformes com cerca de 872 espécies, sendo ela divida em seis subfamílias: Hypoptopomatinae, Hypostominae, Lithogeneinae, Loricariinae, Delturinae e Neoplecostominae. Dentro da subfamília Hypostominae está alocada a tribo Ancistrini com 27 gêneros, dentre eles os *Ancistrus.* As espécies desse gênero são as mais derivadas dentre o restante da tribo em relação aos dados citogenéticos, com o 2n variando de 34-54 e com uma grande variação na localização dos genes de rDNA 18S e 5S. Por meio da técnica de Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH) foi possível detectar uma enorme variedade tanto em relação ao número quanto a posição desses genes ribossomais. Em todas as espécies analisadas, *Ancistrus ranunculus*, *Ancistrus* sp. 1 “Purus, *Ancistrus* sp. 2 “Catalão”, *Ancistrus* sp. 3 “Barcelos, *Ancistrus* sp. 5 “Rio Branco”, *Ancistrus* sp. 6 “Piagaçu”, *Ancistrus* sp. 7 “Dimona”, *Ancistrus* sp. 8 “Balbina”, sítios de rDNA 18S foram detectados em apenas um par cromossômico e sempre coincidindo com as marcações realizadas por impregnação por nitrato de prata, já para os sítios de 5S foram observadas marcações variadas. Em *Ancistrus* sp.3 “Barcelos” e *Ancistrus* sp.6 “Piagaçu” foram visualizadas 13 e 10 pares marcados, respectivamente, além também da presença desses sítios co-localizados com os cistons 18S em cinco das oitos espécies analisas. O mapeamentos das sequências teloméricas se mostrou conservado nas porções terminais dos cromossomos na maioria das espécies, exceto para *Ancistrus* sp.3 “Barcelos” e *Ancistrus* sp.7 “Dimona” que apresentaram ITS (Sequências Intersticias Teloméricas), sendo nesta ultima com marcação em apenas um dos homólogos do primeiro par das fêmeas. Essas variações observadas para o gênero *Ancistrus* podem ser resultado de

rearranjos cromossômicos tais como inversões e duplicações, que contribuem para a evolução cariotípica das espécies.

Introdução

A família Loricariidae é a maior dentre os Siluriformes, com aproximadamente 100 gêneros e 872 espécies (Eschmeyer e Fong, 2014), ocorrendo em toda a região neotropical, na América do Sul e Central (Armbruster, 2011). Esta família está dividida em seis subfamílias: Hypoptopomatinae, Hypostominae, Lithogeninae, Loricariinae, Neoplecostominae e Delturinae (Armbruster, 2004; Reis *et al.*, 2006). Armbruster (2004) dividiu ainda a subfamília Hypostominae em cincos tribos, Corymbophanini, Rhinelepini, Hypostomini, Ancistrini e Pterygoplichthyini.

Comparado ao elevado número de espécies de Loricariidae, os estudos em relação à citogenética dessa família ainda são incipientes, porém os trabalhos realizados têm mostrado uma grande variação no número diploide, $2n_{=}34$ cromossomos em *Ancistrus* sp 1. “Purus” (de Oliveira *et al.*, 2009) e *Ancistrus cuiabae* (Mariotto *et al.,* 2009) a 2n=96 cromossomos em *Hemipsilichthys* sp. (Kavalco *et al.,* 2004). Dentro da subfamília Hypostominae, 2n=54 cromossomos mostra-se como um número basal conservado, sendo este número considerado basal também para família (Artoni e Bertollo, 2001), contudo, para a tribo Ancistrini, 2n=52 cromossomos do tipo meta/submetacêntricos pode ser considerado uma sinapomorfia (Artoni e Bertollo, 2001; Alves *et al*., 2003). De acordo com Alves *et al.* (2003) inversões pericêntricas e paracêntricas são provavelmente os principais rearranjos cromossômicos envolvidos no processo de evolução cariotípica desta tribo, apesar desses eventos serem provavelmente os pricinpais envolvidos na evolução do grupos, rearranjos Robertsonianos também contribuíram para a diversificação cariotípica da tribo.

Apesar da grande maioria das espécies da tribo apresentar características citogenéticas conservadas, os membros do gênero *Ancistrus* parecem seguir uma evolução cariotípica diferenciada, com variação no número diploide e com diferentes sistemas de determinação sexual, simples e múltiplos (de Oliveira *et al.,* 2007; 2008; 2009; Mariotto *et al.,* 2009; Bueno *et al.,* 2012).

Em peixes, muitos estudos citogenéticos estão relacionados ao DNA ribossômico (rDNA), no mapeamento e caracterização de alguns de seus genes

(Centofante *et al.,* 2006; Matoso *et al*., 2011; Schneider *et al.,* 2012). Nos eucariotos, esses genes estão dispostos em duas classes distintas, a subunidade maior 45S formada pelos genes 18S, 5.8S e 28S, que correspondem às regiões organizadoras de nucléolos (RON), e uma subunidade menor composta pelo gene 5S (Long e Dawid, 1980; Pendás *et al.,* 1994). A detecção dessas regiões organizadoras de nucléolos por impregnação por nitrato de prata tem sido muito utilizada em análises citotaxonômicas de peixes (Galetti, 1998).

Estudos na tribo Ancistrini têm mostrado grande variação nessas regiões (Artoni e Bertollo, 2001; Alves *et al.,* 2003; Mariotto *et al.*, 2004; Souza *et al*., 2004; de Oliveira *et al.,* 2007; de Oliveira *et al.,* 2008; Mariotto *et al.*, 2009; Reis *et al.,* 2011). Porém, em relação à detecção dessas regiões utilizando a técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH), que permite o mapeamento das duas subunidades, os dados são ainda incipientes (Mariotto *et al.,* 2009; Mariotto *et al.,* 2011; Reis *et al.,* 2012; Cardoso *et al.,* 2013). Os sítios ribossomais aparentam ter uma conservação molecular entre organismos estreitamente relacionados, porém podem ser considerados marcadores espécie-específicos e serem utilizados como ferramentas úteis para estudos citotaxonômicos e evolutivos (Traldi *et al*., 2013).

Diante da evidente importância e da escassez de informação sobre a localização e distribuição cromossômica dos genes ribossomais no gênero *Ancistrus*, o objetivo do presente trabalho foi realizar o mapeamento cromossômico dos genes de DNA ribossômico 5S e 18S, bem como de sequências teloméricas em espécies desse gênero, provenientes da bacia Amazônica com o intuito de elucidar a possível dinâmica evolutiva desses genes e contribuir para o entendimento da evolução cariotípica do gênero.

Material e Métodos

Foram analisados citogeneticamente um total de setenta e nove indivíduos (machos e fêmeas), de oito espécies do gênero *Ancistrus.* As amostras foram obtidas em diversos pontos ao longo da bacia Amazônica: *Ancistrus ranunculus*: cinco exemplares (3 machos e 2 fêmeas) do rio Xingu, região de Altamira, Pará; *Ancistrus* sp.1 “Purus”: 12 exemplares (5 machos e 7 fêmeas) do rio Purus na região de Santa Maria; *Ancistrus* sp.2 “Catalão”: 12 exemplares (5 machos e 7 fêmeas)

foram coletados no Lago Catalão; *Ancistrus* sp.3 “Barcelos”: 11 exemplares (7 machos e 4 fêmeas) do rio Demeni, médio rio Negro; *Ancistrus* sp.5 “Rio Branco”: 12 exemplares (6 machos e 6 fêmeas) coletados no igarapé Macoari, afluente do rio Branco, Roraima; *Ancistrus* sp.6 “Piagaçu”: sete exemplares (3 machos e 4 fêmeas) coletados no Lago Aiapuá, na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Piagaçú-Purus; *Ancistrus* sp.7 “Dimona”: oito exemplares (6 machos e 2 fêmeas) coletados no igarapé, na Fazenda Dimona ; *Ancistrus* sp.8 “Balbina”: 12 exemplares (6 machos e 6 fêmeas) coletados no igarapé Barretinho, município de Balbina.

Os espécimes foram depositados na coleção de peixes no Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA) (25624, 25625, 25626, 25627, 25629, 25630, 25631, 25632).

Todos os espécimes analisados encontravam-se previamente coletados, com suas suspensões celulares obtidas a partir de células renais (Bertollo *et al.,* 1978). As sondas de rDNA 18S e 5S foram amplificadas por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os *primers* 18Sf (5’-CCG CTT TGG TGA CTC TTG AT-3’) e18Sr (5’-CCG AGGACC TCA CTA AAC CA-3’) (Gross *et al*. 2010) e 5Sa (5’ - TAC GCC CGA TCT CGT CCG ATC- 3’) e 5Sb (5’ –CAGGCT GGT ATG GCC GTA AGC- 3’) (Martins e Galetti, 1999), respectivamente. As reações foram conduzidas em um volume final de 25 µl consistindo de 1 µl de DNA genômico (100 ng), 2,5 µl de tampão 10X com cloreto de magnésio (1,5 mM), 0,5 µl de Taq DNA Polimerase (5 U/µl), 1,5 µl de dNTP (1 mM), 1,5 µl de cada primer (5 mM) e água ultra pura para completar o volume. Os ciclos de amplificação seguiram as seguintes etapas: DNAr 18S: 2 minuto a 95 ºC (desnaturação); 35 ciclos de 1 minuto a 94 ºC, 1 minuto a 56 ºC (anelamento) e 1 minuto e 30 segundos a 72 ºC (amplificação) e 5 minutos a 72 ºC (extensão final). DNAr 5S: 2 minuto a 94 ºC (desnaturação); 30 ciclos de 1 minuto a 94 ºC, 1 minuto a 54 ºC (anelamento) e 1 minuto e 30 segundos a 72 ºC (amplificação) e 5 minutos a 72 ºC (extensão final). A sequências teloméricas foram amplificadas também via PCR utilizando *primers* $(TTAGGG)_5$ e $(CCCTAA)_5$ (Ijdo *et al.*, 1991).

Os produtos de PCR, rDNA 18S e telomêros foram marcados por nick translation com digoxigenina-11-dUTP (*Dig-Nick Translation* mix; Roche) e o 5S com biotina-14-dATP (*Biotin Nick Translation* mix; Roche), seguindo as instruções do

fabricante. A hibridização fluorescente *in situ* (FISH) seguiu o protocolo descrito por Pinkel *et al.* (1986) com condição de estringência de 77%. Os cromossomos foram analisados em microscópio de epifluorescência Olympus BX51 e classificados de acordo com Levan *et al.* (1964).

Resultados

As espécies analisadas apresentaram uma grande variação em relação à localização e ao número dos genes ribossomais 18S e 5S. Para as sequências teloméricas, as marcações se concentraram apenas nas regiões terminais dos cromossomos, exceto para duas espécies. Todas essas variantes são apresentadas abaixo.

Ancistrus sp.1 "Purus"

Os indivíduos dessa espécie apresentam número diploide de 2n=34 cromossomos, com fórmula cariotípica de 21m+11sm+2st nos machos e 20m+12sm+2st nas fêmeas. A sequências do gene rDNA 18S foram detectadas na região distal dos braços curtos do par metacêntrico quatro, enquanto que sequências relacionadas ao gene rDNA 5S apresentaram-se localizados maiores variações, intersticialmente no braço curto dos pares 3, 5 e 13 e uma marcação pericentromérica no par 12 (Figura 1A). Sequências teloméricas foram detectadas nas porções terminais de ambos os braços de todos os cromossomos (Figura 4A).

Ancistrus sp.2 "Catalão"

Essa espécie apresenta um 2n=34 cromossomos, com fórmula cariotípica de 22m+8sm+4st para machos e fêmeas, porém evidenciando um heteromorfismo no tamanho entre os homólogos do 5° par do complemento no cariótipo masculino. As sequências do gene ribossomal 18S foram visualizadas na região distal do braço curto do par metacêntrico quatro, enquanto que sequências do 5S foram observadas nas regiões intersticiais dos pares cromossômicos 3, 6, 7 e 12 (Figura 1B). Sequências teloméricas foram detectadas nas porções terminais de ambos os braços de todos os cromossomos (Figura 4B).

Ancistrus sp. 8 "Balbina"

Em *Ancistrus* sp. 8 "Balbina" os machos apresentaram um 2n=39 cromossomos, com fórmula cariotípica com 27m+10sm+2st, enquanto nas fêmeas temos um 2n=38 cromossomos com a fórmula cariotípica apresentando 26m+10sm+2st. O mapeamento das sequências de genes de rDNA 18S e 5S nessa

espécie apresentaram marcações simples. O primeiro detectado na região terminal dos braços longos do par 12 e o segundo na região intersticial dos braços curtos do par 4 (Figura 1C). Sequências teloméricas foram detectadas nas porções terminais de ambos os braços de todos os cromossomos (Figura 4C).

***Ancistrus* sp.5 "Rio Branco"**

Os indivíduos desse grupo apresentam 2n=46 cromossomos, com uma fórmula cariotípica igual a 18m+11sm+6st+11a para machos e 18m+12sm+6st+10a para fêmeas. Essa espécie apresentou marcações simples para o mapeamento dos rDNA 18S e 5S, ambas co-localizadas no par 19, sendo que o gene 18S está localizado na região distal dos braços curtos desse cromossomo, enquanto que o 5S encontra-se logo abaixo do centrômero na região pericentromérica dos braços longos (Figura 1D). Sequências teloméricas foram detectadas nas porções terminais de ambos os braços de todos os cromossomos (Figura 4D).

Ancistrus ranunculus

Os espécimes de *Ancistrus ranunuculus* apresentam um 2n=48 com fórmula cariotípica de 20m+8sm+6st+14a nos machos e 19m+9sm+6st+14a nas fêmeas. Nessa espécie, assim como na anterior, foram observadas marcações simples para os rDNA, 18S e 5S. Esses genes encontram-se em sintenia e são localizados na região pericentromérica dos braços longos do par 16, porém existe um heteromorfismo no tamanho dos sítios rDNA 18S entre os homólogos (Figura 1E). Sequências teloméricas foram detectadas nas porções terminais de ambos os braços de todos os cromossomos (Figura 4E).

