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

CITOGENÔMICA COMPARATIVA DE TRÊS ESPÉCIES DE Potamorhina (OSTARIOPHYSI, CURIMATIDAE) DO ENTORNO DE MANAUS: UMA ABORDAGEM EVOLUTIVA

VANESSA SUSAN DA SILVA PINHEIRO

Manaus, Amazonas

Junho, 2015

VANESSA SUSAN DA SILVA PINHEIRO

CITOGENÔMICA COMPARATIVA DE TRÊS ESPÉCIES DE *Potamorhina* (OSTARIOPHYSI, CURIMATIDAE) DO ENTORNO DE MANAUS: UMA ABORDAGEM EVOLUTIVA

Orientador: Maria Claudia Gross, Dra. Coorientadores: Eliana Feldberg, Dra. e Carlos Henrique Schneider, Dr.

> 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

Junho, 2015

P654 Pinheiro, Vanessa Susan da Silva Citogenômica comparativa de três espécies de *Potamorhina* (Ostariophysi, Curimatidae) do entorno de Manaus: uma abordagem evolutiva / Vanessa Susan da Silva Pinheiro. --- Manaus: [s.n.], 2015. 72 f. : il. color. Dissertação (Mestrado) --- INPA, Manaus, 2015. Orientador : Maria Claudia Gross. Coorientador : Eliana Feldberg; Carlos Henrique Schneider. Área de concentração : Genética, Conservação e Biologia Evolutiva. 1. *Potamorhina latior*. 2. Branquinha. I. Título.

Dedico esta dissertação à minha família em especial minha mãe Edlamar Silva e meu avô José Gonçalves. Ainda, a todos os meus professores.

"Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando para ser conhecida."

Agradecimentos

Chegamos ao final dessa jornada, digo chegamos por que nada se faz sozinho, principalmente um trabalho como este. É necessário primeiramente um sonho ou um objetivo para os menos sensíveis. É necessário dedicação para aprovação na prova de mestrado de um programa tão bom como o PPG-GCBEV/INPA. Dedicação da família (Família vocês foram incríveis! Amo vocês!), dos professores do ensino básico ao superior, dos orientadores e coorientadores passados, amigos de classes e laboratórios passados e dedicação pessoal. Melhor ainda é poder comemorar a aprovação ao lado de quem tanto torce pela felicidade da gente.

É necessário o auxílio de fonte de fomento de bolsa: CNPq - Conselho Nacional de Pesquisa; e de um projeto "Genômica comparativa de peixes amazônicos frente a diferentes desafios ambientais" (FAPEAM - Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas Pronex/ FAPEAM/CNPq 003/2009- Processo: 653:2009).

São necessários professores (Jean, Camila, Dani, Tomas, Vera, Gislene, Eliana e Claudia do PPG-GCBEv e Lúcia e Sidnéia do PPG-BADPI) que nos guiem em disciplinas tão interessantes como as que fiz no INPA. Além disso, amigos de turma que façam os dias de aulas cansativas e momentos decisivos no mestrado mais alegres, como me fizeram Sandra, Elciomar, Mayara, Shizuka, Dayane, Jéssica, Nayara, Fabricio, Erica, Erika, Camila, Vanessa, Patrik, Valdirley e Érico.

São necessários orientadores competentes, compromissados e por que não alegres e carinhosos? Assim foram meus orientadores. Realizei a minha vontade de sempre, que era ter a professora Claudia como orientadora e como grande presente ganhei o Carlos e Eliana como coorientadores. Me desculpem os outros, mas eles foram os melhores orientadores do mundo. Tiveram paciência, cuidado, não economizaram dinheiro e tempo com o projeto e comigo de modo que em meu coração tenho uma enorme gratidão por eles, além da admiração que já tinha. Muito grata mesmo por fazerem esses anos superiores em relação às minhas expectativas e por me orientarem na vida acadêmica e em algumas vezes na pessoal. Muito grata mesmo por me permitirem fazer parte da família LACA e também da família Laboratório de Genética Animal, as quais me deixam muito feliz e satisfeita pela escolha que fiz.

É necessário uma turma companheira, competente e alegre no laboratório para tornar o trabalho agradável como fizeram Natália, Renan, Francy, Sabrina, Edika Sabrina, Dayane,

Erika, Taís, Leo, Júlia, João e Jéssica. Eles sempre estiveram dando força quando a peteca parecia que cairia. Nesse momento preciso ressaltar o quão importante foi aprender com Natália e Renan e que fazer FISH com eles e Francy foi divertidíssimo. Preciso agradecer Francy e Natália por terem dado uma mãozinha no COT lá na UEPG. Renan e Natália vou levar vocês como bom exemplo até o dia possível. Sou muito grata!

São necessários laboratórios parceiros como o Laboratório de Genética Animal (LEGAL), Laboratório de Genética Animal do INPA, Centro de Apoio Multidisciplinar da UFAM, Laboratório de Morfologia Funcional da UFAM e Laboratório de Citogenética e Evolução da UEPG. As pessoas se mostravam sempre dispostas a ajudar efetivamente no trabalho ou a um bom papo. Aqui preciso ressaltar a gratidão ao Edson e Rogério por esperarem e/ou acompanharem eu e Natália no Centro de Apoio Multidisciplinar da UFAM quando precisávamos fazer as clonagens e ao Duncan e seus alunos pelo auxílio *master* na coleta do Rio Manacapuru.

"Cada um que passa em nossa vida, leva um pouco de nós mesmos, e deixa um pouco de si mesmo. Há os que levam muito, e há os que deixam muito, mas não há os que não deixam nada..." — Antoine de Saint-Exupéry

Com os olhos cheios de lágrimas e o coração feliz, Muito obrigada a todos citados direta ou indiretamente por tornarem este sonho realidade!

Resumo

Os peixes da família Curimatidae, ordem Characiformes, possuem uma ampla distribuição geográfica na América Central e na América do Sul, sendo encontrados em maior abundância na bacia do rio Amazonas. Abordagens de citogenética clássica têm sido realizadas para as espécies do gênero Potamorhina que ocorrem na região amazônica (Potamorhina latior, P. altamazonica e P. pristigaster) e têm demonstrado grandes variações interespecíficas com relação ao número diploide, contrariando a tendência da estabilidade na macroestrutura cromossômica das espécies da família Curimatidae (2n = 54 cromossomos). Além disso, a distribuição da heterocromatina também parece estar envolvida no processo de diversificação no gênero. Entretanto, mapeamentos físicos cromossômicos e análises comparativas de sequências de DNA repetitivo são imprescindíveis para o entendimento da organização genômica do grupo. Diante disso, este estudo buscou caracterizar citogenomicamente as três espécies do gênero Potamorhina encontradas nas proximidades de Manaus - AM e compreender os mecanismos evolutivos envolvidos na diferenciação cariotípica das mesmas. Para isso foram amostradas 19 Potamorhina latior, 17 P. altamazonica e 12 P. pristigaster nos municípios de Iranduba - AM e Manacapuru - AM, as quais foram submetidas à coloração convencional com Giemsa, bandeamento C, impregnação com nitrato de prata e hibridização fluorescente in situ com sondas de DNAr 5S e 18S, Rex 1 e 3, tropomiosina 1 e sequências teloméricas. As análises demonstraram variações tanto para marcadores da citogenética clássica quanto para os marcadores moleculares. Número diploide igual a 54, 56 e 102 cromossomos foram evidenciados para P. pristigaster, P. latior e P. altamazonica, respectivamente. Blocos heterocromáticos estiveram presentes nas regiões centromérica e terminal dos cromossomos das três espécies, contudo P. latior apresentou marcações intersticiais adicionais. As marcações de DNAr 5S e 18S foram do tipo simples, não sintênico nas espécies amazônicas de Potamorhina. Os retroelementos Rex 1 e 3 estiveram presentes na região centromérica de todos os cromossomos para as três espécies, bem como o gene tropomiosina 1, com exceção de alguns pares cromossômicos em P. altamazonica. Diante disso, ao relacionar os dados aqui obtidos aos dados filogenéticos anteriormente propostos infere-se que as regiões terminais e, principalmente, centroméricas ricas em heterocromatina, parecem ser as mais dinâmicas do genoma e envolvidas na carioevolução de Potamorhina.

Abstract

The Curimatidae family, order Characiformes, have a wide geographic distribution in Central and South America, being found in greater abundance in the Amazon River basin. Classical cytogenetic approaches to elucidate evolutionary aspects have been taken to the genus Potamorhina that occur in the Amazon region (Potamorhina latior, P. altamazonica and P. *pristigaster*) and have shown large interspecific variation with respect to the diploid number. bucking the trend of chromosomal stability in the macrostructure of Curimatidae species (2n = 54 chromosomes) family. Furthermore, the distribution of heterochromatin also appears to be involved in the process of diversification in the genre. However, chromosomal physical mapping and comparative analysis of repetitive DNA sequences are essential for understanding the genomic organization of the group. Thus, this study aimed to characterize through cytogenetics technics the three species of the genus Potamorhina found near Manaus, and understand the evolutionary mechanisms involved in the karyotype differentiation of these species. For this we sampled 19 P. latior, 17 P. altamazonica and 12 P. pristigaster from Iranduba and Manacapuru, in the Amazonas state of Brazil. The technics applied in theses samples were the conventional Giemsa staining, C-banding, silver nitrate impregnation and fluorescent in situ hybridization with DNA probes (5S rDNA, 18S rDNA, Rex 1, Rex 3, tropomyosin 1 and telomeric sequences). Analysis showed variations for both classical cytogenetic markers as for molecular markers. Diploid number of 54, 56 and 102 chromosomes were shown for P. pristigaster, P. latior and P. altamazonica, respectively. Heterochromatic regions were present in the centromeric regions of chromosomes and also in the terminal regions. However P. latior provided further interstitial markings. The 5S rDNA and 18S were the simple type, not syntenic in Amazonian species of Potamorhina. retroelement Rex 1 and 3 were present in the centromeric region of all chromosomes for the three species as well as tropomyosin 1, except for some chromosomes in P. altamazonica. Given this, comparing the information obtained herein to previously proposed phylogenetic data, that the terminals and centromeric regions rich in heterochromatin seem to be the most dynamic regions in the genome and involved in the evolution process of the genus Potamorhina.