***Ancistrus* sp.3 "Barcelos"**

Nessa espécie temos um número diploide igual a 52 cromossomos com machos e fêmeas apresentando fórmulas cariotipicas divergentes sendo, 12m+12sm+4st+24a e 11m+12sm+4st+25a, respectivamente. Os espécimes desse grupo apresentaram diferenças na localização tanto de rDNA 18S e 5S, quanto das sequências teloméricas, com a detecção de sequências teloméricas intersticiais (ITS). Os sítios de rDNA 18S foram visualizados nos braços curtos do par 23, ocorrendo em sintenia com rDNA 5S. Foram ainda localizados sítios de rDNA 5S na região proximal dos braços longos do par 1, na posição intersticial dos braços curtos

e região pericentromérica nos pares 2 e 9, pericentromérica no par 8, nos braços curtos dos pares 15,16,18, 19, 22, 24 e 26, e marcações nos braços longos do par 20 (Figura 1F). Além das marcações nas porções terminais de todos os cromossomos as sequências teloméricas foram visualizadas em regiões pericentroméricas nos pares 1, 7, 8 e 12 (Figura 3).

***Ancistrus* sp.6 "Piagaçu"**

Nos indivíduos de *Ancistrus* sp. 6 "Piagaçu" temos um 2n=52 cromossomos com fórmula cariotípica de 16m+8sm+2st+26a e 16m+9sm+2st+25a, para machos e fêmeas, respectivamente. Para essa espécie o mapeamento o rDNA 18S apresentou marcação simples, nos braços curtos do par 26 (Figura 1G). Já para o 5S observou-se sítios múltiplos com marcações intersticiais e pericentromérica nos braços curtos do par 1, pericentromérica no par 5, intersticiais nos braços curtos do par 9 e ainda sete pares de acrocêntricos marcados e um sítio no par 26 em sintenia com o rDNA 18S (Figura 1G). Sequências teloméricas foram detectadas nas porções terminais de ambos os braços de todos os cromossomos (Figura 4F).

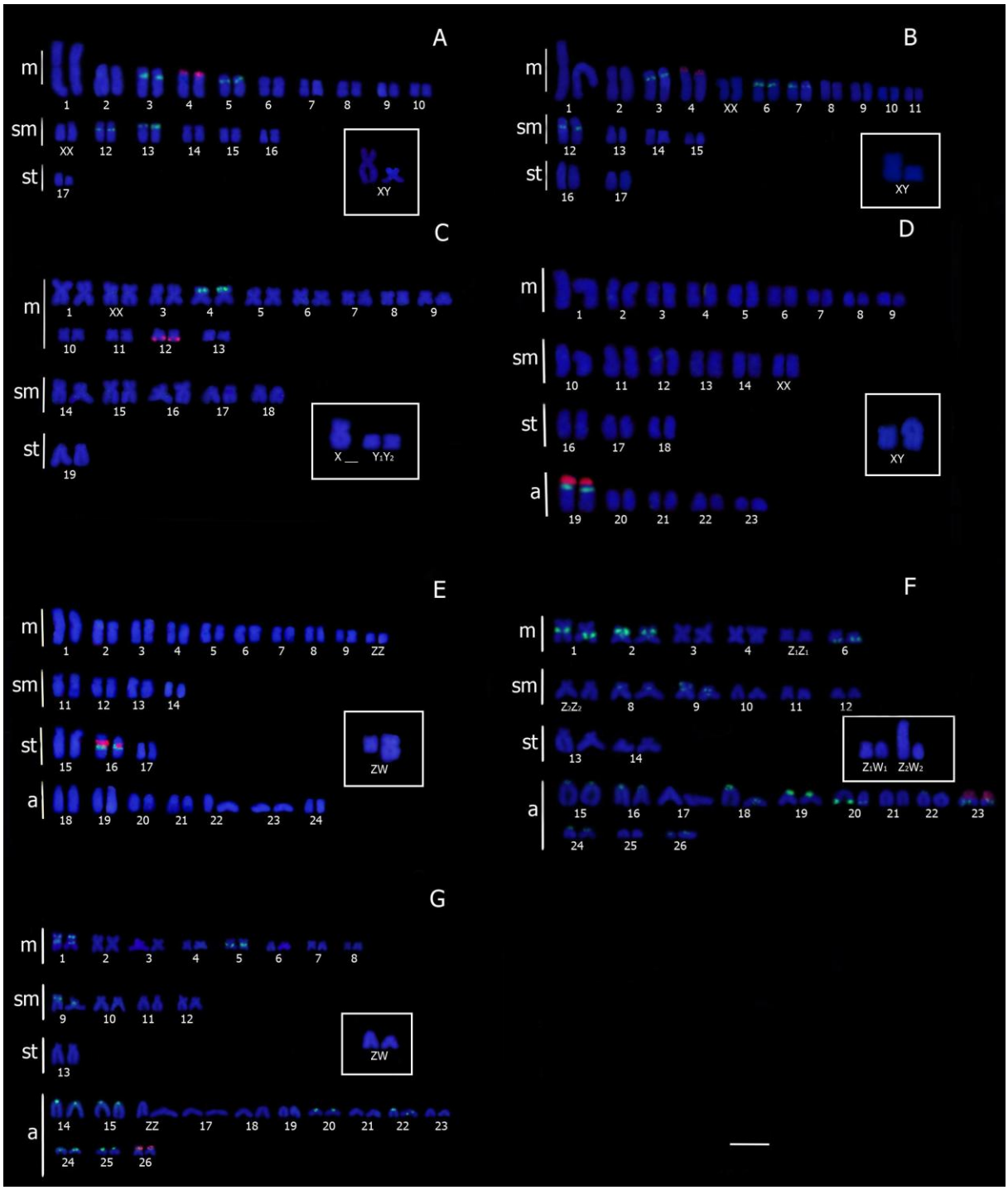

Figura 1. Cariótipos de sete espécies de *Ancistrus* submetidas a double-FISH com sondas de rDNA 18S (vermelho) e rDNA 5S (verde) e contracoradas com DAPI. Em A, *Ancistrus sp*. 1 “Purus”; B - *Ancistrus sp.* 2 “Catalão”; C - *Ancistrus* sp. 8 “Balbina”; D - *Ancistrus* sp. 5 “Rio Branco”; E - *Ancistrus ranunculus;* F - *Ancistrus* sp. 3 “Barcelos”; G - *Ancistrus* sp 6 “Piagaçu”. Barra = 10 µm.

***Ancistrus* sp.7 "Dimona"**

Nesta espécie o número diploide é de 52 cromossomos com fórmula cariotípica foi 16m+8sm+2st+26a, para machos e fêmeas. O mapeamento dos genes de rDNA apresentou diferença entre macho e fêmea. Em ambos os sexos marcações co-localizadas dos genes rDNA 18S e 5S na região intersticial do braço longo do par 13 foram visualizadas. Porém, no macho ocorrre uma marcação do 5S na região intersticial do 1º par, algo não compartilhado pela fêmea (Figura 2). A localização das sequências teloméricas também apresentou diferença entre os sexos. Nas fêmeas, além das porções terminais dos cromossomos observou-se uma marcação intersticial no primeiro cromossomo do 1° par (Figura 4G) e nos machos todas as marcações foram visualizadas nas regiões terminais dos cromossomos (Figura 4H).

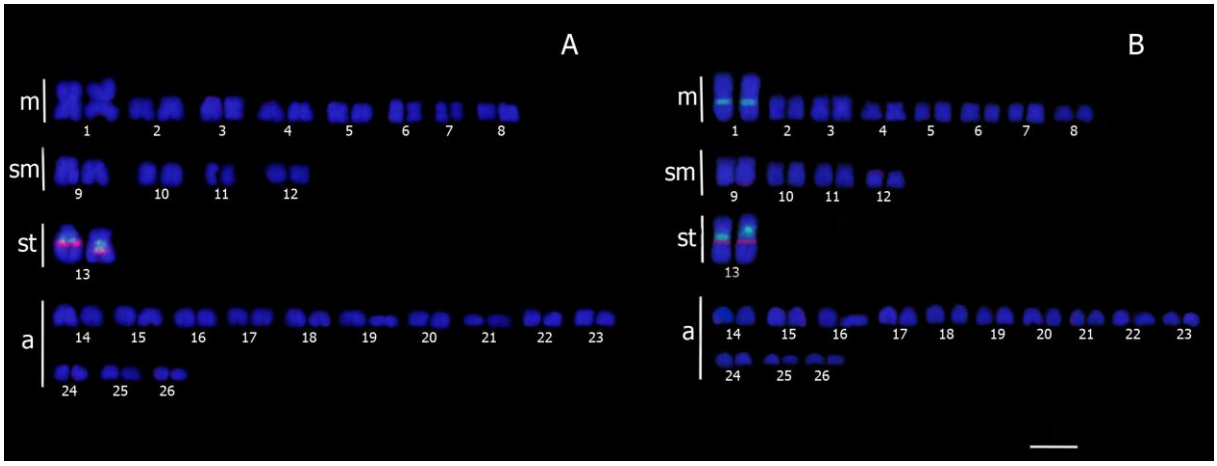

Figura 2. Cariótipo de *Ancistrus* sp.7 "Dimona" submetidas a double-FISH com sondas de rDNA 18S (vermelho) e rDNA 5S (verde) e contracoradas com DAPI. Em A, o cariótipo da fêmea e em B do macho. Barra = 10 µm.

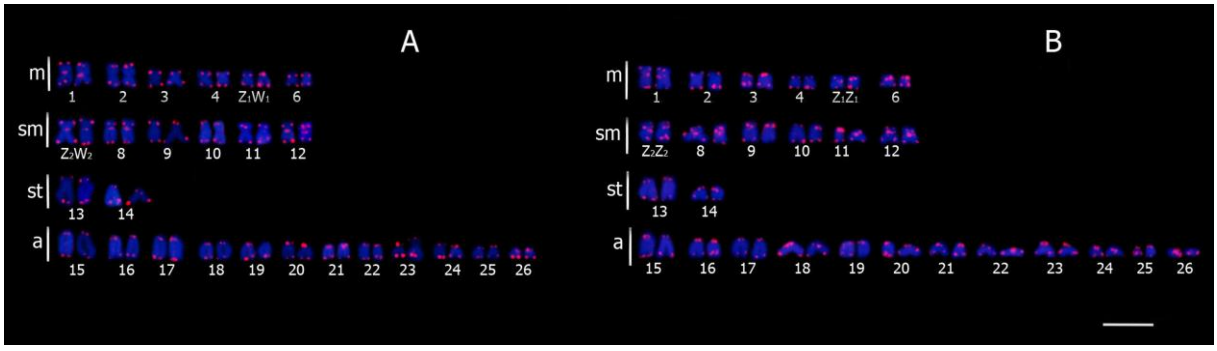

Figura 3. Cariótipo *Ancistrus* sp. 3 "Barcelos" submetidas a FISH com sonda teloméricas e contracoradas com DAPI. Em A fêmea e em B macho. Barra = 10 µm

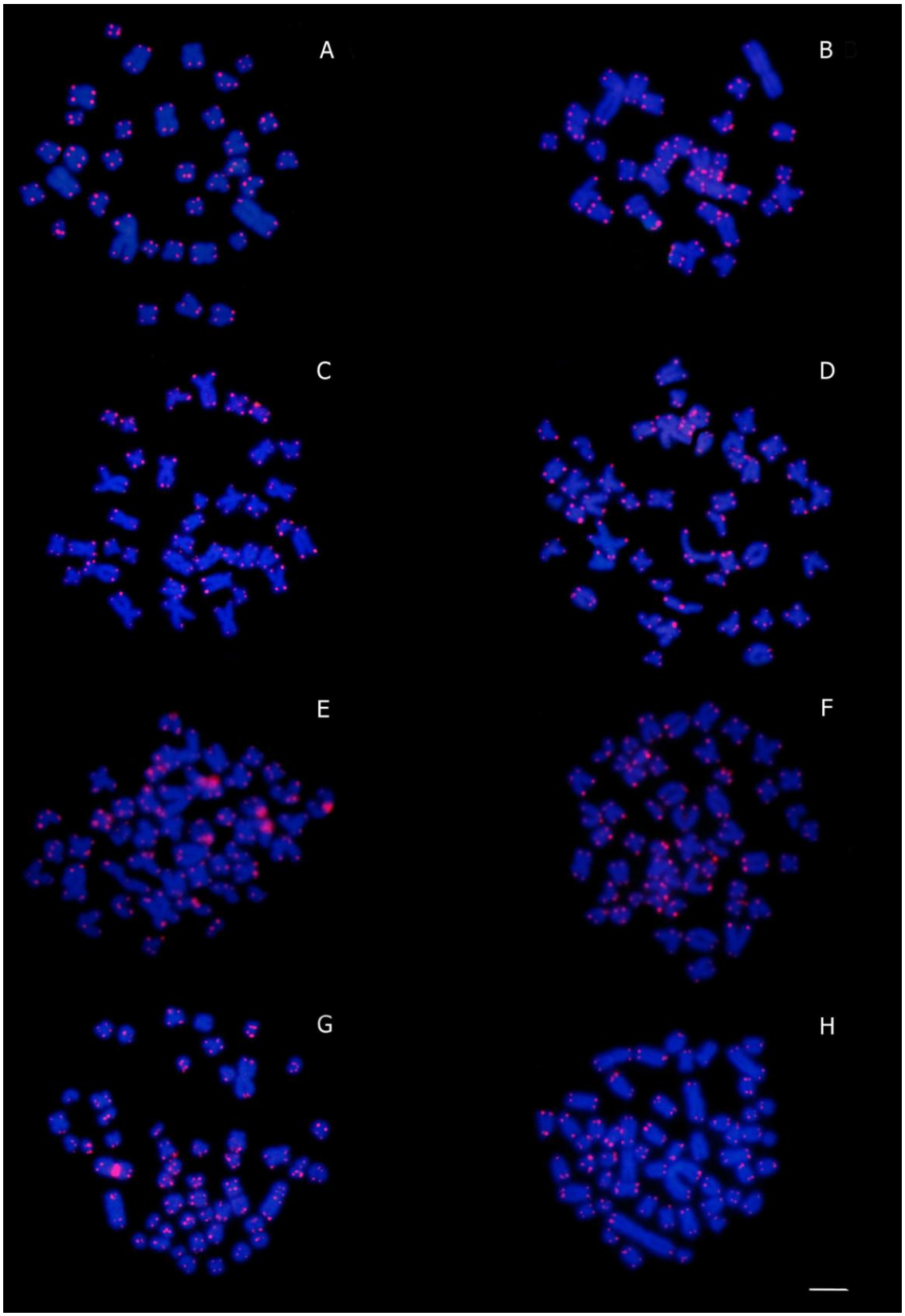

Figura 4. Metáfases de sete espécies de *Ancistrus* submetidas a FISH com sonda telomérica e contracoradas com DAPI. Em A, *Ancistrus sp*. 1 “Purus”; B - *Ancistrus sp.* 2 “Catalão”; C - *Ancistrus* sp. 8 “Balbina”; D - *Ancistrus* sp. 6 “Rio Branco”; E - *Ancistrus ranunculus;* F - *Ancistrus* sp. 5 “Piagaçu”; G - Fêmea *Ancistrus* sp.7 “Dimona”; H - Macho *Ancistrus* sp.7 “Dimona”.

Discussão

Em todas as espécies analisadas no presente trabalho sequências de rDNA 18S foram visualizas em apenas um par cromossômico, sendo coincidentes com as Ag-RONs já descritas anteriormente por de Oliveira *et al.* (2007, 2008 e 2009). Segundo Artoni e Bertollo (2001), a presença de um par portando a região organizadora de nucléolo em um local intersticial pode ser considerada a característica primitiva em Loricariidae, condição que é evidenciada pelo padrão apresentado em duas espécies deste estudo: *A*. *ranunculus* e *Ancistrus* sp.7 "Dimona", e já descrito em outros trabalhos realizados na tribo Ancistrini (Artoni e Bertollo 2001; Alves *et al* 2003; Mariotto *et al.*, 2004 ; Mariotto e Miyazawa, 2006; de Oliveira *et al.*, 2006, 2007; Mariotto *et al* 2009; Mendes Neto *et al.*, 2011; Cardoso *et al.,* 2013). Porém, seis outras espécies analisadas: *Ancistrus* sp. 1 "Purus", *Ancistrus* sp. 2 "Catalão", *Ancistrus* sp. 8 "Balbina", *Ancistrus* sp. 5 "Rio Branco", *Ancistrus* sp. 3 "Barcelos e *Ancistrus* sp. 6 "Piagaçu" apresentaram localização divergente dessa proposta como basal por Artoni e Bertollo (2001), estando o rDNA 18S situado na porção terminal dos cromossomos, algo também considerado comum entre os Loricariidae e que seria evidência da ocorrência de rearranjos cromossômicos envolvendo esses genes, como por exemplo, inversões paracêntricas (Artoni e Bertollo 2001; Alves *et al.*, 2003; 2006; Kavalco *et al.,* 2005; Mariotto *et al.,* 2011; Rubert, 2011; Reis *et al.,* 2012).

Heteromorfismo de tamanho do rDNA 18S entre os homólogos na espécie de *Ancistrus ranunculus* foi detectado. Essas sequências foram coincidentes com blocos de heterocromatina (de Oliveira *et al*., 2007). Diferenças no tamanho de regiões do DNA compostas por rDNA 45S são documentadas em peixes neotropicais, e frequentemente sugeridas como resultado de *crossing over* desigual entre os homólogos, causando o aumento de sítios deste DNA em um dos cromossomos do par (Fenocchio e Bertollo, 1992; Swarça *et al*., 2001; Vicari *et al*., 2006; Capistano *et al*., 2008; Ribeiro *et al.,* 2008, Gross *et al.,* 2010; Matoso *et al.,* 2011) e já sugerido para outros Loricariideos (Ziemniczak *et al.,* 2012). Outra hipótese é o acúmulo de sequências repetitivas *in cis* causado por erros no pareamento das unidades de repetição do DNA repetitivo (Vicari *et al.*, 2008; 2010).

Em relação ao mapeamento do rDNA 5S os resultados apresentaram variação entre as espécies tanto no número de marcações quanto na posição das

mesmas. A maioria das marcações encontram-se nas regiões intersticiais e terminais dos cromossomos adjacentes com rDNA 18S como em *Ancistrus* sp. 5 “Rio Branco”, *Ancistrus ranunculus, Ancistrus* sp. 7 “Dimona”, *Ancistrus* sp. 6 “Piagaçu” e *Ancistrus* sp. 3 “Barcelos”, concordando com estudos já realizados para o gênero (Mariotto *et al.,* 2011). Ziemniczak *et al*. (2012) a partir de suas análises com gêneros basais de Loricariidae observaram a condição de sintenia dos rDNAs 18S e 5S, e junto com os dados relatados de sintenia no grupo irmão Trichomycteridae (Primo, 2009) os autores inferem que a localização sintênica dos rDNAs é uma condição plesiomórfica para Loricariidae. Mariotto *et al.* (2011) em seu estudo relata a ocorrência de quatro espécies do gênero *Ancistrus* que apresentam sintenia nos rDNA e propõem um cariótipo ancestral para o gênero como o descrito para a espécie *Ancistrus claro.* Os dados apresentados acerca dos rDNA 18S e 5S evidenciando a ocorrência de sintenia em cinco das oito espécies (Figuras 1 e 2), sugere que essa condição possa representar uma característica ancestral para a família. Porém, rearranjos crossômicos propiciam a disjunção dos genes gerando novos sítios de rDNA 5S como os observados em *Ancistrus* sp. “Piagaçu” e *Ancistrus* sp. “Barcelos” que representariam uma situação derivada nessas espécies e outras espécies que não compartilham a sintenia (Tabela 1) característica que reflete a condição sugerida como ancestral para peixes (Martins e Galetti, 1999).

As espécies *Ancistrus* sp. 3 “Barcelos e *Ancistrus* sp. 6 “Piagaçu” apresentaram diversas marcações nas porções distais dos braços curtos dos acrocêntricos e ainda, marcações intersticiais nos braços curtos e pericentroméricas nos pares 2 e 9 na primeira espécie e no primeiro par da segunda. Este fato retrata um comportamento dinâmico dessa sequência nestas diferentes espécies, o que sugere ´pa ocorrência de inversões pericêntricas nesses cromossomos e também duplicações.

Recentemente, foi sugerido que sequências repetitivas originadas a partir de rDNA 5S e sequências teloméricas estariam participando ativamente na evolução cromossomal, moldando rearranjos Robertsonianos. Rosa *et al.* (2012) demonstraram que sequências teloméricas intersticiais (ITS) e rDNA 5S podem ser observadas em regiões de fusão cromossômica, o que implica que este DNA repetitivo e estas sequências seriam pontos de fusão cromossômica. Embora isso tenha sido relatado na espécie *Rinelocaria lima*, Loricariinae, fato semelhante ocorre na espécie *Ancistrus* sp 3 ”Barcelos”, onde sítios de rDNA 5S são encontrados nas

porções intersticiais dos cromossomos associados a regiões de ITS, como podemos observar nos pares 1 e 8. Já, para a espécie de *Ancsitrus* sp. 7 “Dimona”, o macho apresenta um sítio intersticial de 5S no primeiro par cromossômico, fenômeno que não é visualizado na fêmea. Nesta, temos uma ITS em apenas um dos homólogos no primeiro par, possivelmente o rDNA tenha sofrido uma deleção ou translocação ocasionando o reparo cromossômico com adição de novas sequências de repetição telomérica pela telomerase (Meyne *et al.*, 1990; Richards *et al.*, 1991; Slijepcevic, 1998). Ou então, devido à pequena amostragem de fêmeas, apenas duas, se tenha obtido apenas homozigotas para aquela característica, ou seja, não foi detectada nenhuma fêmea heterozigota que possuísse o mesmo sitio de 5S apresentado pelo macho.

Embora o gatilho que permite a ocorrência de rearranjos cromossômicos no gênero *Ancistrus* ainda não seja claro, parece verossímil o envolvimento das duas sequências repetitivas, rDNA 5S e ITS, associadas à dinâmica cromossômica no gênero, despertando interesse principalmente pelo surgimento e fixação de cromossomos sexuais.

Tabela 1. Estudos relacionados ao mapeamento de sítios rDNA 5S e 18S para o gênero *Ancistrus*

Espécie	2n	Cromossomos Sexuais	18S/Localização	Nº de Pares Marcados 5S	Sintenia	Ref
Ancistrus claro	54	-	21º Aq intersticial	3	Presente/A	1
*Ancistrus s*p. Dimona	52	-	13º STq intersticial	2 Machos 1 Fêmea	Presente/ST	2
Ancistrus sp. Barcelos	52	Z_1Z_1/Z_2Z_2 / Z_1W_1/Z_2W_2	23ºAp, terminal	13	Presente/A	2
Ancistrus sp. Piagaçu	52	ZZ/ZW	26ºAp, terminal	10	Presente/A	2
Ancistrus sp. 04	52	-	22º A pericentromérica	2	-	1
Ancistrus sp. 06	50	-	21ºAq terminal	1	Presente/A	1
Ancistrus ranunculus	48	ZZ/ZW	16ºSTq, intersticial	1	Presente/ST	2
Ancistrus sp. Rio Branco	46	XX/XY	19ºAp, terminal	1	Presente/A	2
Ancistrus sp. 08	44	ZZ/ZW	13ºSMp intersticial	2	Presente/SM	1
Ancistrus. cf. dubius	42	XX/XY	16ºSM pericentromérica	3	Presente/SM	1
Ancistrus sp. 13	40	-	18ºSMq terminal	2	-	1
Ancistrus sp. Balbina	38/39	XX/XY_1Y_2	12ºMq, terminal	1	-	2
Ancistrus cuiabae	34	-	2ºMp Terminal	3	-	1
Ancistrus sp. Catalão	34	XX/XY	4ºMp, terminal	4	-	2
Ancistrus sp. Purus	34	XX/XY	4ºMp, terminal	4	-	2

Fonte: 1 Mariotto *et al*. (2011); 2 Presente estudo. M=Metacêntrico; SM=Submetacêntrico; ST=Subtelocêntrico; A=Acrocêntricos; p=braço curto; q=braço longo.

Os dados apresentados mostram plasticidade cariotípica em relação aos cístrons de rDNA 18S e 5S. O rDNA 18S, dito como conservado em um único par na região intersticial, mostrou-se muito variado tanto em relação ao par cromossômico portador quanto na posição que ocupa, assim como o 5S, que apesar dos poucos estudos na tribo Ancistrini, apresentou uma distribuição bastante singular se comparado com os dados disponíveis para os integrantes da tribo. Esses dados, junto às sequências teloméricas ajudam a elucidar um pouco a dinâmica evolutiva

da tribo, bem como do gênero *Ancistrus*, para o qual é sugerido uma evolução cariotípica divergente dos demais Loricaridae. Em resumo, pelos dados observados nas espécies de *Ancistrus* aqui analisadas e aqueles retirados da literatura, as sequências de DNA repetitivo dos genes ribossomais 5S, 18S e sequências teloméricas funcionam como poderosos agentes evolutivos que direcionam e propiciam a diferenciação da macroestrutura cariotípica das espécies do gênero *Ancistrus*, o que poderia estar auxiliando nos processos de especiação à medida que funcionam como substrato para a ocorrência de rearranjos cromossômicos.

4.2 Capítulo II

Mapeamento cromossômico dos elementos retrotransponíveis *Rex*1, *Rex*3 e *Rex*6 em oito espécies do gênero *Ancistrus* (Siluriformes: Loricariidae)

Resumo

Os DNA repetitivos estão presentes no genoma de praticamente todos os organismos, sendo os elementos transponíveis (TE) um dos mais representativos. Os TEs possuem a capacidade de se mover dentro do genoma dos organismos, muitas vezes causando alterações estruturais nos cromossomos. Em peixes os TEs dos tipo non-LTR retrotransposons *Rex*1*, Rex*3 *e Rex*6, são os melhores caracterizados mostrando-se ativos durante toda a evolução desses vertebrados e amplamente distribuídos no seu genoma. No presente trabalho foi realizado mapeamento físico desses três retroelementos por meio da técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) em oito espécies do gênero *Ancistrus* sendo elas, *Ancistrus ranunculus*, *Ancistrus* sp. 1 “Purus, *Ancistrus* sp. 2 “Catalão”, *Ancistrus* sp. 3 “Barcelos, *Ancistrus* sp. 5 “Rio Branco”, *Ancistrus* sp. 6 “Piagaçu”, *Ancistrus* sp. 7 “Dimona”, *Ancistrus* sp. 8 “Balbina”,. Os resultados mostraram uma padrão de localização física cromossômica singular para os três *Rex* analisados, com uma distribuição em clusters tanto em regiões heterocromáticas quanto eucromáticas, fato que pode ser de grande importância para a evolução das espécies uma vez que esses elementos podem se transpor para regiões gênicas causando modificações nesses genes ou afetando seus níveis de expressão. Esses elementos também estão relacionados à diferenciação de sistemas cromossomos sexuais, porém nas espécies analisadas no presente estudos não foram visualizados a presenças desses retroelementos envolvidos com os cromossomos sexuais das espécies, sendo assim não indicando uma interferência destes no surgimento dos sistemas sexuais vistos no presente trabalho. Apesar de estudos já indicarem os efeitos desses retroelementos em diversos grupos, nos Loricariidae os estudos ainda são muitos escassos, sendo necessária uma ampliação dos estudos para um melhor entendimento da dinâmica e dos efeitos desses elementos no genoma desse grupo.

Introdução

As sequências de DNA repetitivo estão presentes na maioria dos organismos representando grande parte do genoma dos eucariotos, sendo consideradas como uma das possíveis causas da enorme variação relatada no tamanho do genoma entre os diferentes organismos (Kidwell, 2002).

Dentre os diversos DNAs repetitivos presentes no genoma dos eucariotos os elementos transponíveis (TEs) estão entre os mais representativos. Esses são definidos como sequências repetitivas de DNA que possuem capacidade de se mover ao longo dos cromossomos ou de se transpor entre sítios não homólogos dentro do genoma (Ferreira *et al.,* 2011a). Essa capacidade de transposição pode ocasionar mudanças estruturais nos cromossomos como duplicações e deleções, causando um polimorfismo que pode ser resultante da variação do número de cópias desses elementos nas espécies, consequentemente provocando alterações na estrutura e expressão dos genes (Capy *et al.*, 1998). De acordo com Blass *et al*. (2012), esses elementos têm o potencial de gerar biodiversidade, domesticação molecular e transições evolutivas por meio de mutações.