1. Introdução Geral	18
1.1 Família Curimatidae	18
1.2 Citogenética de <i>Potamorhina</i>	20
2. Objetivos	25
2.1 Objetivo Geral	25
2.2 Objetivos Específicos	25
3. Material e Métodos	26
3.1 Coleta das espécies	26
3.2 Obtenção de cromossomos mitóticos	28
3.3 Preparações de lâminas com cromossomos mitóticos	29
3.4 Detecção da Heterocromatina Constitutiva - Banda C	29
3.5 Detecção de regiões organizadoras do nucléolo (RON) - Ag-RON	29
3.6 Extração de DNA	30
3.7 Isolamento de sequências repetitivas por Polymerase Chain Reaction (PCR)	30
3.8 Clonagem e sequenciamento de TPM 1	31
3.9 Marcação das sondas	32
3.10Hibridização fluorescente <i>in situ</i> – FISH	32
3.11 Análises cromossômicas	.333
4. Resultados e discussão	.344
4.1 Implicação dos DNAs repetitivos na evolução cariotípica de espécies amazôn de <i>Potamorhina</i> (Ostariophysi, Curimatidae)	i icas 35
4.1.1 Resumo	.355
4.1.2 Introdução	37
4.1.3Material e Métodos	41
1131 Obtanção dos cromossomos datacção das ragiãas hatarocromáticas a rag	niõos
organizadoros da nucléala	,10C3
$\frac{1}{2} \frac{2}{2} = \frac{1}{2} $	41 F O
4.1.3.2 Extração de DNA e amplificação das subunidades de DNAr 188 e	55,
Tropomiosina 1, Rex 1, Rex 3 e região telomérica	42
4.1.3.3 Clonagem e sequenciamento de TPM1	42
4.1.3.4 Hibridização fluorescente <i>in situ</i> (FISH)	43
4.1.3.4 Captura e Processamento da imagem	43
4.1.4 Resultados	44
4.1.4.1 Citogenética clássica e DNAs ribossomais 5S e 18S	44

Sumário

4.1.4.2 Sequências teloméricas, elementos retrotransponíveis e tropomiosina 147		
4.1.5 Discussão		
5. Conclusão	59	
6. Referências	60	

Lista de Figuras

Figura 1 Sobreposição dos números cromossômicos e fórmulas cariotípicas à árvore filogenética proposta por Vari (1984). Fonte: Feldberg *et al* (1993).21

Figura 2 Mapa com imagens geradas pelo *software* QGIS 2.4 indicando os locais de coletas.

Figura 3 Cariótipos de *P. altamazonica* (a); *P. latior* (b) e *P. pristigaster* (c), submetidos à coloração convencional com Giemsa, sendo m=cromossomos metacêntricos, sm=submetacêntricos, st=subtelocêntricos e a= acrocêntricos. Barra de escala = 10µm.45

Lista de tabelas

Lista de abreviações e siglas

μL	Microlitro			
°C	Graus Celsius			

- 2n Número diplóide
- Acrocêntrico a
- AgNO₃ Nitrato de Prata
- Ag-RON Região organizadora de nucléolo argenteofílica
- $Ba(OH)_2$ Hidróxido de bário
- Banda C Técnica de detecção da heterocromatina constitutiva
- CEUA Comitê de Ética no Uso de Animais em Pesquisa
- CONCEA Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
- DAPI 4',6-diamidino-2-phenilindole
- DNA Ácido desoxirribonucléico (deoxyribonucleic acid)
- DNAr Ácido desoxirribonucléico ribossômico (ribosomal deoxyribonucleic acid)
- dNTP Desoxirribonucleotídeos
- Desoxiadenosina trifosfatada dATP
- dUTP Desoxiuracila trifosfatada
- **EDTA** Ácido etilenodiaminotetracético
- FISH Hibridização Fluorescente in situ
- FITC Fluoresceina isotiocianato (fluorescein isothiocyanate)
- Gramas g
- h Hora (s)
- HCl Ácido Clorídrico

i	Intersticial
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
IGS	Espaçador intergênico (intergenic spacer)
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia
ITS	Sítios teloméricos intersticiais (interstitial telomeric sites)
Kb	Quilobases
KCl	Cloreto de potássio
m	Metacêntrico
М	Molar
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitros
mm	Milimetros
mM	Micromolar
Ν	Normal
NF	Número fundamental
NTS	Espaçador não-transcrito (non-transcribed spacer)
р	Braço curto
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato dextrano
PCR	Reação em cadeia da polimerase
рН	Potencial Hidrogeniônico
primers	Oligos iniciadores
REX	Retroelemento isolado primariamente de Xiphophorus
RNA	Ácido Ribonucléico
RNAr	Ácido Ribonucléico ribossomal

RON	Região	organizadora	de	nucléo	lo
-----	--------	--------------	----	--------	----

rpm	Rotações por	minuto
-----	--------------	--------

- SDS Dodecil sulfato de sódio
- SISBIO Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
- sm Submetacêntrico
- SSC Solução salina de citrato padrão
- st Subtelocêntrico
- t Terminal
- U Unidades
- UFAM Universidade Federal do Amazonas

1. Introdução Geral

1.1 Família Curimatidae

Os peixes da família Curimatidae, ordem Characiformes, possuem uma ampla distribuição geográfica na América Central e na América do Sul, sendo encontrados em maior abundância na bacia do rio Amazonas, seguida pelo rio Orinoco. Habitam os diferentes tipos de águas amazônicas (claras, brancas e pretas) e são encontrados em ambientes que variam de riachos de correnteza rápidas a rios e lagos calmos, bem como em matas alagadas (Vari 1987, 1989). Ainda, os representantes dessa família formam a maior porção de biomassa em habitats fluviais e lacustres e fazem migrações sazonais ligadas à reprodução e alimentação (Vari 1983). Durante as migrações laterais estes indivíduos são explorados para pesca comercial e de subsistência (Lowe-McConnell 1975).

Os representantes dessa família possuem corpo fusiforme, contudo as formas variam de achatadas dorso-ventralmente a comprimidas dorso-lateralmente, mas a maior parte dos representantes possui um corpo intermediário entre essas duas formas (Vari 1983). Esses peixes apresentam ausência de dentes na fase adulta e sinapomorfias em múltiplos sistemas do corpo, tais como modificações da boca, dos arcos branquiais e do trato digestivo, sendo os mesmos adaptados a um hábito alimentar iliófago (Vari 1989).

A história e organização da família como se conhece hoje se iniciou com Fernandez-Yepez (1948), ao reunir as subfamílias Anodinae e Curimatinae formando a família Curimatidae. Em 1982, Vari redefiniu o gênero *Curimatopsis*, hipotetizando-o como gênero monofilético. Posteriormente, Vari (1983), baseado em dados morfológicos, agrupou as famílias Curimatidae, Prochilodontidae, Anostomidae e Chilodontidae como monofiléticas, colocando Curimatidae e Prochilodontidae como grupo irmão e ambos, como grupo irmão da linhagem monofilética Anostomidae e Chilodontidae. Oito gêneros são reconhecidos na família Curimatidae: *Curimata, Curimatopsis, Curimatella, Cyphocharax, Psectrogaster, Pseudocurimata, Steindachnerina* e *Potamorhina* (Vari 2003).

Sobre *Potamorhina*, Vari (1984) definiu-o como uma subunidade monofilética de Curimatidae, tendo em vista que trabalhos anteriores se baseavam apenas em caracteres externos. Vari (1984) propôs a existência de cinco espécies para o gênero *Potamorhina: Potamorhina latior* (Spix e Agassiz 1829), *Potamorhina laticeps* (Valenciennes 1850), *Potamorhina pristigaster* (Steindachner 1876), *Potamorhina altamazonica* (Cope 1878) e *Potamorhina squamoralevis* (Braga e Azpelicueta 1983), as quais são conhecidas vulgarmente como branquinha-comum, branquinha, branquinha peito de aço, branquinha cabeça lisa e sairu-boi, respectivamente.

Potamorhina altamazonica apresenta ampla distribuição natural na bacia do rio Amazonas e do rio Orinoco, porém foi introduzida na região nordeste do Brasil. *Potamorhina latior* e *P. pristigaster* também são encontradas na bacia Amazônica, porém a segunda está restrita ao Brasil e Peru, enquanto a primeira ainda se distribui pela Bolívia e Colômbia. *Potamorhina laticeps* é restrita à bacia do lago Macaracaibo, na Venezuela e Colômbia, e *P. squamoralevis* ao sistema Paraguai-Paraná, no Brasil e na Argentina (Vari 2003).

Em relação à biologia do grupo, sabe-se que as espécies de ocorrência na Amazônia são abundantes em lagos e algumas das mais comuns são importantes para pesca de subsistência e comercial (Gonçalves e Batista 2008), apresentando uma crescente demanda para consumo (Ruffino *et al.* 2005; 2006; Thomé-Souza *et al.* 2007). Bevilaqua (2009), estudando a biologia pesqueira de *P. latior* do lago Grande de Manacapuru (AM), averiguou que os peixes dessa espécie têm uma alta taxa de mortalidade natural, que é reflexo de sua predação por peixes piscívoros. Contudo, a mortalidade é compensada pela reprodução precoce, já que iniciam a desova, classificada como total, com menos da metade de seu tamanho máximo. Além disso, vivem por volta de 3,7 anos e possuem tamanho que varia entre 10 e 28 cm, e têm uma alta taxa de crescimento (Bevilaqua 2009). Apresentam hábito alimentar detritívoro, comum à Curimatidae, alimentando-se preferencialmente de algas, perifíton e detritos (Pouilly e Rodriguez 2004).

De maneira geral, as branquinhas podem ser enquadradas na categoria sazonal, com migrações laterais (Winemiller 1989). Na região da Amazônia Central, os cardumes deixam os lagos durante o período de vazante (Agosto-Setembro), possivelmente por recursos alimentares, e vão em direção aos grandes rios do eixo Amazonas-Solimões. Uma segunda migração, relacionada à reprodução, ocorre no período de enchente (Dezembro-Janeiro), quando os indivíduos com gônadas maduras vão em direção ao canal principal onde desovam. Após a desova, nos meses de Janeiro e Maio, acontece uma terceira migração considerada passiva, uma vez que as áreas florestais são inundadas e funcionam como um berçário de larvas, que foram deslocadas passivamente para estas regiões (Cox-Fernandes 1997).

Migrações de populações de *P. squamoralevis* também são conhecidas. Os sairus-boi fazem migrações reprodutivas que costumam ser curtas no rio Paraguai (Pantanal). Durante as migrações costumam ir das baías até a boca do canal principal para reprodução (Resende 2008). A desova também ocorre durante a elevação do nível da água de rios intermitentes que

se formam na época de cheia e que se conectam a outros canais. Além disso, esta espécie não apresenta cuidados parentais (Moura e Val 2000).

1.2 Citogenética de Potamorhina

Grandes variações cariotípicas são encontradas entre quatro espécies de *Potamorhina* (*P. latior, P. pristigaster, P. altamazonica* e *P. squamoralevis*), não havendo descrição citogenética disponível para *P. laticeps*. Estas grandes variações interespecíficas com relação ao número diploide, encontradas em *Potamorhina*, contrariam a tendência da estabilidade na macroestrutura cromossômica das espécies da família Curimatidae (Venere e Galetti Jr. 1985; Venere 1991; Feldberg *et al.* 1992; 1993; Navarrete 1996; Brassesco *et al.* 2004; Rosa *et al.* 2007; Venere *et al.* 2008). Para os Curimatidae, a grande maioria das espécies apresenta número diploide igual a 54 cromossomos meta e submetacêntricos e em alguns casos com a presença de cromossomos supranumerários.

A diversificação cromossômica dos curimatídeos tem uma origem recente e parece acompanhar a especiação pós-Andina responsável pela diversidade de espécies na família (Venere *et al.* 2008). Visando compreender a evolução cariotípica de *Potamorhina*, Feldberg *et al.* (1993) sobrepuseram os dados citogenéticos disponíveis para as espécies com a filogenia proposta por Vari (1984) e averiguaram que *P. pristigaster*, portadora de número diploide semelhante ao considerado ancestral para o grupo, é também basal em relação às outras duas espécies amazônicas (Figura 1). *Potamorhina altamazonica* e *P. latior*, consideradas derivadas por Vari (1984), também foram as que tiveram maior variação cariotípica, tanto para os números diploides (2n=102 e 2n=56, respectivamente) quanto para os padrões heterocromáticos. Portanto, as espécies derivadas de branquinhas devem ter sofrido rearranjos cromossômicos, incluindo os robertsonianos, que acarretaram nesta divergência do número diploide, sendo proposta a ocorrência de fissões cromossômicas durante a evolução cariotípica (Feldberg *et al.* 1993, Brassesco *et al.* 2004).



Figura 1 Sobreposição dos números cromossômicos e fórmulas cariotípicas à árvore filogenética proposta por Vari (1984). Fonte: Feldberg *et al.* (1993).

Contudo, a organização diferencial do genoma também parece estar envolvida no processo de diversificação dos curimatídeos, incluindo Potamorhina, sendo a mesma evidenciada pela distribuição da heterocromatina (Feldberg et al. 1993; Brassesco et al. 2004; Venere et al. 2008). De maneira geral, a heterocromatina apresenta um importante papel na evolução de eucariotos superiores, estando envolvida em rearranjos cromossômicos como translocações, inversões e fusões (Grewal e Jia 2007). A heterocromatina é uma região de cromatina altamente condensada e sua composição parece estar ligada a uma alta quantidade de DNA repetitivo que pode estar disperso no genoma ou em tandem, estando alocada principalmente em regiões centroméricas, pericentroméricas e teloméricas (Volff et al. 2003; Azevedo et al. 2005). Entretanto, a heterocromatina também pode ser encontrada em outras regiões, em resposta a fatores epigenéticos, atuando na regulação da expressão de genes e controlando a recombinação entre elementos transponíveis dispersos (Grewal e Jia 2007; Inanov e Adams 2011; Toit 2012; Postepska-Igielska et al. 2013). Ainda, padrões heterocromáticos fundamentam os vários processos celulares associados com o envelhecimento (Micco et al. 2011; Tsurumi e Willis 2012). Além disso, a composição da heterocromatina não é constante entre as espécies (Wicker et al. 2005; Hribova et al. 2007; Ferreira e Martins 2008; Schneider 2013; Terencio 2013), uma vez que, regiões repetitivas normalmente sofrem baixa pressão seletiva, o que leva a uma alta taxa evolutiva, ocasionando acúmulo de diferenças ao longo da evolução (Ridley 2006). Trabalhos, investigando a composição desta região em peixes amazônicos, têm encontrado elementos transponíveis (transposons e retrotransposons), DNA ribossomais, microssatélites e satélites (Schneider 2013; Terencio 2013).

Os DNAs ribossomais são organizados nas famílias multigênicas DNAr 45S e DNAr 5S. O DNAr 45S é formado por uma unidade transcricional que codifica os RNA ribossomais 28S, 18S e 5,8S e um espaçador intergênico não transcrito (IGS) (Martins 2007), sendo que tais sequências correspondem às Regiões Organizadoras de Nucléolos, que podem ser detectadas indiretamente pela impregnação de proteínas ribossomais ativas com nitrato de prata (Ag-RON) (Howel et al. 1975; Martins et al. 2011). O DNAr 5S só é visualizado de maneira direta pela FISH (Hibridização Fluorescente in situ) e consiste em sequências codificantes de 120 pb que são separadas uma das outras por um DNA espaçador não transcrito (NTS), de tamanho variável, cuja variação relaciona-se à ocorrência de deleções ou inserções, presença de pseudogenes ou pequenas repetições (Martins et al. 2011). Poucos trabalhos foram realizados em relação ao mapeamento físico-cromossômico dos genes ribossomais para a família Curimatidae, tais como para Cyphocharax modestus, Cyphocharax nagelii e Steindachnerina insculpta (De Rosa et al. 2006, 2007; Santos et al. 2006; Terribele et al. 2008; Oliveira 2010), não sendo possível o estabelecimento de um padrão. Além disso, diferentes tipos de repetições e tamanhos de DNAr 5S são relatados para a família (Rosa et al. 2004, De Rosa et al. 2007; Terribele et al. 2008).

Já, os elementos transponíveis (ETs) são regiões do DNA que quando estão ativos apresentam capacidade de mobilização. Os elementos transponíveis podem ser autônomos, quando codificam enzimas para a transposição ou não-autonômos, quando se transpõem a partir da produção de enzimas de outros elementos transponíveis. Levando em consideração as características estruturais e moleculares, estes elementos possuem classes, subclasses, superfamílias e famílias/subfamílias. Esta movimentação pode causar duplicação do sítio-alvo de inserção (Kidwell 2002; Almeida e Carareto 2005; Wicker *et al.* 2007; Hoede *et al.* 2014). Os ETs apresentam polimorfismos de sítio de inserção e variabilidade no número de cópias dentro e entre as populações (Capy 1998). Porém, trabalhos visando a detecção e composição

23

dos elementos transponíveis no gênero *Potamorhina* são insipientes, da mesma forma que o mapeamento de sequencias teloméricas e do gene tropomiosina 1 (TPM 1).

As sequências teloméricas são repetições curtas (TTAGGG_n), amplamente conservadas nos genomas de vertebrados. Elas promovem estabilidade dos cromossomos, protegendo-os da degradação, além de permitirem a replicação completa do DNA e a integridade do mesmo (Nanda et al. 2002; Multani et al. 2006; Monagham 2010; Ocalewicz 2013). Além disso, estas sequências podem integrar uma gama de sinais endógenos e exógenos, tais como estresses oxidativos, hormonais, genotóxicos, dentre outros, modificando seu comprimento e/ou estrutura da cromatina, o que leva a mudanças no destino das células, apoptose, senescência, remodelamento da cromatina ou mudanças transcricionais (Ye et al. 2014). As sequências teloméricas normalmente são encontradas nas regiões terminais dos cromossomos, contudo, aproximadamente 40% das espécies de peixes, que tiveram o mapeamento físico cromossômico de sondas teloméricas, evidenciaram sítios intersticiais (Ocalewicz 2013). O aparecimento de sítios teloméricos intersticiais (ITS) tem sido relacionado com rearranjos cromossômicos envolvendo telômeros, tais como duplicações, fusões, inversões e translocações a partir de uma condição ancestral, durante a evolução das espécies. Ainda, estes ITS são considerados como "pontos quentes" para a recombinação e podem potencialmente aumentar as taxas de quebra de cromossomos e rearranjos, que levam aos vários polimorfismos cromossômicos encontrados em peixes (Ocalewicz 2013). Para Curimatidae, ITS estão presentes nas regiões intersticiais de dois pares de cromossomos do complemento e em cromossomos B de Cyphocharax nagelli (Oliveira 2010), contudo nenhum dado está disponível para Potamorhina, sendo esta análise interessante para verificar se ITS podem estar relacionados a prováveis alterações cromossômicas originando a diversidade cariotípica encontrada no gênero.