Os TEs podem ser divididos em duas classes, baseados na sua estrutura e no mecanismo de transposição no genoma. Os de classe I são representados pelos retrotransposons, que se transpõem utilizando a transcriptase reversa, uma enzima que pode promover a síntese de um filamento de DNA a partir de um molde de RNA (Charlesworth *et al.,* 1994). Os elementos dessa classe podem ser agrupados pela a presença ou ausência de longas repetições terminais (*Long Terminal Repeats* – LTR) (Eickbush e Malik, 2002; Curcio e Derbyshire, 2003). Essas LTR possuem domínios para a síntese de proteinases, integrases, transcriptase reversa e RNAse. Nos retrotransposons não-LTRs temos os elementos longos intercalados (*Long Interspersed Elements* – LINES), que são capazes de codificar uma transcriptase reversa e uma RNAse e os elementos curtos intercalados (*Short Interspersed Nucleotide Elements – SINES)*, que não são capazes de codificar tais enzimas, sendo provavelmente essas obtidas por meio dos LINES (Böhne *et al.* 2008). Os elementos de classe II são os transposons, cujo mecanismo é baseado em cortes e inserções de sequências da própria molécula de DNA, sem um intermediário de RNA (Charlesworth *et al.,* 1994; Böhne *et al.* 2008). Os elementos tanto da classe I

quanto da classe II são encontrados no genoma de todos os organismos (Volff *et al.,* 2003).

Durante muito tempo esses elementos foram ditos como sendo DNA “lixo”, acreditando-se que eles não desempenhavam nenhuma função no genoma dos organismos (Doolittle *et al.,* 1980). Porém, hoje se sabe que os TEs têm uma enorme importância na evolução do genoma dos eucariotos, estando envolvidos em processos de rearranjos cromossômicos (Raskina *et al.,* 2008), expressão e regulação de genes (Medstrand *et al.,* 2005; Shapiro *et al.,* 2005), replicação do DNA (Li *et al.,* 2002) e até na diferenciação de cromossomos sexuais (Harvey *et al.,* 2002; Steinemann *et al.,* 2005; Pokorna *et al*., 2011).

Os TEs estão diretamente relacionados à evolução do genoma de peixes, sendo que todos os tipos de retroelementos já descritos foram encontrados no genoma destes animais (Okada *et al.,* 1997; Poulter *et al.*, 1999; Volff *et al.*, 1999; Aparicio *et al.,* 2002). Neste grupo de vertebrados os RTEs do tipo non-LTR retrotransposons *Rex*1*, Rex*3 e *Rex*6 são os que possuem a melhor caracterização até o momento, mostrando-se ativos na evolução desse grupo e amplamente distribuídos no seu genoma (Volff *et al.* 1999; 2000; 2001).

Alguns estudos têm demonstrado uma diversidade de padrões envolvendo a distribuição e localização desses elementos. Valente *et al.* (2011) realizaram o mapeamento cromossômico dos retroelementos *Rex*1, *Rex*3 e *Rex*6 em oito espécies de ciclídeos e perceberam uma deposição desses elementos na região pericentromérica dos cromossomos. Outros trabalhos também têm mostrado a preferência desses retroelementos pelas regiões heterocromáticas (da Silva *et al.,* 2002; Fisher *et al*., 2004), ao fato que essas regiões normalmente acumulam mais mutações sem sofrerem maiores consequências.

Apesar do elevado número de espécies na família Loricariidae, cerca de 872 espécies válidas (Eschmeyer e Fong, 2014), os estudos sobre a localização e distribuição desses elementos são ainda bastante escassos. Ferreira *et al.* (2011b) realizaram um mapeamento cromossômico dos TEs *Rex*1 e *Rex*3 em três espécies pertencentes à família, onde foi observado pequenos clusters dispersos por todos os cromossomos, tanto em regiões de heterocromatina quanto de eucromatina. Dentro dessa família temos os representantes do gênero *Ancistrus,* que possuem uma grande plasticidade cariotípica, com poucas regiões heterocromáticas e com diversos sistemas de determinação sexual (de Oliveira *et al.* 2007, 2008, 2009).

Visto toda essa relação dos TEs com a evolução genômica nos eucariotos, e principalmente nos peixes o presente trabalho teve como objetivo mapear a distribuição cromossômica dos elementos retrotransponíveis *Rex*1, *Rex*3 e *Rex*6 em espécies do gênero *Ancistrus.*

Material e Métodos

Foram analisados citogeneticamente um total de setenta e nove espécimes (machos e fêmeas), de oito espécies do gênero *Ancistrus.* As amostras foram obtidas em diversos pontos ao longo da bacia Amazônica: *Ancistrus ranunculus*: cinco exemplares (3 machos e 2 fêmeas) do rio Xingu, região de Altamira, Pará; *Ancistrus* sp.1 “Purus”: 12 exemplares (5 machos e 7 fêmeas) do rio Purus na região de Santa Maria; *Ancistrus* sp.2 “Catalão”: 12 exemplares (5 machos e 7 fêmeas) foram coletados no Lago Catalão; *Ancistrus* sp.3 “Barcelos”: 11 exemplares (7 machos e 4 fêmeas) do rio Demeni, médio rio Negro; *Ancistrus* sp.5 “Rio Branco”: 12 exemplares (6 machos e 6 fêmeas) coletados no igarapé Macoari, afluente do rio Branco, Roraima; *Ancistrus* sp.6 “Piagaçu”: sete exemplares (3 machos e 4 fêmeas) coletados no Lago Aiapuá, na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Piagaçú-Purus; *Ancistrus* sp.7 “Dimona”: oito exemplares (6 machos e 2 fêmeas) coletados no igarapé, na Fazenda Dimona ; *Ancistrus* sp.8 “Balbina”: 12 exemplares (6 machos e 6 fêmeas) coletados no igarapé Barretinho, município de Balbina.

Os espécimes foram depositados na coleção de peixes no Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA) (25624, 25625, 25626, 25627, 25629, 25630, 25631, 25632, respectivamente).

Todos os espécimes analisados encontravam-se previamente coletados, com suas suspensões celulares obtidas a partir de células renais (Bertollo *et al.,* 1978) e depositadas no banco de suspensões celulares do Laboratório de Genética Animal (LGA). O DNA total foi extraído do tecido muscular utilizando o protocolo de fenol clorofórmio descrito por Sambrook *et al*. (1989) e quantificado em espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare). A reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação dos retroelementos, foi realizada utilizando os *primers* RTX1-F1 (5’-TTC TCC AGT GCC TTC AAC ACC-3’) e RTX1-R1 (5’- TCC CTC AGC AGA AAG AGT CTG CTC-3’) para amplificação do segmento que corresponde ao gene da transcriptase reversa do *Rex*1 (Volff *et al.*, 2000); os *primers* RTX3-F3 (5’-CGG TGA

YAA AGG GCA GCC CTG-3') e RTX3-R3 (5'-TGG CAG ACN GGG GTG GTG GT-3') para amplificar o retrotransposon *Rex*3 (Volff *et al.*, 1999); e os *primers Rex*6-Medf1 (5'-TAA AGC ATA CAT GGA GCG CCA C-3') e *Rex*6- Medr2 (5'-GGT CCT CTA CCA GAG GCC TGG G-3') o retrotransposon *Rex*6 (Volff *et al.*, 2001). As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25 µl contendo, 1 µl de DNA genômico (100 ng), 2,5 µl de tampão 10× com cloreto de magnésio (1,5 mM), 0,5 µl de Taq DNA Polimerase (5 U/µl), 1,5 µl de dNTP (1 mM), 1,5 µl de cada primer (5 mM) e água ultra pura para completar o volume. Os perfis das reações para o *Rex*1*, Rex*3*,* e *Rex*6 incluem os seguintes passos: 95 °C por 5 min; 35 ciclos de 95 °C por 1 min, 54 °C (*Rex*1 *e Rex*3) e 52ºC (*Rex*6), por 1min, e 72 °C por 2 min; seguidos por uma extensão final de 72 °C por 5 min. Os produtos de PCR foram checados em gel de agarose 1%, quantificados em espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare) e utilizados como sondas para a FISH.

Os produtos da PCR foram marcados por *nick translation* com digoxigenina-11-dUTP (*Dig-Nick Translation* mix; Roche) seguindo as instruções do fabricante. A hibridização fluorescente *in situ* (FISH) seguiu o protocolo descrito por Pinkel *et al.* (1986) com condição de stringencia de 77%. Os cromossomos foram analisados em microscópio de epifluorescência Olympus BX51 e classificados de acordo com Levan *et al.* (1964).

Resultados

Ancistrus sp. 1 "Purus"

Para o retroelemetos *Rex*1 tivemos 11 pares marcados, com marcações intersticiais em noves pares 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, centromérica no par 4 e na porção terminal do braço longo do par 16 (Figura 1A). Já para *Rex*3 os pares 1, 2, 4 e 8 apresentaram marcações na região do centrômero, enquanto nos pares 3 e 12 essas foram visualizadas nas regiões intersticiais dos braços curtos (Figura 2A). Em relação ao *Rex*6 todas as marcações foram em regiões centroméricas, pares 2,3,4,5, nos par 1 além da região do centrômero também foi visualizada uma marcação na porção intersticial do braço curto (Figura 3A).

***Ancistrus* sp. 2 "Catalão"**

Nessa espécie tivemos uma distribuição de *Rex*1 em regiões centroméricas nos 4 primeiros pares de metacêntricos e no segundo submetacêntrico (Figura 1B). Já para o *Rex*3 apenas uma marcação foi visualizada na região centromérica do par 12 (Figura 2B). O retroelemento *Rex*6 apresentou um padrão de distribuição disperso nos cromossomos, sendo encontrado em praticamente todo complemento cromossômico, exceto nos pares, 5, 13, 14 e 15 (Figura 3B).

***Ancistrus* sp. 8 "Balbina"**

As marcações de *Rex*1 para *A.* sp. 8 "Balbina" estão distribuídas em 8 pares cromossômicos, sendo: nas porções terminais dos braços curtos do par 4, 5 e 8, nas regiões terminais dos braços longos nos pares, 7, 10, 19. Também foram detectados sinais ao longo do par 17 e na região pericentromérica do par 16 (Figura 1C). Para *Rex*3 as marcações foram visualizadas na porção intersticial dos braços curtos dos pares 3 e 5, na região terminal dos braços curtos do par 7e nos braços longos do par 8, também em ambos braços do par 6 e na região pericentromérica do par 19 (Figura 2C). O *Rex*6 esta distribuído na porção terminal dos cromossomos, nos braços curtos dos pares 3, 6, 7, 10, nos braços longos dos pares 4, 8 e 19, além do par 19, onde temos marcações nos terminais e centromérica (Figura 3C).

***Ancistrus* sp. 5 "Rio Branco"**

Nessa espécie os três retroelementos apresentaram distribuição concentrada preferencialmente em regiões centroméricas, como observado para *Rex*1 nos pares 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11 e 13 (Figura 1D), nos pares 1, 2, 3, 4, 5, 10 e 11 de *Rex*3 (Figura 2D) e no *Rex*6 os pares 4, 5, 10 e 13 (Figura 3D). Também tivemos marcações terminais no primeiro par metacêntrico e intersticiais no par 21 de *Rex* 1 e intersticiais nos braços longos do par 11 de *Rex* 6.

Ancistrus ranunculus

Diferentemente da espécie anterior em *A. ranunculus* as marcações de *Rex* se concentram nas porções terminais da maioria dos cromossomos do complemento. Para *Rex*1 as marcações foram visualizadas nos braços curtos dos pares 2, 4, 7, 11, 13 e 22 e nos braços longos dos pares 19 e 21, em ambos os

braços do par 23, além da região intersticial dos braços longos do par 16 (Figura 1E). O *Rex*3 também teve de predominância de marcações nas regiões terminais dos cromossomos, sendos nos pares 2, 3, 18, 19 e 23 mais a região centromérica dos pares 4 e 11 (Figura 2E). O *Rex*6 além das porções finais dos pares 5, 12, 20, 21, 23 e 24, foram observadas marcações intersticiais nos pares 16, 17, 18 e 19 (Figura 3E).

***Ancistrus* sp. 7 "Dimona"**

Em *A*. sp 7 "Dimona" tivemos marcações em regiões de centrômero para os três retroelementos sendo, no par 3 em *Rex*1, 2 em *Rex*3 e 5 em *Rex*6. O restante das detecções foram nas porções finais dos braços longos dos cromossomos, em *Rex*1 nos pares 9, 11, 12, 17, 20 e 22, *Rex3* nos pares 8, 9, 11, 15, 21 e 25 e no 12, 18, 19 e 21 em *Rex6* (Figuras 1F, 2F e 3F)

***Ancistrus* sp. 3 "Barcelos"**

Assim como na espécie anterior em *Ancistrus* sp. 3 "Barcelos" as marcações se concentraram em maioria nas regiões terminais dos cromossomos como mostrado: *Rex*1, pares 1, 2, 3, 8, 10, 11, 12, 19, 24, 25, 26 (Figura 1G).

*Rex*3 pares 1, 2, 3, 8, 10, 11 (Figura 2G).

*Rex*6 pares 1, 2, 3, 9, 11, 12, 21, 22, 25,26 (Figura 3G).

Além de marcações intersticiais de Rex 3 nos pares 10, 23 e 24, e também um acúmulo de Rex3 e 6 na região pericentromérica do par 15 (Figuras 2G e 3G).

***Ancistrus* sp. 6 "Piagaçu"**

Nessa espécie os três retroelementos, *Rex*1, 3 e 6, encontram-se preferencialmente nas porções finais dos cromossomos. No primeiro, temos marcações nos pares 1, 4, 5, 10, 12, 15, 23, 25 e 26 (Figura 1H). Para o *Rex*3 temos os pares, 1, 3, 6, 15, 20 e 26 (Figura 2H). E para o *Rex*6 temos o par, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 11, 12, 15, 20, 24 e 26 (Figura 3H).