Rearranjos cromossômicos podem estar relacionados a mudanças no número de cópias e posições de outros genes, tais como tropomiosina. Tropomiosinas são isoformas proteicas codificadas por uma família multigênica em tandem. Tais proteínas são responsáveis por auxiliar na citocinese, morte celular e contração muscular. De modo geral, em vertebrados as 40 isoformas conhecidas são formadas por variação de promotores e processamento diferencial por *splicing* alternativo dos diferentes éxons (Perry 2001; Gunning *et al.* 2005; Irimia *et al.* 2010; Marston 2014). Tais proteínas são codificadas por quatro genes altamente conservados, TPM 1, TPM 2, TPM 3 e TPM 4, com espaçadores internos sendo em peixes

acrescentados dois genes, TPM1-2 parálogo de TMP1-1 e TPM4-2 parálogo de TPM4-1 (Perry 2001; Ikeda *et al.* 2003; Toramoto *et al.* 2004; Vrhovki *et al.* 2008; Irimia *et al.* 2010; Marston 2014). Embora estes genes sejam conservados, a variabilidade dos íntrons tem se mostrado úteis para estudos comparativos, desde filogenéticos a populacionais, sendo inexistentes em estudos carioevolutivos (Friesen 2000), apesar do seu mapeamento cromossômico ser interessante para avaliar a organização do genoma entre diferentes espécies.

Assim, o mapeamento físico cromossômicos dessas sequências repetitivas em cromossomos mitóticos das três espécies amazônicas de *Potamorhina* permitiu uma melhor compreensão sobre a organização dos genomas, bem como entendimento de possíveis rearranjos cromossômicos envolvidos na evolução cariotípica do grupo.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar citogeneticamente três espécies do gênero *Potamorhina* provenientes do entorno de Manaus - AM e compreender os mecanismos evolutivos envolvidos na diferenciação cariotípica, utilizando marcadores de DNA repetitivo como ferramenta.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar o cariótipo das espécies *P. pristigaster*, *P. altamazonica* e *P. latior*, incluindo os padrões de distribuição da heterocromatina e região organizadora de nucléolo.

Mapear sequências teloméricas, de DNAr 5S, DNAr 18S e elementos retrotransponíveis Rex
1 e Rex 3, bem como o gene TPM 1, visando averiguar possíveis rearranjos cromossômicos que tenham ocorrido nas espécies em questão.

- Propor uma filogenia baseada nos possíveis mecanismos evolutivos envolvidos na diferenciação cariotípica de *Potamorhina*.

3. Material e Métodos

3.1 Coleta das espécies

Foram estudados citogeneticamente 12 exemplares de *Potamorhina pristigaster* (6 machos e 6 de sexo não identificado), 17 de *Potamorhina altamazonica* (2 fêmeas e 15 de sexo não identificado) e 19 de *Potamorhina latior* (9 fêmeas, 1 macho e 9 de sexo não identificado). Os indivíduos foram coletados, com redes de pesca de malhas 70, 80 e 90 mm, nos arredores de Manaus (AM): lago Janauari (3°12' 36.0" S; 60°01'55.9"W), lago Catalão (3°10'9"S; 59°54'43"W) e lago Manacapuru (03° 09'39.9"S; 060°52'01.6"W) (Figura 2).



Figura 2 Mapa com imagens geradas pelo *software* QGIS 2.4 indicando os locais de coletas.

As coletas foram realizadas sob a autorização concedida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio, através do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO (Licença permanente n°. 5659-1) e todos os procedimentos deste trabalho foram aprovados pela comissão de ética no uso de animais (003/2014-CEUA/UFAM).

Os peixes foram eutanasiados utilizando-se duas etapas, seguindo as recomendações das Diretrizes da Prática da Eutanásia do CONCEA (CONCEA 2013). Assim que mortos, foram extraídos os órgãos hematopoiéticos (Rins anterior e posterior) para a obtenção de preparações cromossômicas e para extração do DNA foram extraídas amostras de tecido muscular e fígado de todos os indivíduos, sendo estes exemplares numerados, registrados, fixados em formol 10% durante 24h e acondicionados posteriormente em recipientes contendo álcool 70%. Os espécimes testemunhos foram depositados na Coleção de Peixes do INPA (46486, 46487, 46488).

3.2 Obtenção de cromossomos mitóticos

Para estimular a divisão celular e a resposta imunológica foi utilizada a técnica descrita por Oliveira et al. (1988), que consiste em injetar intraperitonealmente em cada indivíduo uma suspensão de levedura contendo 0,5g de fermento biológico + 1,5g de dextrose + 6mL de água. Transcorridas 24h, os peixes foram mortos e os cromossomos mitóticos foram obtidos de acordo com protocolo de Bertollo et al. (1978), com algumas adaptações. Para tanto, foi realizada injeção muscular de colchicina a 0,0125% (1ml : 100g do peso animal) e o indivíduo foi mantido vivo por 40 minutos. Posteriormente, o animal foi morto e seu rim foi retirado. O material foi então lavado com Cloreto de Potássio (KCl) a 0,075M e dissociado com pinça de dissecção e seringa sem agulha. Em seguida, o material foi incubado a 37 °C por 30 minutos em 10 mL de KCl a 0,075M, para ocorrer a hipotonização das células. Após este tempo, o material foi ressuspendido cautelosamente com auxílio de seringa sem agulha e transferido para tubos de centrífuga, adicionando-se 1,5mL de fixador Carnoy (3 metanol : 1 ácido acético), centrifugado durante 10 minutos a 900 rpm e retirado o sobrenadante. O material foi novamente ressuspendido com auxílio de pipeta de Pasteur, sendo o volume completado para 10 mL com fixador e centrifugado por 10 minutos a 900 rpm. Este processo foi repetido mais duas vezes para fixação do material. Após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante foram adicionados 1,5 mL de fixador e o material ressuspendido. As preparações foram armazenadas em tubos tipo *eppendorf* de 1,5mL e condicionados em freezers a 20 °C.

3.3 Preparações de lâminas com cromossomos mitóticos

Para a preparação das lâminas, as mesmas foram colocadas em solução sulfocrômica por 24 horas. Após este período, foram retiradas, lavadas em água corrente e destilada e armazenadas em álcool 100%. As lâminas foram imersas em água destilada a 55 °C, em banho-maria. Após 5 minutos, foram retiradas da água e a suspensão celular foi gotejada sobre três pontos diferentes da lâmina. Após secas diretamente ao ar, as amostras foram coradas com Giemsa 5% diluído em tampão fosfato 0,06M e pH 6,8, por 10 minutos, lavadas em água destilada e secas ao ar.

3.4 Detecção da Heterocromatina Constitutiva - Banda C

Para o bandeamento C sequencial, as lâminas anteriormente coradas e analisadas foram descoradas por meio de lavagem com fixador Carnoy ou álcool 70%. O bandeamento foi realizado seguindo o protocolo de Sumner (1972), no qual as lâminas foram tratadas com Ácido Clorídrico (HCl) 0,2N a 42 °C por 1 minuto, lavadas com água destilada e secas ao ar. As lâminas foram então imersas em solução de Hidróxido de Bário [Ba(OH)₂] 5% por 1 minuto para quebra de sítios apurínicos e depurinização da molécula de DNA e lavadas com HCl a 42 °C para inibição da ação do Ba(OH)₂. Conseguintemente foram incubadas em solução salina de 2xSSC por 15 minutos e lavadas com água destilada. As lâminas foram coradas com Giemsa 5% em tampão fosfato 0,06 M e pH 6,8 por 15 minutos e lavadas com água destilada.

3.5 Detecção de regiões organizadoras do nucléolo (RON) - Ag-RON

As lâminas submetidas ao bandamento C foram primeiramente descoradas por meio de lavagem com fixador Carnoy para conseguinte detecção das regiões organizadoras de nucléolos, que estiveram ativas na intérfase precedente, segundo Howell e Black (1980). Foram adicionadas 3 gotas de solução coloidal de gelatina (1g de gelatina comercial sem sabor + 50 mL de água destilada + 0,5 mL de ácido fórmico), e para cada gota de gelatina foram adicionadas 2 gotas de Nitrato de Prata (AgNO₃) a 50% e cobertas com lamínula. As lâminas foram colocadas em câmara úmida, em banho-maria a 60 °C por 3-8 minutos até que atingissem uma coloração castanha dourada. Após atingir a coloração ideal as lâminas foram lavadas em água corrente até que a lamínula fosse retirada.

3.6 Extração de DNA

As extrações foram realizadas segundo o protocolo de isolamento de DNA total modificado de Sambrook e Russel (2001), que consiste na lise celular alcalina de aproximadamente 0,02mg de tecido muscular com o auxílio de 1% de SDS e digestão com 20 μ L de Proteinase K (20 mg.mL-1) a 37 °C, por cerca de 16 horas. O produto da digestão foi então purificado, separado dos "debris" celulares, por sucessivas lavagens, utilizando fenol/clorofórmio (1:1) e clorofórmio. Depois de isolado, o DNA total foi precipitado com etanol absoluto, lavado com 1 mL de etanol 70% e eluído em tampão TE 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8,5 e EDTA 0,1 mM). O DNA extraído foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com Gel *Red (Biotium)* para a verificação quanto ao grau de integridade e também para sua quantificação, a qual foi realizada no próprio gel de agarose por comparação com marcador comercial de peso molecular conhecido, previamente aplicado no gel simultaneamente ao carregamento das amostras. O DNA extraído foi utilizado no isolamento das sequências dos DNAs ribossomais 5S e 18S, gene tropomiosina 1 e Rex 1 e 3.

3.7 Isolamento de sequências repetitivas por Polymerase Chain Reaction (PCR)

As amplificações dos genes de RNAr 18S, 5S, tropomiosina 1 e dos retroelementos Rex 1 e 3 foram realizadas por reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando os oligonucleotídeos iniciadores (primers) 18Sf (5' -CGCTTTGGTGACTCTTGAT-3') e 18Sr (5' -CCGAGGACCTCACTAAACCA -3'); 5Sa (5' -TACGCCCGATCTCGTCCGATC -3') 5Sb (5'-CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC -3'); TROP R (5'e F CGGTCAGCCTCTTCAGCAATGTT 3') e TROP (5'-3'); GAGTTGGATCGGGCTCAGGAGCG RTX1-F1 (5'-TTCTCC -AGTGCCTTCAACACC-3') e RTX1 -R1 (5'-TCCCTCAGCAGAAAGAGTCTGCTC-3') e RTX3 -F3 (5' -CGGTGAYAAAGGGCAGCCCTG-3') e RTX3-R3 (5'-TGGCAGACNGGG GTGGTGGT-3') (Gross et al. 2010; Martins e Galetti Jr. 1999; Friesen et al. 1999; Volff et al. 2000; Volff et al. 1999, respectivamente). As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25 µL contendo DNA genômico de Potamorhina sp. (200ng), tampão 10x com 1,5 mM de MgCl₂, Taq DNA polimerase (5 U/µL), dNTPs (1 mM), par de primers (5 mM), e água Milli-Q. O perfil de reação para o DNAr 18S foi 1 min 95 °C; 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 56 °C e 1 min 30s a 72°C; seguidos por 5 min a 72 °C. As condições para amplificação do DNAr 5S foram 1 min 95 °C; seguido por 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 59 °C, e 1 min 30s a 72 °C; e uma extensão final de 5 min a 72 °C. As condições para amplificação da tropomiosina 1 foram 1 min 95 °C; seguido por 30 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 58 °C, e 30s a 72 °C; e uma extensão final de 5 min a 72 °C e para Rex 1 e Rex 3: 2 min a 94 °C; 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C e 1 min 30s a 72°C; e uma extensão final de 5 min a 72 °C. A PCR da sequência telomérica (TTAGGG)_n foi realizada em um volume final de 25 µL contendo tampão 10x com 1,5 mM de MgC₂, dNTPs (1 mM), 0,2µL primer (TTAGGG)5, 0.2µL primer (CCCTAA)₅ (Ijdo et al. 1991) e 2U de Taq DNA polimerase. A primeira parte da amplificação foi realizada com baixa estringência (4 min a 94 °C; seguidos por 12 ciclos de 1 min a 94 °C, 45 s a 52 °C e 1 min 30 s a 72 °C), seguidos por 35 ciclos de alta estringência (1 min a 94 °C, 1 min 30 s a 60 °C e 1 min 30 s a 72 °C). Os fragmentos foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose 1% corado com Gel Red (Biotium) para a verificação quanto ao grau de integridade deste DNA e também para sua quantificação, a qual foi realizada no próprio gel de agarose por comparação com Low Mass DNA Lader (1 Kb - Invitrogen), previamente aplicado no gel simultaneamente ao carregamento das amostras. Os produtos de PCR foram utilizados como sondas para hibridização dos cromossomos metafásicos, após marcação.

3.8 Clonagem e sequenciamento de Tropomiosina 1

Os produtos de PCR de TPM 1 de *P. latior* foram clonados em plasmídeo pGEM-T Easy (Promega) utilizados para transformar células competentes DH5α de *Escherichia coli* (Promega). Os clones de TPM 1 de *P. altamazonica*, *P. latior* e *P. pristigaster* foram purificados usando Polietilenoglicol (PEG) 20% (NaCl 2,5 M) e sequenciados usando o kit *Big Dye* (Applied Biosystems) no sequenciador automático ABI 3130xl. O alinhamento das sequências foi realizado utilizando a ferramenta Clustal W (Thompson *et al.* 1994), incluída no programa BioEdit 7.0 (Hall 1999). As sequências nucleotídicas foram comparadas com sequências conhecidas por meio da ferramenta BLASTN/*nucleotide sequences* contida no banco público de sequências - NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

3.9 Marcação das sondas

As sondas isoladas (sequências teloméricas, DNA ribossomais 5S e 18S, elementos retrotransponíveis Rex 1 e Rex 3 e gene tropomiosina 1) foram marcadas pelo método de *nick translation*, utilizando biotina 14-dATP (*Bionick labeling system* - Invitrogen) e/ou digoxigenina-11-dUTP (*Dig-Nick Translation mix* - Roche). Para tanto, em um tubo de 1,5 mL, foi preparada uma solução contendo 1 μ L de Mix dNTP 10x; 1 μ L de sonda de DNA (200 ng/ μ L); 1 μ L de Mix de enzima 10x; 6 μ L de água milli-Q, totalizando 9 μ L, para cada lâmina que foi hibridizada. Esta solução foi homogeneizada, centrifugada brevemente e incubada a 16 °C por 90 minutos no termociclador. Conseguintemente, para interromper a reação, foi adicionado 1 μ L de *stop buffer* (EDTA 0,5 M) e após isso foi mantida em freezer 20 °C para posterior utilização.

3.10 Hibridização fluorescente in situ – FISH

O mapeamento físico cromossômico de sequências repetitivas de DNA (sondas teloméricas, DNA ribossomais 5S e 18S, elementos retrotransponíveis Rex 1 e Rex 3 e gene tropomiosina 1) foi realizado de acordo com a técnica de FISH descrita por Pinkel *et al.* (1986), com estringência de 77%.

As lâminas foram lavadas em tampão PBS 1x por 5 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente foram desidratadas em série alcoólica gelada (70%, 85% e 100%), durante 5 minutos cada. Em seguida foram tratadas com 90µl de RNase 10µg/mL (5µL de RNase 10mg/mL e 975µL de 2xSSC) por 1 hora em câmara úmida a 37 °C. As lâminas foram lavadas três vezes em 2xSSC durante 5 minutos cada. Após isso, as lâminas foram lavadas em PBS 1x durante 5 minutos. Posteriormente as lâminas foram fixadas em formaldeído 1% em PBS 1x/50mM MgCl₂ durante 10 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente lavadas em PBS 1x por 5 minutos. Após, as lâminas foram desidratadas em série alcoólica gelada (70%, 85% e 100%) durante 5 minutos cada. As lâminas foram então desnaturadas em formamida 70% em 2xSSC a 70 °C por 5 minutos e novamente desidratadas em uma série de etanol gelado (70%, 85% e 100%) por 5 minutos cada.

Para a solução de hibridização, em um tubo de 1,5 μ L, foram adicionados 4 μ L de sonda, 20 μ L de formamida 100%, 8 μ L de sulfato de dextrano 50%, 4 μ L de 20xSSC e 4 μ L

de água milli-Q. As sondas foram desnaturadas a 99 °C por 10 minutos e passadas imediatamente ao gelo. Durante a hibridização foram colocados 40 µL de solução de hibridização sobre uma lamínula e a lâmina foi invertida sobre a lamínula. As lâminas foram mantidas com o material voltado para baixo em câmara úmida (água destilada) a 37 °C por cerca de 14 horas.

Posteriormente, as lamínulas foram removidas das lâminas e estas então foram lavadas em formamida 15% a 42 °C durante 10 minutos. Em seguida, foram lavadas novamente em solução *Tween* 0,5% durante 5 minutos a temperatura ambiente. Para detecção dos sinais, as lâminas foram incubadas em tampão NFDM por 15 minutos. Após isso foram lavadas duas vezes com solução *Tween* 0,5% por 5 minutos a temperatura ambiente. Foram então colocadas sobre cada lâmina 50 μ L de anti digoxigenina-rodamina e/ou 30 μ L de avidina-FITC. Em seguida foram cobertas com lamínula e deixadas por 60 minutos em câmara úmida a 37 °C. Posteriormente as lamínulas foram removidas e as lâminas foram lavadas três vezes em solução Tween 0,5% por 5 minutos cada a temperatura ambiente. As lâminas foram desidratadas em série alcoólica 70%, 85% e 100% durante 5 minutos cada. Após secas a cada lâmina foi adicionado a solução de DAPI diluído em antifade *VectaShield Vector* (20 μ L de *antifade* e 1 μ L de DAPI).

3.11 Análises cromossômicas

As lâminas submetidas à coloração convencional, banda C e impregnação com nitrato de prata foram analisadas em microscópio óptico, enquanto que as de FISH foram analisadas em fotomicroscópio de epifluorescência *Olympus Bx-51*. Pelo menos 30 metáfases por indivíduo foram analisadas, sendo que as melhores tiveram sua imagem capturada e transferidas para *software* de edição de imagens. Digitalmente os cromossomos metafásicos foram recortados, emparelhados, medidos e colocados em ordem decrescente de tamanho com auxílio dos programas *AdobePhotoshop* CS8.0 e *Image* J 1.49j. A relação de braços dos cromossomos foi determinada de acordo com Levan *et al.* (1964), para o estabelecimento da fórmula cromossômica e número fundamental, sendo considerados cromossomos portadores de dois braços os metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos e portadores de um braço cromossômico os acrocêntricos.

4. Resultados e discussão

Os resultados obtidos neste estudo e a discussão dos dados estão sendo apresentados na forma de artigo científico.



Capítulo 1

Vanessa Susan da S. Pinheiro, Natália Dayane M. Carvalho, Carlos Henrique Schneider, Eliana Feldberg, Maria Claudia Gross. Implicação dos DNAs repetitivos na evolução cariotípica de espécies amazônicas de *Potamorhina* (Ostariophysi, Curimatidae). Submetido à revista BMC Genomics.