Em nenhuma das oito espécies analisadas foi verificada a ocorrência dos elementos retrotransponíveis *Rex*1, 3 e 6 relacionados aos cromossomos sexuais (Figuras 1, 2 e 3)

.

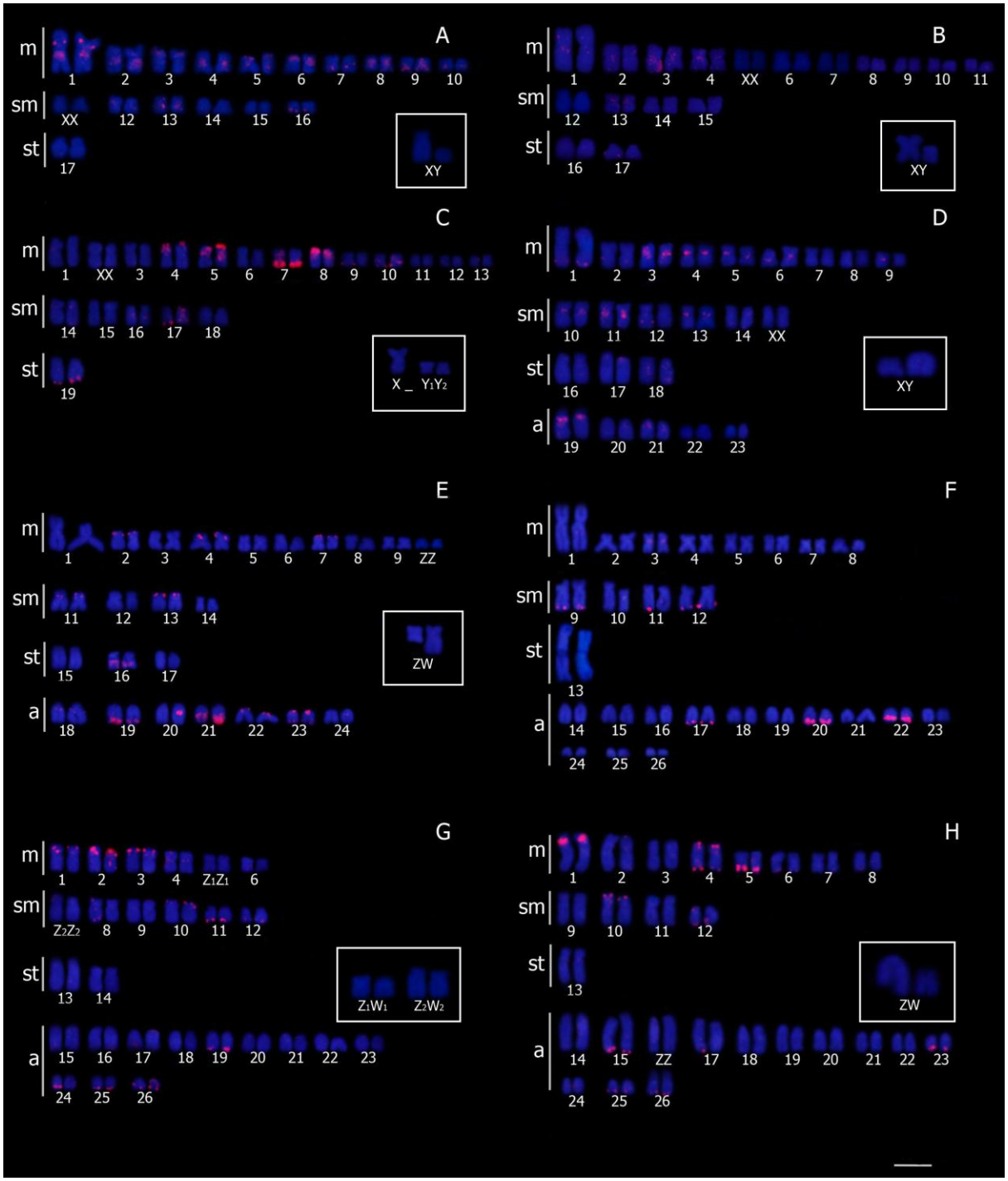

Figura 1. Cariótipos de 8 espécies de *Ancistrus* evidenciando o retroelemento *Rex*1. Em A, *Ancistrus sp*. 1 “Purus”; B - *Ancistrus sp.* 2 “Catalão”; C - *Ancistrus* sp. 8 “Balbina”; D - *Ancistrus* sp. 6 “Rio Branco”; E - *Ancistrus ranunculus;* F - *Ancistrus* sp. 7 “Dimona” G - *Ancistrus* sp. 3 “Barcelos”; H - *Ancistrus* sp. 5 “Piagaçu”. Barra = 10 µm.

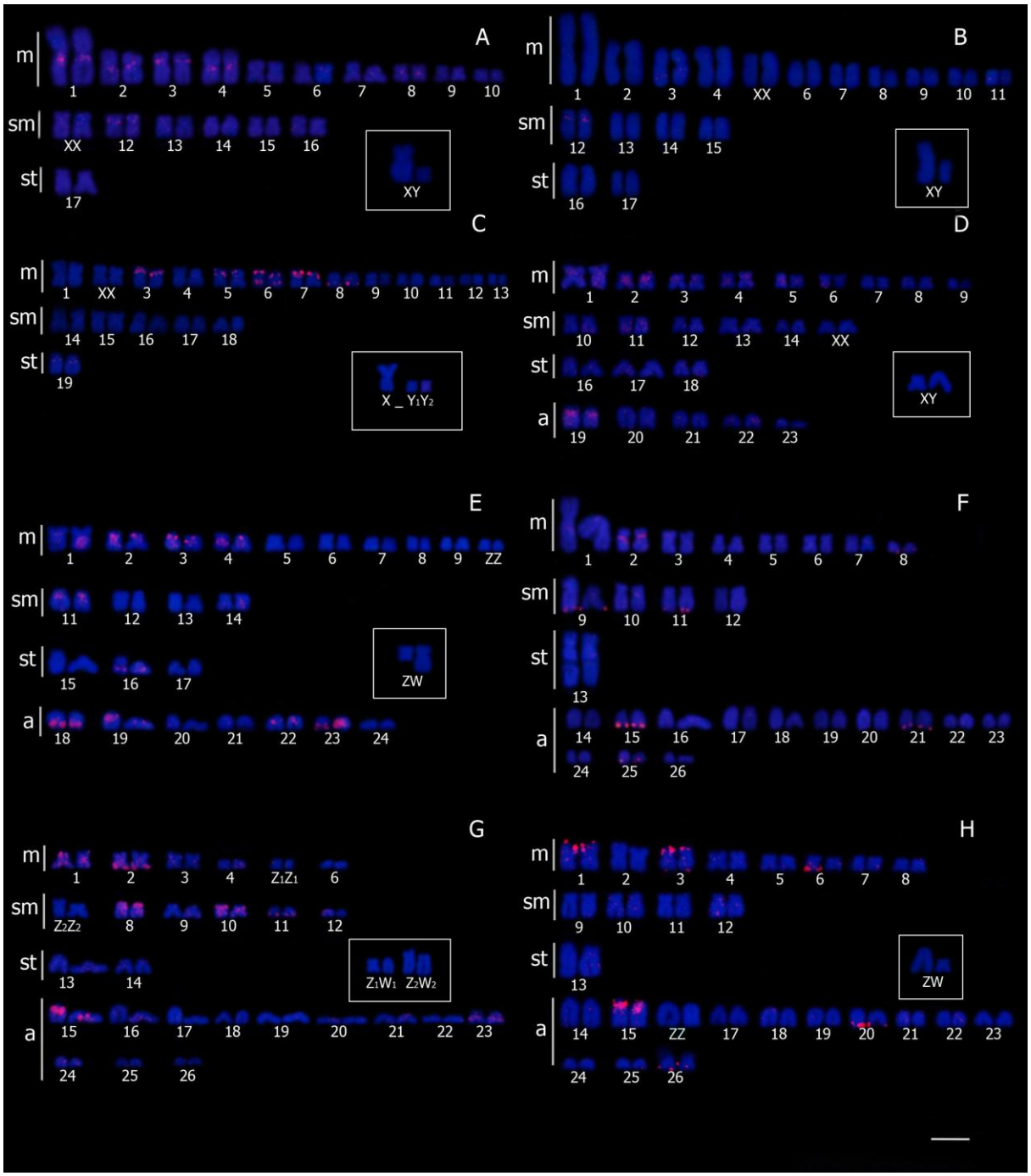

Figura 2. Cariótipos de 8 espécies de *Ancistrus* submetidas a FISH com sondas de *Rex*3 e contracoradas com DAPI. Em A, *Ancistrus sp*. 1 “Purus”; B - *Ancistrus sp.* 2 “Catalão”; C - *Ancistrus* sp. 8 “Balbina”; D - *Ancistrus* sp. 6 “Rio Branco”; E - *Ancistrus ranunculus;* F - *Ancistrus* sp. 7 “Dimona” G - *Ancistrus* sp. 3 “Barcelos”; H - *Ancistrus* sp. 5 “Piagaçu”. Barra = 10 µm.

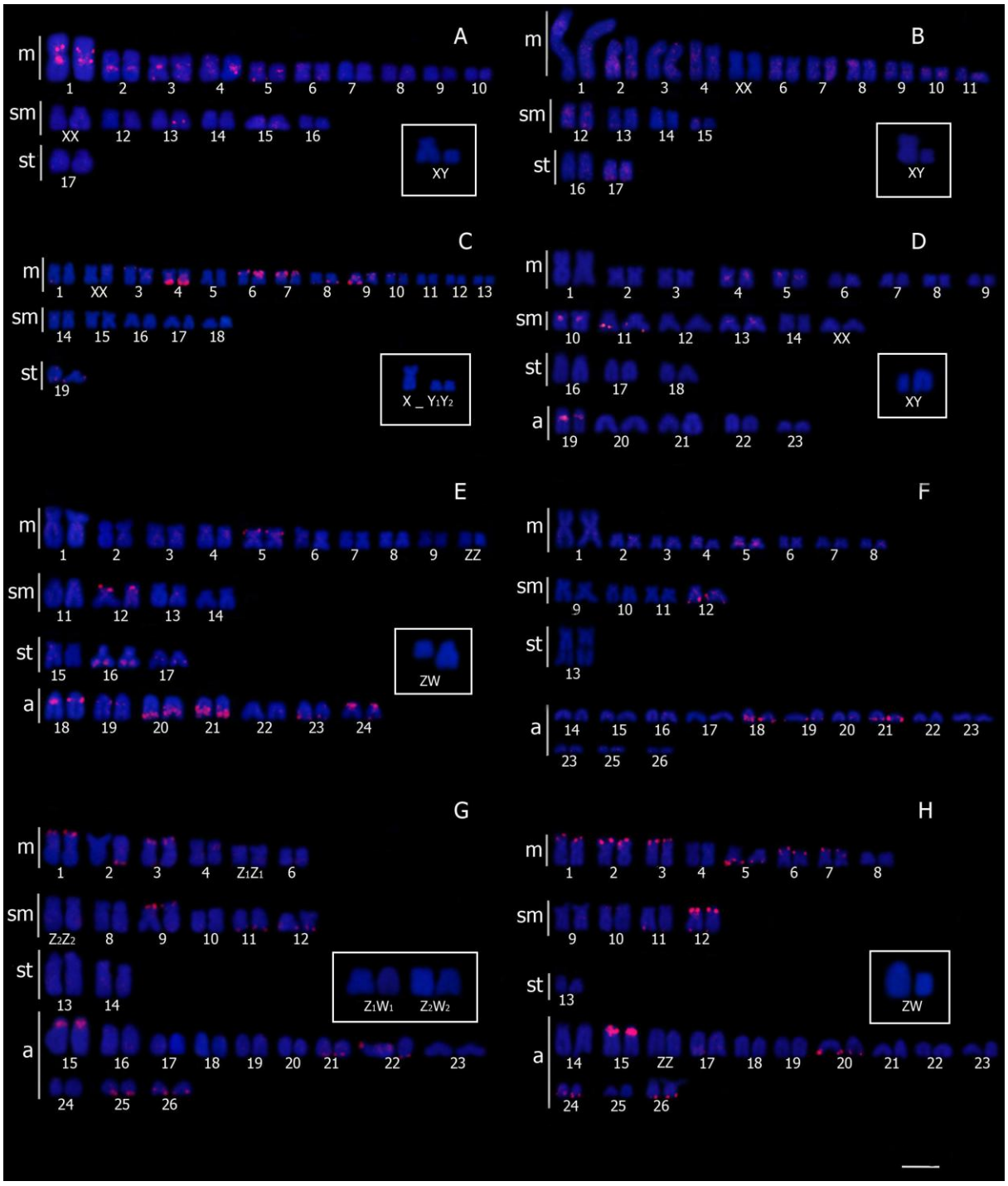

Figura 3. Cariótipos de 8 espécies de *Ancistrus* submetidas a FISH com sondas de *Rex*6 e contracoradas com DAPI. Em A, *Ancistrus sp*. 1 “Purus”; B - *Ancistrus sp.* 2 “Catalão”; C - *Ancistrus* sp. 8 “Balbina”; D - *Ancistrus* sp. 6 “Rio Branco”; E - *Ancistrus ranunculus;* F - *Ancistrus* sp. 7 “Dimona” G - *Ancistrus* sp. 3 “Barcelos”; H - *Ancistrus* sp. 5 “Piagaçu”. Barra = 10 µm.

Discussão

O mapeamento físico por meio da hibridização fluorescente *in situ* (FISH) dos non-LTR retrotransposons *Rex*1, *Rex*3 e *Rex*6 têm mostrado padrões diferentes de

organização desses retroelementos (RTEs), sendo encontrados preferencialmente em regiões de heterocromatina ou então dispersos por todo o genoma (Ferreira *et al.,* 2011a). No presente estudo os três retrotransposons *Rex* mapeados mostraram-se dispostos em clusters, principalmente alocados nas porções finais e pericentroméricas dos cromossomos na maioria das espécies (Figura 1, 2 e 3).

Diversos trabalhos têm mostrado um acúmulo preferencial dessas sequências em regiões heterocromáticas em diversos grupos (da Silva *et al*., 2002; Bouneau *et al*., 2003; Fisher *et al*., 2004; Ozouf-Costaz *et al*., 2004; Gross *et al*., 2009; Valente *et al*., 2011; Voltolin *et al*., 2013). No presente trabalho os RTEs foram visualizados não só em regiões heterocromáticas, como também em regiões eucromáticas (de Oliveira, 2006; de Oliveira *et al*., 2007, 2008, 2009).