4.1 Implicação dos DNAs repetitivos na evolução cariotípica de espécies amazônicas de *Potamorhina* (Ostariophysi, Curimatidae)

4.1.1 Resumo

A familía Curimatidae apresenta uma tendência evolutiva de estabilidade quanto à macroestrutura cromossômica, sendo esta 2n=54 cromossomos. Entretanto, análises cromossômicas das espécies do gênero Potamorhina que ocorrem na região Amazônica (P. altamazonica, P. latior e P. pristigaster) têm demonstrado grandes variações interespecíficas com relação ao número diploide, que são 2n=102, 56 e 54, respectivamente. Ainda, a localização das regiões heterocromáticas nas espécies remete ao possível envolvimento destas regiões com a diversificação cromossômica no gênero em questão. Por isso, este trabalho teve como objetivo caracterizar citogenomicamente as três espécies do gênero Potamorhina encontradas na Amazônia Central a fim de compreender os mecanismos evolutivos envolvidos na diferenciação cariotípica das mesmas por meio de bandeamento C, impregnação com nitrato de prata e hibridização fluorescente in situ de sondas de DNAr 5S e 18S, Rex 1 e 3, gene da Tropomiosina 1 (TPM 1) e sequências teloméricas de DNA. Porções heterocromáticas estão presentes na porção centromérica de todos os cromossomos das espécies em estudo, apresentando-se ainda em porções terminais de alguns pares do complemento de P. altamazonica e P. pristigaster, terminais e intersticiais de alguns cromossomos de P. latior. Sequências teloméricas intersticiais foram encontradas associadas com heterocromatina nas regiões centroméricas de 18 pares cromossômicos de P. latior evidenciando possíveis rearranjos de fusão no curso evolutivo do gênero. Os retroelementos Rex 1 e 3 foram mapeados na região centromérica de quase todos os cromossomos das espécies amazônicas de Potamorhina. Os DNAr 5S e 18S são do tipo simples, não sintênicos e em cromossomos diferentes entre as espécies analisadas. Ainda, a presença de sequências de TPM 1 na região centromérica de quase todos os cromossomos das três espécies amazônicas mostra que apesar da composição de heterocromatina ser diferenciada, a posição do gene é conservada. Acredita-se, portanto, que frações heterocromáticas diferenciais, bem como elementos transponíveis estejam envolvidos neste processo evolutivo, já que as regiões mais dinâmicas do genoma parecem ser as regiões terminais e, principalmente as regiões centroméricas ricas em heterocromatina, envolvidas em processos de fissão e fusão, que inclusive promovem a diferenciação dos pares portadores dos sítios ribossomais, que são comparáveis entre as diferentes espécies.

4.1.2 Introdução

O gênero *Potamorhina* pertencente à família Curimatidae e possui cinco espécies, das quais três ocorrem principalmente na bacia amazônica (*P. latior*, *P. pristigaster* e *P. altamazonica*), uma é restrita ao Lago Maracaibo na Venezuela (*P. laticeps*) e uma ocorre no sistema Paraguai-Paraná (*P. squamoralevis*) (Vari 1989). Citogeneticamente, a família Curimatidae é caracterizada por uma tendência à estabilidade da macroestrutura cromossômica (2n=54 cromossomos do tipo meta e submetacêntricos) (Tabela 1) comum também as famílias Prochilodontidae, Anostomidae e Chilodontidae corroborando o mofiletismo do grupo (Venere e Galetti 1989; Feldberg *et al.* 1992; Feldberg *et al.* 1993; Brassesco *et al.* 2004; Venere *et al.* 2004).

Tabela 1 Dados de citogenética clássica de Curimatidae. Em destaque dados citogenéticos do gênero *Potamorhina.* 2n= Número diploide; NF = Número fundamental; RON = Região organizadora de nucléolo; m= metacêntrico; sm = submetacêntrico; st = subtelocêntrico; a = acrocêntrico; B = cromossomo supranumerário; p= braço curto; q = braço longo; x= dados não disponibilizados; t = terminal; i = intersticial. ¹Feldberg *et al.* 1993; ²Brassesco *et al.* 2004; ³Navarrete 1996; ⁴Venere e Galetti Jr. 1989; ⁵Venere *et al.* 2008; ⁶De Rosa *et al.* 2007; ⁷Venere 1991; ⁸Sampaio *et al.* 2011; ⁹Venere e Galetti 1985; ¹⁰Oliveira 2010; ¹¹Venere e Galetti 1995; ¹²Navarrete e Júlio-Júnior 1997; ¹³Carvalho *et al.* 2001; ¹⁴Matins *et al.* 1996;¹⁵Venere *et al.* 1999; ¹⁶Gravena *et al.* 2007; ¹⁷Oliveira e Foresti 1993; ¹⁸Nirchio *et al.* 2014; ¹⁹=Feldberg *et al.* 1992; ²⁰=Rosa *et al.* 2006; ²¹= De Rosa *et al.* 2008.

			Par e posição da			
Espécie	2n	NF	Fórmula Cariotípica	RON		Referência
Potamorhina						
P. pristigaster	54	108	44m+10sm	25 sm	qt	1
P. altamazonica	102	106	2m+2sm+ 98a	5 m	qt	1,18
P. latior	56	102	52m+2sm+2st	25 sm	qt	1
P. squamoralevis	102	116	14 m-sm+88a	Х	qt	2
Curimatopsis						
C. myersi	46	92	42m+4sm	17m	pt	12
Curimatella						
C. dorsalis	54	108	46m+8sm	13m	pt	2,3
C. immaculata	54	108	46m+8sm	24sm	qt	5
C. alburna	54	108	46m+8sm	14m	qt	1
C. meyeri	54	108	46m+8sm	9m	qt	1
C. lepidura	54	108	50m+4sm	8,9m	t	4
Psectrogaster						
			42m+12sm, 44m+10sm, 54			
P. curviventris	54	108	m+sm	20m	pt	2,3,5,13
P. amazonica	54	108	42m+12sm	17m	pt	5
P. rutiloides	54	108	42m+12sm	9m	qt	1
Steindachnerina						
S. brevipinna	54	108	48m+6sm, 54m/sm	17m	pt	2,3,13
S. biornata	54	108	54m/sm+B	Х	х	17
Espécie	2n	NF	Fórmula Cariotípica	Par e posição da RON		Referência
---------------------	----	-----	--------------------------	-------------------------	--------	------------------------------
S. insculpta	54	108	46m+8sm+B, 50m+4sm	25m,7m	t	4,5,6,7,8,10, 16,17,20,22
S. conspersa	54	108	46m+8sm	2m	i	2,4
S. elegans	54	108	54m	25m	t	4,7
Steindachnerina sp.	54	108	54m	25m	t	7
S. cf. guentheri	54	108	54m/sm	24m/sm	t	13
S. leucisca	54	108	48m+6sm	15m	pt	2
S. amazonica	54	108	42m+12sm	2m,23sm	qt	5
S. gracilis	54	108	38m+16sm	Х	c,qt	5
Curimata						
C. ocellata	56	112	40m+16sm	26sm	pi	2
C. vittata	54	108	42m+12sm	9sm	qt	2
C. knerii	54	108	40m+12sm+2st	27st	pt	2
C. cyprinoides	54	108	44m+10sm	3m	qt	2
Curimata sp.	54	108	20m+7sm	21sm	pi	2
Curimata						
C. inornata	54	108	50m+14sm	3m,22sm	qt	2,5
Cyphocharax						
C. gilbert	54	108	44m+10sm	2m	pt	2,9,15
C. saladensis	54	108	54m/sm+B	х	Х	17
C. cf. gillii	54	108	54 m-sm	х	Х	4,15
C. gouldingi	54	108	54m +B	2m	qt	5,15
C. modestus	54	108	50m+4sm+B	2m	tq	2,5,6,8,10,14,
						15,16,20,21,22
C. nagelli	54	108	36m+18sm/46m+8sm+B	1,2,6,11,21	pt, qt	4,5,10,15
C. spilotus	54	108	54 sm/m+B	1	iq	2,4,8,15
C. vanderi	54	108	48m+6sm	Х	Х	4,15
C. voga	54	108	42m+12sm, 54m/sm	Х	tq	2,4,8,15
C. platanus	58	116	52 m/sm+6st, 48m+4sm+6st	5	pt	2,5,15

Em Curimatidae *Potamorhina altamazonica, Potamorhina latior* e *Potamorhina squamoralevis* contrariam essa tendência, uma vez que apresentam 2n=102, 56 e 102, respectivamente, o que demonstra que rearranjos cromossômicos numéricos estão presentes na evolução cariotípica destas espécies (Feldberg *et al.* 1993; Brassesco *et al.* 2004;). Ainda, variação na distribuição da heterocromatina constitutiva também já foi observada para as espécies deste gênero, estando esta porção da cromatina provavelmente relacionada a eventos evolutivos, bem como processo de diversificação dos demais curimatídeos (Feldberg *et al.* 1993; Brassesco *et al.* 2004; Venere *et al.* 2008). Assim, os dados citogenéticos disponíveis

para espécies do gênero *Potamorhina* promovem o surgimento de questões sobre a composição e o papel da heterocromatina na diversificação das mesmas.

A heterocromatina é a região do genoma que se apresenta altamente condensada por modificações nas proteínas histônicas e não histônicas. Essas proteínas podem sofrer acetilação, metilação, fosforilação, ubiquitinação e sumoilação que culminam na modificação estrutural da cromatina, como a heterocromatinização (Kouzarides 2007). É uma região composta principalmente por DNA repetitivo, que perfaz uma porção substancial do genoma de eucariotos. Estes podem ser geralmente classificados em duas classes principais: repetições em tandem, tais como as famílias multigênicas e os DNAs satélite; e os elementos dispersos, tais como elementos transponíveis (Jurka et al. 2005). Dentre as principais funções da heterocromatina destacam-se as respostas a fatores epigenéticos, a atuação na regulação da expressão de genes e o controle da recombinação entre elementos transponíveis dispersos (Volff et al. 2003; Jurka et al. 2005; Grewal e Jia 2007; Inanov e Adams 2011; Toit 2012). Quanto à sua atividade, tais regiões são transcricionalmente inativas, embora existam exceções. Além disso, padrões heterocromáticos fundamentam os vários processos celulares associados com o envelhecimento, sua formação controla níveis de síntese de RNAr em algumas espécies e são fundamentais para compactação do DNA e segregação cromossômica, sendo importantes, portanto, para manter a integridade e estabilidade do genoma (Larson et al. 2012; Tsurumi e Willis 2012; Postepska-Igielska et al. 2013). Evolutivamente, a fração repetitiva do genoma parece escapar da pressão seletiva, que atua nos segmentos de cópia única, o que os torna bons marcadores para detectar eventos evolutivos recentes e têm fornecido informações sobre a diversificação evolutiva de diferentes espécies de peixes/populações (Cioffi e Bertollo 2012).

Atualmente, os DNAs repetitivos que vem sendo mapeados nos cromossomos de peixes amazônicos são os retrotransposons Rex 1, 3 e 6, DNAr 5S e 18S, bem como sequências teloméricas de DNA (Carvalho *et al.* 2012; Terencio *et al.* 2012; Schneider *et al.* 2013; Milhomem *et al.* 2013; Yano *et al.* 2014). Os retrotransposos formam uma classe de elementos transponíveis que são regiões do DNA com capacidade de mobilização e quando ativos podem causar duplicação do sítio-alvo de inserção, apresentam polimorfismos de sítio de inserção e variabilidade no número de cópias dentro e entre as populações (Capy 1998). Os DNAs ribossomais são organizados nas famílias multigênicas DNAr 45S e DNAr 5S. O

18S e 5,8S e um espaçador intergênico não transcrito (IGS) (Martins 2007). O 5S consiste em sequências codificantes de 120 pb, que são separadas uma das outras por um DNA espaçador não transcrito (NTS), de tamanho variável, cuja variação relaciona-se com a ocorrência de deleções ou inserções, presença de pseudogenes ou pequenas repetições (Martins *et al.* 2011). Já, os telômeros são repetições curtas de (TTAGGG)_n, amplamente conservadas nos genomas de vertebrados, ligadas por um complexo multiproteico chamado Shelterin e RNAs TERRA (Ocalewicz 2013; Ye *et al.* 2014). Eles protegem a extremidade dos cromossomos contra danos e degradação do DNA. Além disso, permitem a replicação completa do DNA (Nanda *et al.* 2002; Multani *et al.* 2006; Monagham 2010; Ocalewicz 2013, Ye *et al.* 2014). Ainda, podem aparecer no genoma como sítios teloméricos intersticiais (ITS), que são considerados como "pontos quentes" para a recombinação e têm sido relacionados com rearranjos cromossômicos envolvendo telômeros, tais como duplicações, fusões, inversões e translocações a partir de uma condição ancestral, durante a evolução de várias espécies (Ocalewicz 2013).

Em contrapartida, apesar de ser uma família multigênica, o gene da tropomiosina nunca foi mapeado cromossomicamente em espécies de peixes. Ela compreende uma família de proteínas, onde cada isoforma apresenta uma propriedade fisiológica única envolvida na transformação e morte celular, citocinese e contração muscular (Perry 2001; Gunning et al. 2005; Cranz-Mileva et al. 2013; Janco et al. 2013; Marston e Gautel 2013). Em vertebrados estas proteínas são codificadas por quatro genes altamente conservados, TPM 1, TPM 2, TPM 3 e TPM 4, com espaçadores internos sendo em peixes acrescentados dois genes, TPM 1-2 e TPM 4-2, gerados por duplicação durante o curso evolutivo da família multigênica em vertebrados (Perry 2001; Ikeda et al. 2003; Toramoto et al. 2004; Irimia et al. 2010; Marston 2014). A duplicação em TPM 1 gerou os genes TPM 1-1, com 7,1 Kb e 14 éxons, e TPM 1-2, com 4,9Kb e 11 éxons. Apesar desta variação, funcionalmente exibem grandes similaridades, apresentando isoformas não restritas e funções genéricas, embora também apresentem restrições teciduais. As isoformas de TPM 1-1 estão presentes no coração, rim e baço, enquanto as de TPM 1-2 estão no fígado e ambas presentes na pele, nos olhos onde auxiliam na movimentação, gônadas, cérebro e, principalmente, em músculos de resposta lenta e rápida (Ikeda et al. 2003; Vrhovki et al. 2008). Nos músculos, as proteínas tropomiosínicas podem associar-se com o complexo troponina, inibindo a ação da actinomiosina ATPase (Ikeda et al. 2003). Em estudos filogenéticos e populacionais tem se mostrado eficiente pela variação encontrada em seus íntrons, mas para carioevolução estes estudos ainda são insipientes (Friesen 2000).

Portanto, neste estudo foram mapeados cromossomicamente elementos repetitivos de DNA em três espécies amazônicas do gênero *Potamorhina*, o que permitiu compreender os mecanismos evolutivos envolvidos na diferenciação cariotípica do grupo.

4.1.3 Material e Métodos

Foram coletados 12 indivíduos de *Potamorhina pristigaster* (6 machos e 6 de sexo não identificado), 17 de *Potamorhina altamazonica* (2 fêmeas e 15 de sexo não identificado) e 19 de *Potamorhina latior* (9 fêmeas, 1 macho e 9 de sexo não identificado) nos entornos de Manaus, AM (lago Janauari – 3°12'36,0"S; 60°01'55,9"W; lago Catalão – 3°10'9"S; 59°54'43"W; rio Manacapuru - 03°09'39,9"S; 60°52'1,6"W), com autorização do ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - Licença permanente no. 5659-1). Ressalta-se que as localidades de coleta não estão em unidades de conservação e estas espécies não estão ameaçadas de extinção. Os peixes foram eutanasiados seguindo as recomendações das Diretrizes da Prática da Eutanásia do CONCEA (CONCEA 2013). Depois de mortos, para a obtenção de preparações cromossômicas foi extraído o órgão hematopoiético (rim) e para extração do DNA amostras de tecido muscular e fígado de todos os indivíduos. Os espécimes testemunhos foram identificados por Jansen Zuanon e depositados na Coleção de Peixes do INPA (46486, 46487, 46488).

4.1.3.1 Obtenção dos cromossomos, detecção das regiões heterocromáticas e regiões organizadoras de nucléolo

As preparações cromossômicas foram obtidas a partir de células renais utilizando colchicina *in vivo*, seguindo o protocolo descrito por Bertollo *et al.* (1978). A heterocromatina foi detectada a partir do protocolo descrito por Sumner (1972) e a região organizadora de nucléolo (Ag-RON) foi detectada a partir do protocolo descrito por Howell e Black (1980).

4.1.3.2 Extração de DNA e amplificação das subunidades de DNAr 18S e 5S, Tropomiosina 1, Rex 1, Rex 3 e região telomérica

O DNA genômico foi extraído utilizando o protocolo descrito por Sambrook e Russell (2001). Os DNAr 18S e 5S, retrotransposons Rex1 e Rex 3 e gene da tropomiosina 1 foram amplificados por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os primers 18Sf (5' -CGCTTTGGTGACTCTTGAT-3') e 18Sr (5' -CCGAGGACCTCACTAAACCA -3') (Gross 5Sa -TACGCCCGATCTCGTCCGATC (5'al. 2010), (5' -3') e 5Sb et CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC -3') (Martins e Galetti Jr. 1999), RTX1-F1 (5'-TTCTCC AGTGCCTTCAACACC-3') e RTX1 -R1 (5'-TCCCTCAGCAGAAAGAGTCTGCTC-3') (Volff et al. 2000) e RTX3 -F3 (5' -CGGTGAYAAAGGGCAGCCCTG-3') e RTX3-R3 (5'-TGGCAGACNGGG GTGGTGGT-3') (Volff et al. 1999), TROP R (5'-TROP F CGGTCAGCCTCTTCAGCA ATGTT 3') e (5'-GAGTTGGATCGGGCTCAGGAGCG - 3') (Friesen et al. 1999), respectivamente. As reações foram realizadas com um volume final de 25 µl composto de 1 µl de DNA genômico (200 ng), tampão 10x com 1,5 mM de MgCl₂, Taq DNA polimerase (5 U/µL), dNTPs (1 mM), par de *primers* (5 mM), e água Milli-Q para completar o volume final. Os ciclos de amplificação seguiram as seguintes etapas: DNAr 18S: 1 min 95 °C; 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 56 °C e 1 min 30s a 72 °C; seguidos por 5 min a 72 °C. DNAr 5S: 1 min a 95 °C; seguido por 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 59 °C, e 1 min 30s a 72 °C; e uma extensão final de 5 min a 72 °C. Rex 1 e Rex 3: 2 min 94 °C; 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C e 1 min 30s a 72 °C; e uma extensão final de 5 min a 72 °C. Gene da Tropomiosina 1: 1 min 95 °C; seguido por 30 ciclos de 30s a 95 °C, 30s a 58 °C, e 30s a 72 °C. A PCR da sequência telomérica (TTAGGG)_n foi realizada em um volume final de 25 µL contendo tampão 10x com 1,5 mM de MgC₂, dNTPs (1 mM), 0,2µL primer (TTAGGG)5, 0,2µL primer (CCCTAA)₅ (Ijdo et al. 1991) e 2U de Taq DNA polimerase. A primeira parte da amplificação foi realizada com baixa estringência (4 min a 94 °C; seguidos por 12 ciclos de 1 min a 94 °C, 45s a 52 °C e 1 min 30s a 72 °C), seguidos por 35 ciclos de alta estringência (1 min a 94 °C, 1 min 30s a 60 °C e 1 min 30s a 72 °C).

4.1.3.3 Clonagem e sequenciamento de TPM 1

Os produtos de PCR de TPM 1 de *P. latior* foram clonados em plasmídeo pGEM-T Easy (Promega) utilizados para transformar células competentes DH5α de *Escherichia coli* (Promega). Os clones de TPM 1 de *P. altamazonica*, *P. latior* e *P. pristigaster* foram purificados usando Polietilenoglicol (PEG) 20% (NaCl 2,5 M) e sequenciados usando o kit *Big Dye* (Applied Biosystems) no sequenciador automático ABI 3130xl. O alinhamento das sequências foi realizado utilizando a ferramenta Clustal W (Thompson *et al.* 1994), incluída no programa BioEdit 7.0 (Hall 1999). As sequências nucleotídicas foram comparadas com sequências conhecidas por meio da ferramenta BLASTN/*nucleotide sequences* contida no banco público de sequências - NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

4.1.3.4 Hibridização fluorescente in situ (FISH)

Os produtos de PCR referentes aos DNAr 18S, Rex 1, Rex 3 tropomisoina 1 e telômero foram marcados por *nick translation* com digoxigenina-11-dUTP (*Dig-Nick Translation mix*; Roche) e o DNAr 5S foi marcado com biotina-14-dATP (*Biotin Nick Translation mix*; Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. Os anticorpos avidina-FITC (Sigma-Aldrich) e anti-digoxigenina rhodamine (Roche) foram usados para detecção e amplificação do sinal. Hibridizações *in situ* fluorescente homólogas e heterólogas foram realizadas, seguindo o protocolo descrito por Pinkel *et al.* (1986), com alta estringência (2,5 ng/µl de sonda, 50% formamida, 10% sulfato dextrano, 2XSSC a 37 0 C por 18 h – 77% de estringência). Os cromossomos foram contracorados com DAPI diluído em antifade *VectaShield Vector* (20 µL de *antifade* e 1 µL de DAPI).