Algumas espécies mostraram associação dos elementos retrotransponiveis com regiões de heterocromatina. Em *Ancistrus* sp. 1 “Purus” essa associação pode ser vista no 1º e 2º par metacêntrico, com o *Rex*1, 3 e 6 ocupando a região centromérica heterocromática (Oliveira *et al*., 2009). Também pode-se obeservar a associação de *Rex*3 com regiões heterocromáticas nos pares 3, 8 e 12. Nos indivíduos de *Ancistrus* sp. 6 “Piagaçu” no 1º metacêntrico temos uma região heterocromática na porção terminal do braço curto (Oliveira *et al*., 2007) onde notamos um acúmulo dos três retroelementos nessa região. Apesar de um grande número de sítios de elementos retrotransponiveis estarem em regiões eucromáticas nas oito espécies do gêneros *Ancitrus*, algumas espécies mostraram regiões heterocromáticas que servem como deposito desses retroelementos.

Ferreira *et al*., (2011b) mapeando os elementos *Rex*1 e *Rex*3 em espécies da subfamília Hypoptopomatinae observaram uma localização similar desses RTEs em regiões de heterocromatina se estendendo até regiões de eucromatina. Essa distribuição foi também visualizada em outras espécies da família Loricariidae (Blanco, 2012; Traldi, 2012), sugerindo que essa pode ser uma característica padrão para a família. A localização desses elementos em regiões eucromáticas pode ser de grande importância para a evolução genômica das espécies de *Ancistrus*, pois ao se inserirem em regiões eucromáticas, ricas em genes, esses elementos podem gerar mutações, alterar níveis de expressão gênica, alterar padrões de recombinação do DNA e interferir em toda a organização da arquitetura genômica

(Kidwell e Lisch, 1997, 2000; Le Rouzic e Capy, 2005). Apesar da semelhança em relação à localização dessas sequências, a distribuição dos RTEs nas espécies do gênero *Ancistrus* diferiu do padrão observado para família, o qual é caracterizado como disperso por praticamente todos os cromossomos. Nas espécies de *Ancistrus* aqui analisadas esses elementos se distribuíram em agrupamentos (clusters) em alguns pares do complemento (Figura 1, 2 e 3).

Alguns estudos têm mostrado que elementos transponíveis estão envolvidos nos processos de diferenciação de sistemas sexuais (Harvey *et al*., 2002: Steinemann *et al*., 2005). Apesar de sete, das oito, espécies do presente estudo apresentarem sistemas de cromossomos sexuais, tanto do tipo simples como do múltiplo, aparentemente não foi observada nenhuma relação dos elementos *Rex*1, *Rex*3 e *Rex*6 no surgimento e diferenciação desses sistemas de determinação sexual, uma vez que não foram observados sítios mapeados nos pares sexuais. Ozouf-Costaz *et al*. (2004), em estudos com *Chionodraco hamatus* demonstraram o envolvimento dos TEs, retrotransposons *Rex*3 e o transposons Tc1-like, na estruturação dos cromossomos sexuais da espécie. Para a família Loricariidae, Blanco (2012) sugere que uma deposição dos retroelementos *Rex*1, *Rex*3 e *Rex*6, na região pericentromérica do cromossomo X de *Harttia carvalhoi* pode ter influenciado na fissão que culminou na formação dos cromossomos Y_1 e Y_2.

Os RTEs vêm sendo relatados como sendo co-localizados com genes ribossomais em vários grupos (Einckbush, 2002). Zhang *et al*. (2008) supõem que ocorra um nicho especializado característico dos genes ribossomais que permite que uma série de elementos móveis sobrevivam. Estes por sua vez podem influenciar na regulação da síntese de rRNA, devido a possibilidade de eventos de recombinação, ou também, simplesmente pelo sucesso do papel parasitário que possuem (Einckbush e Einckbush, 2007). Para as espécies do gênero *Ancistrus* não foi observado deposição dos retroelementos *Rex* nos sítios de rDNA 45S, apesar de em *Ancistrus* sp 5 “Rio Branco” e *A. ranunculus* ser notada a presença dos *Rex*1, *Rex*3 e *Rex*6 flanqueando as regiões do rDNA 18S e possivelmente co-localizados com sítios de rDNA menor 5S. Em relação ao rDNA 5S a disposição dos RTEs também demonstra que esses não estão influenciando na distribuição dos sítios de 5S nas espécies do gênero.

Apesar dos estudos incipientes, os resultados até agora tem mostrado um padrão de organização claramente diferenciado dos elementos transponíveis no genoma de peixes. Nos ciclídeos o mapeamento dos RTEs tem mostrado que esses se encontram alocados preferencialmente em regiões de heterocromatina, ocupando posições centromérica e teloméricas na maioria dos cromossomos (Gross *et al*., 2009; Mazzuchelli e Martins 2009; Valente e*t al.*, 2011). Nos Siluriformes destaca-se o padrão disperso desses elementos como o observado em *Harttia* (Blanco, 2012) e em espécies de Hypoptopomatinae, porém com pequenos blocos distribuídos por todos os cromossomos (Ferreira *et al.,* 2011b).

Em resumo, comparando os dados obtidos no presente trabalho com os demais para a família Loricariidae, o gênero *Ancistrus* é o que apresenta a menor quantidade de retroelementos *Rex*1, *Rex*3 e *Rex*6 distribuídos em seu genoma. Além disso, o padrão de distribuição desses elementos dispostos em clusters, principalmente nas porções terminais dos cromossomos também é diferenciado. Apesar das importantes funções dos elementos transponíveis para as espécies de vertebrados, as informações a respeito de sua dinâmica evolutiva e sua ação sobre a evolução e diferenciação do genoma dos peixes ainda são escassos. Uma ampliação dos estudos dentro de uma abordagem integrativa faz-se necessária e premente para a melhor compreensão de questões relevantes de sua biologia evolutiva.

5. CONCLUSÕES

- Inversões paracêntricas e pericêntricas estão envolvidas na evolução do sítio ribossomal 5S, como mostrado em *Ancistrus* sp. 3 “Barcelos” e *Ancistrus* sp. 6 “Piagaçu”.

- Dados apresentados corroboram a evidência da condição de sintenia dos sítios de 5S e 18S como sendo plesiomórfica para a família Loricariidae.

- Em Ancistrus sp. 3 “Barcelos” e Ancistrus sp. 7 “Dimona” as sequências teloméricas podem estar relacionadas com a evolução dos sítios de 5S e relacionadas a fusões cromossômicas.

- Os retrotransposons não-LRT da família Rex apresentaram distribuição diferenciada nos membros do gênero Ancistrus, aparentemente não estando envolvidos na diferenciação dos cromossomos sexuais das espécies analisadas.

- As sequências de DNA repetitivos em Ancistrus, em comparação com outros siluriformes, apresentam um modelo interessante para investigar o papel desses DNAs na evolução cromossômica, tanto do gênero quanto da família Loricariidae.

6. REFERÊNCIAS

Alves, A.L.; Oliveira, C.; Foresti, F. 2003. Karyotype variability in eight species of the subfamilies Loricariinae e Ancistrinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). *Caryologia*, 56(1): 57-63.

Alves, A.L.; Oliveira, C.; Nirchio, M.; Granado, A.; Foresti, F. 2006. Karyotypic relationships among the tribes of Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae) with description of X0 sex chromosome system in a neotropical fish species. *Genetica*, 128:1-9.

Anjos, M.B. 2005. *Estrutura de comunidades de peixes de igarapés de terra firme na Amazônia Central: composição, distribuição e características tróficas*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Amazonas/Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA. Manaus, Amazonas. 68pp.

Aparício, S.; Chapman, J.; Stupka, E.; Putnam, N. 2002. Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes*. *Science,* 297, 1301-1310.

Armbruster, J. W. 1998. Modifications of the digestive tract for holding air in loricariid and scoloplacid catfishes. *Copeia*, 663–675.

Armbruster, J.W. 2004. Phylogenetic relationships of the suckermouth armoured catfishes Loricariidae) with emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. *Zool J Linn Soc,* 141:1-80.

Armbruster, J.W. 2011. Global Catfi sh Biodiversity. *American Fisheries Society Symposium,* 77:15–37.

Arratia, G.; Kapoor, B. G.; Chardon, M.; Diogo, R. 2003. Catfishes. *Science Publishers*, EnWeld, NH.

Artoni, R.F. 1996*. Estudos Citogenéticos na Família Loricariidae, com ênfase no gênero Hypostomus Lacépède (1803) (Pisces, Siluriformes)*. Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas e da Saúde - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 162 pp.

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

Artoni, R.F.; Vicari, M.R.; Endler, A.L.; Cavallaro, Z.I.; Jesus, C.M.; Almeida, M.C.; Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C. 2006. Banding pattern of A and B chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae), with comments on B chromosomes evolution. *Genetica, 127:* 277–284.

Bertollo, L.A.C.; Takahashi, C.S.; Moreira-Filho. O. 1978. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal of Genetics*, 1:103–120.

Blass, E.; Bell, M.; Boissinot, S. 2012. Accumulation and rapid decay of non-LTR retrotransposons in the genome of the three-spine stickleback. *Genome Biology and Evolution*, 4:687–702.

Biémont, C.; Vieira, C. 2006. Junk DNA as an evolutionary force. *Nature*, 443: 521-524.

Biet, E.; Sun, J.; Dutreix, M. 1999. Conserved sequence preference in DNA binding among recombinant proteins: abnormal effect of ssDNA secondary structure. *Nucleic Acids Research,* 27: 596-600.

Blanco, D.R. 2012. *Estudos citogenéticos clássicos e moleculares em espécies do gênero Harttia (Siluriformes,Loricariidae), com enfoque no papel dos DNAs repetitivos na evolução cariotípica do grupo*. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo. 187pp.

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***,** v16, p.203-215.

Bouneau, L.; Fisher, C.; Ozouf-Costaz, C.; Froschauer, A.; Jaillon, O.; Coutanceau, JP.; *et al*. 2003. An active Non-LTR retrotransposon with tandem structure in the compact genome of the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Gen Res*, 13:1686-95.

Britsky, H. A.; Sato, Y.; ROSA, A. B. S. 1988*. Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (com chaves de identificação para os peixes da Bacia do São Francisco)*. 3ª ed. Brasília: CODEVASF. 115 pp.

Britto, M.R. 2002*. 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, São Paulo, 512 pp.

Bueno, V.; Zawadzki ,C. H.; Margarido, V. 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. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 22: 241-250.

Burgess, W. E. 1989. An atlas of freshwater and marine catfishes: a preliminary survey of the Siluriformes. *Tropical Fish Hobbyist Publications*, Inc., Neptune City, NJ.

Capistano, T.G.; Castro, A.L.B.P.; Júlio-Junior, H.F. 2008. Chromosome divergence and NOR polymorphism in *Bryconamericus aff. iheringii* (Teleostei, Characidae) in the hydrographic systems of Paranapanema and Ivaí Rivers, Paraná, Brazil. *Genet Mol Biol,* 31:203–207.

Capy, P.; Bazin, C.; Higuet D.; Langin, T.1998. Dynamics and Evolution of Transposable Elements. Austin/ London: *Landes Bioscience/Chapman & Hall*, 1-197.

Capy, P.; Langin, T.; Higuet, D.; Maurer, P.; Bazin, C. 1997. Do the intregases of the LTR-retrotransposons and class II elements transposases have a common ancestor? *Genetica,* v. 100, 63-72.

Cardoso, A.L.; Sales, K.A.H.; Nagamachi, C.Y.; Pieczarka, J.C.; Noronha, R.C.R. 2013. Comparative cytogenetics of two species of genus *Scobinancistrus* (Siluriformes, Loricariidae, Ancistrini) from the Xingu River, Brazil. *Comparative Cytogenetics* 7(1): 43–41.

Charlesworth, B.; Sniegowski, P.; Stephan, W. 1994. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature*, v371, 215-220.

Centofante, L.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. 2002. ZZ/ZW sex chromosome system in new species of the genus *Parodon* (Pisces, Parodontidae).*Caryologia, 54:* 139-150.

Centofante, L.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. 2006. Cytogenetic characterization and description of na XX/XY1Y2 sex chromosome system in catfish *Hartia carvalhoil* (Siluriformes, Loricariidae). *Citogenet and Genome Res,* v.112, 320-324.

Cereali, S.S.; Pomini, E.; Rosa, R.; Zawadzki, C.H.; Froehlich, O.; Giuliano-Caetano, L. 2008. Karyotype description of two species of *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) of the Planalto da Bodoquena, Brazil. *Genet Mol Res,* 7:583-591.

Chistiakov, A.D.; Hellemans, B.; Volckaert, A.M.F. 2006. Microsatelites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture,* v255; 1-29.

Curcio, M,J.; Derbyshire, K. M .2003. The outs and ins of transposition: from mu to kangaroo. Nat Rev Mol Cell Biol 4: 865Y877.

De Pinna, M. C. C. 1998. Phylogenetic relationships of Neotropical Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi): Historical Overview and synthesis of hypotheses. *In*: Malabarba, L. R.; Reis, R. E.; Vari, R. P.; Lucena, Z. M. S.; Lucena, C. A. S. (Eds.). *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*. Porto Alegre: EDIPUCRS. 278-330.

Denton, T.E. 1973. *Fish chromosome methodology.* Charles C Thomas Publisher, USA, 166pp.

Dobzhansky, Th. 1970. *Genetics of the Evolutionary Process*. Columbia University Press, New York.

Doolittle, W.F.; Sapienza C. 1980. Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature*, 284: 601-603.

Einckbush, T.H.; Einckbush, D.G. 2007. Finelly orchestrated: evoluiton of ribossomal RNA genes. *Genetics* 175: 447-485

Eickbush, T.H.; Malik, H.S. 2002. Origins and evolution of retrotransposons. In: Craig N.L.; Craigie, R.; Gellert, M.; Lambowitz, A.M.; eds., *Mobile DNA II, ASM Press, Washington*, pp. 1111-1144.

Einckbush, T.H. 2002. R2 and related site-specific non-long terminal repeat retrotransposons. In *Mobile DNA II*. Edited by: Craig NL, Craigie R, Gellart M, Lambowitz AM *Washington: Am Society of Microbiol* 813-835.

Ellegren, H. 2000. Microsatelites mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends in Genetics,* 16: 551-558.

Eschmeyer, W. N.; Fong, J. D. 2014. *Catalog of fishes electronic version*. Acesso em: 22-01-2014. California Academy of Sciences.

Eschmeyer, W. N.; Fricke, R. 2010. *Catalog of fishes electronic version*.(17-11-2010). California Academy of Sciences.

Fenocchio, A.S.; Bertollo, L.A.C. 1992. Karyotype similarities among Pimelodidae (Pisces, Siluriformes) from the Brazilian Amazon region. *Cytobios,* 69: 41-46.

Ferreira, D.C.; Porto-Foresti, F.; Oliveira, C.; Foresti, F. 2011a. Transposable elements as a potential source for understanding the fish genome. *Mobile Genetic Elements,* 1: 112-117.

Ferreira, D.C.; Oliveira, C.; Foresti, F.2011b. Chromosome Mapping of retrotransposable elements *Rex*1 and *Rex*3 in three fish species in the subfamily Hypoptopomatinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae*). Cytogenet Genome Res*, 132:64-70.

Ferraris, C.J. 1998. Catfishes and knifefishes*. In: Encyclopedia of fishes (Paxton, J.R., Eschmeyer, W.N., eds.). 2ª. ed*., Academic Press, San Diego, 106-112.

Ferraris, C.J. 2007. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types*. Zootaxa*, 1418: 1-628.

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(9), 1769-1780.

Flavell, R.B.; Bennett, M.D.; Smith, J.B.; Smith, D.B. 1974. Genome size and the proportion of repeated nucleotide sequence DNA in plants. *Biochem Genet* 12: 257-269.

Fink, S.V.; Fink, W.L. 1981. Interrelationships of the ostariophysan fishes (Teleostei). *Zool. J. Linn. Soc. Lond*, 72: 297-353.

Fischer, C.; Bouneau, L.; Coutenceau, J.P.; Weissenbach, J.; Vollf, J.N.; Ozouf-Costaz, C. 2004. Global heterochromatic colocalization of transposable elements with minisatellites in the compact genome of the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Gene*, 336:175-83.

Fisch-Muller, S. 2003. Subfamily Ancistrinae. (Armored catfishes). In: Reis, R.E; Kullander, S.O.; Ferraris, C.J. Jr. (Eds). *Check list of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Edipucrs, Porto Alegre. p.373-400.

Futuyma, D.J. 1998. *Evolutionary Biology.* 3rd ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Goulding, M.; Barthem, R.B.; Ferreira, E.J.G. 2003. The Negro and the Trombetas – black and clear waters from ancient lands. *In*: *The Smithsonian Atlas of the Amazon*. Princeton Editorial Associates, Inc. Hong Kong. p. 211-226.

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. *Cytogenet Genome Res,* 127: 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.

Haaf, T.; Schmid, M.; Steinlein, C.; Galetti, P. M. Jr.; Willard, H. F. 1993. Organization and molecular cytogenetics of satellite DNA family from Hoplias malabaricus (Pisces, Erythrinidae).*Chromosome Research*, 1: 77–86.

Harvey, S.C.; Campos-Ramos, R.; Kennedy, D.D.; Ezaz, M.T.; Bromage, N.R.; Griffin, D.K.; Penman, D.J. 2002. Karyotype evolution in Tilapia: mitotic and meiotic chromosome analysis *of Oreochromis karongae* and *O. niloticus* x *O. karongae* hybrids. *Genetica,* 115:169-77.

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. Nucl. Acids Res 19:4780.

International Human Genome Sequencing Consortium: Initial sequencing and analysis of the human genome. 2001. *Nature,* 409:860-921.

Jaillon O.; Aury, J.M. ; Brunet, F. ; Petit, J.L. ; Stange-Thomann, N. ; Mauceli, E. *et al.* 2004. Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype. *Nature,* 431: 946-957.

Jeffreys, A.J.; Wilson, V.; Thein, S.L. 1985. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature,* 314: 67-74.

Jesus, C.M.; Galetti, P.M.; Valentini, S.R.; Moreira-Filho, O. 2003. Molecular characterization and chromosomal localization of two families of satellite DNA in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae), a species with B chromosomes. *Genetics,* 118: 25-32.

Jiaxun, C.; Xiuhai, R.; Qixing, Y. 1991. Nuclear DNA content variation in fishes. *Cytologia,* 56: 425- 429.

John, B.; Lewis, K.R. 1979. Hierarquia cromossômica*. Edusp*, São Paulo, SP. 170pp.

Junk, W.J.; Soares, G. M.; Carvalho, F. M. 1983. Distribution of the fish species in a lake of the Amazon River floodplain near Manaus (Lago Camaleão), with special reference to extreme oxygen conditions. *Amazoniana*, 7 (4): 397-431.

Jurka, J.; Kapitonov, V.V.; Pavlicek, A.; Klonowski, P.; Kohany, O.; Walichiewicz, J. 2005. Repbase Update, a database of eukaryotic repetitive elements. *Cytogenetics and Genome Research*, 110: 462-467.

Kantek, D.L.Z.; Vicari, M.R.; Peres, W.A.M.; Cestari, M.; Artoni, R.F.; Bertollo, L. A.C.; Moreira-Filho, O. 2009. Chromosomal location and distribution of As51 satellite DNA in five species of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characidae, *Incertae sedis*). *Journal of Fish Biology 75:* 408-421.

Kasahara M.; *et al*. 2007. The medaka draft genome and insights into vertebrate genome evolution. *Nature*, 447: 714-719.

Kavalco, K.F.; Pazza, R.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. 2004. Heterochromatin characterization of four fish species of the family Loricariidae (Siluriformes).*Hereditas*, 141: 237-242.

Kavalco, K.F.; Pazza, R.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. 2005. Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). *Heredity,* v. 94, p. 180–186.

Kazazian, H.H. 2004. Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science,* 303: 1626-1632.

Kidwell, M.G. 2002. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes*. Genetica,* 115: 49-63.

Kidwell, M.G.; Lisch, D. 1997. Transposable elements as sources of variation in animals and plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* USA, v.94: 7704-7711.

Kidwell, M.G.; Lisch, D.R. 2000. Transposable elements and host genome evolution. *Trends Ecol Evol*, 15:95-99.

Kidwell, M.G.; Lisch, D.R. 2001. Perspective: transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution. *Evolution,* 55:1-24.

Klinkhardt, M.;Tesche, M.; Greven, H. 1995. Database of Fish Chromosomes. *Westarp Wissenschaften,* Magdeburg, 237 pp.

Komiya, H.; Takemura, S. 1979. Nucleotide sequence of 5S ribosomal RNA from rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) liver. *The Journal of Biochemistry*, 86: 1067-1080.

Lara, M. C. S. 1998. *Aspectos citogenéticos de quatro espécies de peixes da subfamília Ancistrinae (Siluriformes, Loricariidae) da bacia do rio Paraná*. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Maringá, Paraná. 52pp.

Ia Herrán, R.; Rejon, C.R.; Rejon, M.R.; Garrido-Ramos, M.A. 2001. The molecular phylogeny of the Sparidae (Pisces, Perciformes) based on two satellite DNA families. *Heredity, 87:* 691-697.

Le Rouzic, A.; Capy, P. 2005. The first steps of transposable elements invasion: parasitic strategy *vs.* Genetic drift. *Genetics*, v.169, p.1033-1045.

Levan, A.; Fredga, K.; Sandberg, A.A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52:201–220.

Li, W.H. 1997. Molecular Evolution.*Sinauer Associates Sunderland,* 177-213.

Li, Y.C.; Kord, A.B.; Fahima, T.; Berles A.; Nero E. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutation mechanisms: a review. *Molecular Ecology,* 11: 2453-2465.

Liu, Z.; LI, P.; Kocabas, A.; Karsi, A.; Ju, Z. 2001. Microsatelite containing genes from the channel catfish brain: evidence of trinucleotide repeat expansion in the coding region of nucleotide excision repair gene RAD23B. *Biochemical and Biophysical Research Communication,* 289:317-324.

Lohe, A.R.; Hilliker, A.J.; Roberts, P.A. 1993. Mapping simple repeat DNA sequences in heterochromatin of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 134: 1149-1174.

Long, E.O.; Dawid, J.B. 1980. Repeated genes in eukaryotes. *Ann. Ver. Biochem*., 49:727-764.

Lowe-McConnel, R.H. 1999. *Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais*. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo. 533pp.

Mantovani, M.; Abel, L.D.S.; Mestriner, C.A.; Moreira-Filho, O. 2004. Evidence of the differentiated structural arrangement of constitutive heterochromatin between two populations of *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetics and Molecular Biology, 27:* 536-542.

Mariotto, S.; Artoni, R. F.; Miyazawa, C. S. 2004. Occurrence of sexual chromosome, of the type ZZ/ZW in *Ancistrus* cf. *dubius* (Loricariidae, Ancistrinae) of the Paraguay River Basin, Mato Grosso, Brazil. *Caryologia*, 57: 327-331.

Mariotto, S.; Miyazawa C. S. 2006. *Ancistrus* cf. *dubius* (Siluriformes, Ancistrinae), a complex of species. 1. Chromosomic characterization of four populations and occurrence of sexual chromosome of type XX/XY, in the Pantanal Basin of Mato Grosso, Brazil. *Caryologia,* 59: 299-304.

Mariotto, S.; Centofante, L.; Miyazawa C. S.; Bertollo, L. A. C.; Moreira-Filho, O. 2009. Chromosome polymorphism in *Ancistrus cuiabae* Knaack, 1999 (Siluriformes: Loricariidae: Ancistrini). *Neotropical Ichthyology*, 7(4): 595-600.

Mariotto, S.; Centofante, L.; Vicari, M.R.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho, O. 2011 Chromosomal diversification in ribosomal DNA sites in Ancistrus Kner, 1854 (Loricariidae, Ancistrini) from three hydrographic basins of Mato Grosso, Brazil. *Comparative Cytogenetics,* 5(4): 289–300.

Martins, C.; Galetti, P.M. 1999. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Research*, vol. 7, no. 5, p. 363-367.

Martins, C.; Oliveira, C.; Wasko, A.P.; Wright, J.M. 2004. Physical mapping of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) genome by fluorescent in situ hybridization of repetitive DNAs to metaphase chromosomes - A review. *Aquaculture*, 231:37-49.

Matoso, D.A.; Almeida-Val, V.M.F.; Silva, M.; Moraes-Neto, A.; Almeida, M.C.; Vicari, M.R.; Moreira-Filho, O.; Artoni, R.F. 2011. Chromosomal polymorphism in *Steindachneridion melanodermatum* Garavello, 2005 (Siluriformes, Pimelodiade): a reappraisal the existence of sex chromosome system in the species. *Reviews on Fish Biology and Fisheries,* 21: 497-508.

Matsuda, M.*;* Kusama, T.; Oshiro, T.; Kurihara, Y.; Hamaguchi, S.; Sakaizumi, M. 1997. Isolation of a sex chromosome-specific DNA sequence in the medaka, *Oryzias latipes. Genes Genetics Systematics,* 72: 263-268.

Mazzuchelli, J.; Martins, C. 2009. Genomic organization of repetitive DNAs in the cichlid fish *Astronotus ocellatus*. *Genetica,* 136: 461–469.

Mendes-Neto, E.O.; Vicari, M.R.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho, O. 2011. Description of karyotype in *Hypostomus regani* (Ihering, 1905) (Teleostei: Loricariidae) from the Piumhi river in Brazil with comments on karyotype variation found in Hypostomus. *Comparative Cytogenetics,* 5(2): 133–142.

Medstrand, P.; van de Lagemaat, L.N.; Dunn, C.A.; Landry, J.R.; Svenback, D.; Mager, D.L. 2005. Impact of transposable elements on the evolution of mammalian gene regulation. *Cytogenet Genome Res*, 110:342-52.

Mestriner, C.A.; Galetti, P.M.; Valentini, S.R.; Ruiz, I.R.G.; Abel, L.D.S.; Moreira-Filho O.; Camacho, J.P.M. 2000. Structural and functional evidence that a B chromosome in the characid fish *Astyanax scabripinnis* is an isochromosome. *Heredity, 85:* 1-9.

Meyne, J.; Baker, R.J.; Hobart, H.H.; Hsu, T.C.; Ryder, O.A.; Ward, O.G.; Wiley, J.E.; Wurster-Hill, D. H.; Yates, T.L.; Moyzis, R. K. 1990. Distribuition of non-telomeric sites of the $(TTAGGG)_n$ telomeric sequence in vertebrate chromosomes. *Chromosoma*, 99, 3-10.

Miklos, G.L.G. 1985. Localized highly repetitive DNA sequences in vertebrate and invertebrate genomes. *Mol. Evol. Genet,* 241-321.

Nakayama, I.; Foresti, F.; Tewari, R.; Schartl M.; Chourrout, D. 1994. Sex chromosome polymorphism and heterogametic males revealed by two cloned DNA probe in the ZW/ZZ fish *Leporinus elongatus*. *Chromosoma,* 103: 31-39.

Nelson, J.S. 2006. *Fishes of the world.* 4rd ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, USA.

Okada, N.; Hamada, M.; Ogiwara, I.; Ohshima, K. 1997. SINEs and LINEs share common 39 sequences: a review. *Gene*, 205:229–243.

Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L. F.; Foresti, F. 2000. Revisão dos estudos citogenéticos em peixes neotropicais de águas continentais. In: *VIII Simpósio de Citogenética e Genética de peixes,* 24, 2000, Manaus – AM*. Resumo*.119p.

de Oliveira, R.R. 2006. *Diversidade cariotípica entre dez espécies do gênero Ancistrus (Siluriformes, Loricariidae) da Bacia Amazônica: estrutura e mecanismos de evolução cromossômica***.** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus. 96pp.

de Oliveira, R. R.; Feldberg, E.; dos Anjos, M. B.; Zuanon, J. 2007. Karyotype characterization and ZZ/ZW sex chromosomes heteromorphism in two species of the catfish genus *Ancistrus* Kner, 1854 (Siluriformes: Loricariidae) from the Amazon basin. *Neotropical Ichthyology*, 5: 301-306.

de Oliveira, R. R.; Feldberg, E.; dos Anjos, M. B.; Zuanon, J. 2008. Ocurrence of multiple sexual chromosomes (XX/XY1Y2 and Z1Z1Z2Z2/Z1Z2W1W2) in catfishes of the genus *Ancistrus* (Siluriformes: Loricariidae) from the Amazon Basin. *Genetica,* 134: 243-249.

de Oliveira, R. R.; Feldberg, E.; dos Anjos, M. B.; Zuanon, J. 2009. Mechanisms of chromosomal evolution and its possible relation to natural history characteristics in *Ancistrus* catfishes (Siluriformes: Loricariidae). *Journal of Fish Biology,* 75: 2209–2225

Orgel, L.E.; Crick, F.H.C. 1980. Selfish DNA: The ultimate parasite. *Nature* 284: 604-607.

Ozouf-Costaz, C.; Brandt, J.; Körting, C.; Pisano, E.; Bonillo, C.; Coutanceau, J.P.; Volff, J.N. 2004. Genome dynamics and chromosomal localization of the 115 non-LTR retrotransposons *Rex*1 and *Rex*3 in Antarctic fish. *Antarctic Science* 16: 51-57.

Parise-Maltempi, P.P.; Martins, C.; Oliveira, C.; Foresti, F. 2007. Identification of a new repetitive element in the sex chromosomes of *Leporinus elongatus* (Teleostei: Characiformes: Anostomidae): new insights into the sex chromosomes of *Leporinus*. *Cytogenetics and Genome Research,* 116: 218-223.

Pazza, R. 2005. *Contribuições citogenéticas à análise da biodiversidade em Astyanax fasciatus(Pisces, Characidae*). Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, Sã Carlos, SP.

Pendás, M.; Morán, P.; Freije, J.P.; Garcia-Vasquez, E. 1994. Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic salmon 5S rDNA. *Cytogenet Cell Genet*, 67: 31-36.

Pinkel, D.; Straume, T.; Gray, J. W. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceed. Nat. Acad. Scien*, 83: 2934-2938.

Pokorna, M.; Kratochvil, L.; Kejnovsky, E. 2011. Microsatellite distribution on sex chromosomes at different stages of heteromorphism and heterochromatinization in two lizard species (Squamata: Eublepharidae: *Coleonyx elegans* and Lacertidae: *Eremias velox*). *BMC Genetics,* 12: 1471.

Poulter, R,; Butler, M.; Ormandy, J. 1999. A LINE element from the pufferfish (fugu) *Fugu rubripes* which shows similarity to the CR1 family of non-LTR retrotransposons. *Gene*, 227:169–179.

Power, M.E. 1990. Resource enhancement by indirect effects of grazers: armored catfish, algae, a sediment. *Ecology*, 71(3): 897-904.

Primo, C.C. Diversidade cromossômica em populações de *Trichomycterus* (Siluriformes; Trichomycteridae). 2009. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Bacharelado Em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa. Paraná.

Raskina, O.; Barber, J.C.; Nevo, E.; Belyayev, A. 2008. Repetitive DNA and chromosomal rearrangements: speciationrelated events in plant genomes. *Cytogenet Genome Res,* 120:351-7.

Reis, R.E.; Kullander, S.O.; Ferraris Jr., C.J. 2003. *Check list of the freshwater fishes of South and Central America.* Editora da Pontifícia Universidade Católica, Porto Alegre, Brasil. 742 pp.

Reis, R.E.; Pereira. E.H.L.; Armbruster, J.W. 2006. Delturinae, a new loricariid catfish subfamily (Teleostei Siluriformes), with revisions of *Delturus* and *Hemipsilichthys*. *Zool J Linn Soc,* 147: 277–299.

Reis, D. A. R.; Brandão, K. O.; Toledo, L. F. A.; Pazza, R.; Kavalco, K. F. 2012. Localização física dos genes ribossomais 5S e 18S em "Ancistrus" sp. da bacia dos rios costeiros no Rio de Janeiro (Loricariidae: Ancistrini). *Evolução e Conservação da Biodiversidade,* Vol. 3 Nº 1:39-44.

Ribeiro, L.B.; Matoso, D.A.; Almeida, M.C.; Vicari, M.R.; Moraes- Neto, A.; Svidnicki, M.C.C.M.; Artoni, R.F. 2008. Karyotypic variability in *Iheringichthys labrosus* (Teleostei, Pimelodidae) from the Tibagi River basin (Paraná State, Brazil). *Genet Mol Res* 7:718–724.

Richards, E.J.; Goodman, H.M.; Ausubel, F.M. 1991. The centromere region of *Arabidopsis thaliana* chromosome 1 contains telomere-similar sequences. *Nucleic Acids Research,* 19:3351-3357.

Rosa, K.O.; Ziemniczak, K.; de Barros, A.V.; Nogaroto, V.; Almeida, M.C.; Cestari, M.M.; Artoni, R.F.; Vicari, M.R. 2012. Numeric and structural chromosome polymorphism in *Rineloricaria lima* (Siluriformes: Loricaridae): fusion points carrying 5SrDNA or telomere sequence vestiges. *Rev Fish Biol*, Fish.;22:739–749.

Rubert, M.; da Rosa, R.; Jerep, F.C.; Bertollo, L.A.C.; Giuliano-Caetano, L. 2011. Cytogenetic characterization of four species of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae) with comments on its chromosomal diversity. *Comparative Cytogenetics,* 5(5): 397–410.

Sabaj, M. H.; Armbruster, J. W.; Page, L. M. 1999. Spawning in *Ancistrus* (Siluriformes: Loricariidae) with comments on the evolution of snout tentacles as a novel reproductive strategy: larval mimicry. *Ichthyological Exploration of Freshwaters,* 10:217–229.

Sabino, J.; Zuanon, J.A. 1998. A stream fish assemblage in Central Amazônia: distribution, activity patterns and feeding behavior. *Ichthyological Explorer Freshwaters*, 8(3): 201-210.

Saito, Y.; Rizalita, R.E.; Abe, S. 2007. Isolation and characterization of salmonid telomeric and centromeric satellite DNA sequences. *Genetica,* 131*:* 157-166.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Springs Harbor, NY.

Santos, G.M.; Ferreira, E.J.G. 1999. Peixes da Bacia Amazônica. *In:* Lowe McConnell, R.H. *Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais.* Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo. 345-373.

Schaefer, S.A. 1987. Osteology of *Hypostomus plecostomus* (Linnaeus) with a phylogenetic analysis of the loricariid subfamilies (Pisces: Siluroidei). *Contributions in Science, Natural History Museum of Los Angeles County*, 394: 1-31.

Schmidt, T.; Heslop-Harrison, J.S. 1998. Genomes, genes, and junk: the large-scale organization of plant chromosomes. *Trends in Plant Science,* 3: 195-199.

Schneider, C.H.; Gross, M.C.; Terencio, M. L.; Artoni, R.F.; Vicari, M. R. 2012. Chromosomal evolution of neotropical cichlids: the role of repetitive DNA sequences in the organization and structure of karyotype. *Rev Fish Biol Fisheries*, 18(4): 1-16.

Shapiro, J.A.; Sternberg, R.V. 2005. Why repetitive DNA is essential to genome function. Biol Rev 80:1-24.

Shimoda, N.; Chevrette, M.; Ekker, M.; Kikuchi, Y.; Hotta, Y.; Okamoto, H. 1996. Mermaid, a family of Short Interspersed Repetitive Elements, is useful for *zebrafish* genome mapping. *Biochemical and Biophysical Research Communication,* 220: 233-237.

da Silva, C.; Hadji, H.; Ozouf-Costaz, C.; Nicaud, S.; Jaillon, O.; Weissenbach, J. *et al.* 2002. Remarkable compartmentalization of transposable elements and pseudogenes in the heterochromatin of the *Tetraodon nigroviridis* genome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99:1636-41.

Slijepcevic, P. 1998. Telomers and mechanisms os Robertsonian fusion. *Chromosoma,* 107:136-140.

Souza, A.C.P. 2003. *Descrição cariotípica de peixes dos gêneros Baryancistrus, Parancistrus, Peckoltia e Ancistrus (Ancistrinae, Loricariidae) da Bacia Amazônica*. Dissertação de Mestrado. Zoologia, Universidade Federal do Pará/Museu Paraense Emílio Goeldi. 130pp.

Souza, C.A.P.; Nascimento, L.A.; Carvalho-Jr, R. J.; Barros, S.M.R.; Feldberg, E. Nagamachi, C.Y.; Pieczarka, J.C. 2004. Karyotypic analysis of *Baryancistrus aff. Niveatus* (Ancistrinae, Loricariidae) by C-banding, Ag-NOR, CMA3, DAPI and FISH. *Caryologia,* 57(3):219-223.

Steinemann, S.; Steinemann, M. 2005. Retroelements: tools for sex chromosome evolution. *Cytogenet Genome Res*, 110:134-43.

Swarça AC, Cestari MM, Giuliano-Caetano L, Dias AL (2001) Cytogenetic characterization of the large South American siluriform fish species *Zungaro zungaro* (Pisces, Pimelodidae). *Chromosome Sci,* 5:51–55.

Teugels, G. G. 1996. Taxonomy, phylogeny and biogeography of catfishes (Ostariophysi, Siluroidei): an overview. *Aquat. Living Resour*, 9: 9-34.

Traldi, J.B. 2012. *Citogenética comparativa em espécies de Hypostomus (Siluriformes, Loricariidae, Hypostominae). Contribuição da fração repetitiva do genoma para a diversidade cromossômica do grupo.* Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo. 134pp.

Traldi, J.B.; Blanco, D.R.; Vicari, M.R.; Martinez, J.F.; Lui, R. L.; Barros, A. V.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho, O. 2013. Chromosomal diversity in *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) with emphasis on physical mapping of 18S and 5S rDNA *sites. Genetics and Molecular Research,* 12 (1): 463-471.

Valente, G.T.; Mazzuchelli, J.; Ferreira, I.A.; Poletto, A.B.; Fantinatti, B.E.A.; Martins, C. 2011. Cytogenetic mapping of the retroelements *Rex1, Rex3* and *Rex6* among Cichlid fish: new insights on the chromosomal distribution of transposable elements. *Cytogenetic Gen Res,* 133:34-42.

Vari, R.P.; Malabarba, L.R. 1998. Neotropical ichthyology: An overview *In:* Malabarba, L.R.; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena, Z.M.S.; Lucena, C.A.S. (Eds). *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*. Editora da Pontifícia Universidade Católica, Porto Alegre, Brasil. 1-11.

Vicari, M.R.; Moreira-Filho, O.; Artoni, R.F.; Bertollo, L.A.C. 2006. ZZ/ZW sex chromosome system in an undescribed species of the genus *Apareiodon* (Characiformes, Parodontidae). *Cytogenetic and Genome Research,* 114: 163-168.

Vicari, M.R.; Artoni, R.F.; Moreira-Filho. O.; Bertollo, L.A.C. 2008. Diversification of a ZZ/ZW sex chromosome system in *Characidium* fish (Crenuchidae, Characiformes). *Genetica,* 134: 311-317.

Vicari, M.R.; Nogaroto, V.; Noleto, R.B.; Cestari, M.M.; Cioffi, M.B.; Almeida, M.C.; Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C.; Artoni, R.F. 2010. Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: Methods, applications and perspectives. *J Fish Biol,* 76:1094-1116.

Vicente, E.V.; Bertollo, L.A.C.; Valentini, S.R.; Moreira-Filho, O. 2003. Origin and differentiation of a sex chromosome system in *Parodon hilarii* (Pisces, Parodontidae). Satellite DNA, G- and C-banding. *Genetica,* 119: 115-120.

Volff, J.N.; Korting, C.; Sweeney, K.; Schartl, M. 1999. The non-LTR *Rex3* from the fish *Xiphophorus* is widespread among teleosts. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 1427-1438.

Volff, J.N.; Körting, C.; Schartl, M. 2000. Multiple lineages of the non-LTR retrotransposon *Rex1* with varying success in invading fish genomes*. Molecular Biology and Evolution*, 17: 1673-1684.

Volff, J.N.; Körting, C.; Froschauer, A.; Sweeney, K.; Schartl, M. 2001. Non-LTR retrotransposons encoding a restriction enzyme-like endonuclease in vertebrates. *Journal of Molecular Evolution,* 52: 351-360.

Volff, J.N.; Bouneau, L.; Ozouf-Costaz, C.; Fischer C. 2003. Diversity of retrotransposable elements in compact pufferfish genomes. *Trends in Genetics,* 19:74-678.

Voltolin, T.A.; Mendonça, B.B.; Ferreira, D.C.; Senhorini, J.A.; Foresti, F.; Porto-Foresti, F. 2013. Chromosomal location of retrotransposable REX 1 in the genomes in five *Prochilodus* (Teleostei: Characiformes: Prochilodontidae) species. *Mobile Genetic Elements,* 3:e25846.

Weber, C. 2003. Subfamily Hypostominae. Pp. 351-372. In: Reis, R. E., S. O. Kullander & C. Ferraris Jr. (Eds.). *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America.* Porto Alegre, Edipucrs, 729pp.

Zhang, X.; Einckbush, M.T.; Einckbush, T.H. 2008. Role of recombination in the longterm retention of transposable elements in rRNA gene loci. *Genetics* 180: 1617-1626.

Ziegler, C.G.; Lamtsch, D.K.; Steinlein, C.; Engel, W.; Schartl, M.; Schmid, M. 2003. The giant B chromosome of the cyprinid fish *Alburnus alburnus* harbours a retrotransposon- derived repetitive DNA sequence. *Chromosome Research* 11: 23-35.

Ziemniczak, K.; Barros, A.V.; Rosa, K.O.; Nogaroto, V.; Almeida, M.C.; Cestari, M.M.; Moreira-Filho, O.; Artoni, R.F.; Vicari, M.R. 2012. Comparative cytogenetics of Loricariidae (Actinopterygii: Siluriformes): emphasis in Neoplecostominae and Hypoptopomatinae. *Italian Journal of Zoo*logy, 79: 1-10.