4.1.3.5 Captura e Processamento da imagem

As 30 metáfases de cada espécie foram analisadas em microscópio Olympus BX51. As melhores metáfases foram capturadas com câmera digital (Olympus DP71), usando o *software* Image-Pro MC 6.3. As imagens foram editadas no *Adobe Photoshop* CS8 *program*. Os cromossomos foram medidos no programa *Image* J e classificados de acordo com Levan *et al.* (1964) para o estabelecimento da fórmula cromossômica e do número fundamental, sendo considerados cromossomos portadores de dois braços os metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos e portadores de um braço cromossômico os acrocêntricos.

4.1.4 Resultados

4.1.4.1 Citogenética clássica e DNAs ribossomais 5S e 18S

Potamorhina altamazonica apresentou número diploide igual a 102 cromossomos, com 2m+2sm+98a e número fundamental (NF) 106 (Figura 3a); *P. latior* apresentou 2n=56 cromossomos, com 52m+2sm+2st e NF=112 (Figura 3b) e *P.pristigaster* apresentou 2n=54 cromossomos, com 44m+10sm e NF=108 (Figura 3c).

A heterocromatina constitutiva apresentou-se na região centromérica de todos os cromossomos das três espécies (Figura 4a, 4e, 4i). Contudo, diferenças interespecíficas são visíveis, sendo que em *P. altamazonica* e *P. pristigaster* blocos heterocromáticos adicionais estão presentes na região terminal do braço longo de vários pares cromossômicos (Figura 4a, 4i), enquanto *P. latior* apresenta blocos heterocromáticos mais evidentes, quando comparada às demais espécies do gênero, com marcações adicionais biteloméricas e intersticiais. Além de marcações centroméricas se estendendo a regiões proximais do braço curto e braço longo em alguns pares (Figura 4e).

Região organizadora de nucléolo simples é encontrada nas três espécies do gênero (Figura 4b, 4f, 4j). Em *P. altamazonica* e *P. pristigaster* a RON está localizada no braço longo dos cromossomos do par 5 (Figura 4b, 4f) e em *P. latior* no braço longo do par 25 (Figura 4j).

Os sítios de DNA ribossomais 18S e 5S não apresentam sintenia em nenhuma das espécies de *Potamorhina* analisadas no presente estudo. DNAs ribossomais 18S foram encontrados nos braços longos dos cromossomos 5 em *P. altamazonica* (Figura 4c), 25 em *P. latior* (Figura 4g) e 5 em *P. pistigaster* (Figura 41), enquanto o DNAr 5S está presente na porção intersticial do braço longo do par acrocêntrico 41 de *P. altamazonica* (Figura 4d), em *P. latior* e *P.pristigaster* na porção terminal do braço curto do par metacêntrico 4 (Figura 4h, 4m).

Figura 3 Cariótipos de *P. altamazonica* (a); *P. latior* (b) e *P. pristigaster* (c), submetidos à coloração convencional com Giemsa, sendo m=cromossomos metacêntricos, sm=submetacêntricos, st=subtelocêntricos e a= acrocêntricos. Barra de escala = 10µm.





Figura 4 Regiões heterocromáticas (a, e, i), regiões organizadoras de nucléolo (b, f, j), mapeamento físico cromossômico de DNA ribossomal 18S (sinais em vermelho) (c, g, l) e mapeamento físico cromossômico de DNA ribossomal 5S (sinais em verde) (d, h, m) em cromossomos mitóticos de *P. altamazonica* (a-d); *P. latior* (e-h) e *P. pristigaster* (i-m), sendo m=cromossomos metacêntricos, sm=submetacêntricos, st=subtelocêntricos e a= acrocêntricos. Barra de escala = 10µm.

4.1.4.2 Sequências teloméricas, elementos retrotransponíveis e tropomiosina 1

Com relação às sequências teloméricas, em *P. altamazonica* apenas os sítios terminais foram observados tenuamente (Figura 5a), mas marcações adicionais foram evidenciadas nas regiões centroméricas de 18 pares cromossômicos de *P. latior* (Figura 5b) e em regiões instersticiais (ITS) em 1 par cromossômico de *P. pristigaster* (Figura 5c).

O elemento retrotransponível Rex 1 foi observado na região centromérica de todos os cromossomos de *P. altamazonica*, *P. latior* e *P. pristigaster* (Figura 6). O elemento retrotransponível Rex 3 foi evidenciado na região centromérica de 46 pares do complemento de *P. altamazonica*, sendo que além de marcações centroméricas foram observadas marcações terminais no par 13 (Figura 7a). Para *P. latior* e *P. pristigaster* as marcações estão presentes na região centromérica de todos os cromossomos (Figura 7b, 7c).

As regiões de DNA repetitivo do gene da tropomiosina 1 foram localizadas na região centromérica de 48 pares cromossômicos de *P. altamazonica* (Figura 8a), região centromérica de todos os cromossomos de *P. latior* (Figura 8b) e região centromérica de todos os cromossomos de *P. pristigaster* (Figura 8c).

O mapeamento físico cromossômico das três espécies em estudo utilizando sondas de telômero, DNAr 5S, 18S, Rex 1, Rex 3 e TPM 1 além de heterocromatina estão esquematizados no ideograma abaixo (Figura 9).



Figura 5 Mapeamento físico-cromossômico de sequências teloméricas de DNA (sinais em vermelho) em *P. altamazonica* (a), com destaque (caixas) para os cromossomos mitóticos portadores de ITS em *P. latior* (b) e *P. pristigaster* (c). Barra de escala = 20μ m.



Figura 6 Mapeamento físico-cromossômico de Rex 1 (sinais em vermelho) em cromossomos mitóticos de *P. altamazonica* (a); *P. latior* (b) e *P. pristigaster* (c), sendo m=cromossomos metacêntricos, sm=submetacêntricos, st=subtelocêntricos e a=acrocêntricos. Barra de escala = 20µm.



Figura 7 Mapeamento físico-cromossômico de Rex 3 (sinais em vermelho) em cromossomos mitóticos de *P. altamazonica* (a); *P. latior* (b) e *P. pristigaster* (c), sendo m=cromossomos metacêntricos, sm=submetacêntricos, st=subtelocêntricos e a=acrocêntricos. Em destaque (caixas) cromossomos de *P. altamazonica* sem sinais de hibridização de Rex 3. Barra de escala = 20µm.



Figura 8 Mapeamento físico-cromossômico do gene Tropomiosina 1 (sinais em vermelho) em cromossomos mitóticos de *P. altamazonica* (a); *P. latior* (b) e *P. pristigaster* (c), sendo m=cromossomos metacêntricos, sm=submetacêntricos, st=subtelocêntricos e a=acrocêntricos. Em destaque (caixas) cromossomos de *P. altamazonica* sem sinais de hibridização do gene tropomiosina 1. Barra de escala = 20µm.



Figura 9. Idiograma comparativo de (a) *Potamorhina altamazonica*, (b) *Potamorhina latior* e (c) *Potamorhina pristigaster*.

A amplificação com os *primers* de Tropomiosina 1 resultou em fragmentos que foram clonados e sequenciados para a espécies de *Potamorhina latior*. As 37 sequências de *P. latior* geradas foram comparadas com outras disponíveis no banco de dados do NCBI e apresentaram alta similaridade com Tropomiosina 1 em diferentes grupos, por exemplo *Colossoma macropomum* e *Anostomus taeniatus* (similaridade= 85%, HQ 420888.1;

similaridade=87%, AY 817187.1, respectivamente), o que confirma que se trata de sequências desse gene. Esta espécies apresentou dois grupos de sequências de 490 pares de bases referêntes ao éxons 7 (Figura 10).

10 20 30 40 50 60 70 TPM1 I ACACGC GTITGGGAGC TICTCCCATA IGGICGACCI GCAGGCGGCC GCGAAITCAC TAGIGAIIGA TPM1 II CTTCAC6GCC GGTTTGGGAG CTCTCCCATA TGGTCGACCT GCAGGCGGCC GCGAATTCAC TAGTGATTCG HO420888.1 GA AY817187.1 TGA malant malant malant malant malant malant malant 90 100 110 80 120 130 140 GITGGAICGG GCTCAGGAGC GICTGGCCAC IGCCCIGCAG AAGCIGGAGG AGGCCGAGAA GGCIGCIGAI TPM1 I GTCAGCCTCT TCAGCAATGT GCTTGGCCTC CGTTCAGCTG GATCTCCTGC AGCTCCAINN NCTTCTCCTC TPM1 II HQ420888.1 GTTGGATCGG GCTCAGGAGC GTCTGGCCAC TGCTCTGCAG AAGCTGGAGG AGGCTGAGAA GGCTGCTGAT AY817187.1 GITGGATCGG GCTCAGGAGC GTCTGGCCAC TGCCCTGCAG AAGCTGGAGG AGGCCGAGAA GGCTGCTGAT 150 160 170 180 190 200 21 160 190 200 210 GAGAGCGAGA GGIGIGIATC GIGIAG---T GIGIGCIGIG IGIGIACCGI AIGAGGI-CG IGCGGGIICI TPM1 I TPM1 II GTCCTTCAGG GCCCTGTTCT CAATGACC-T TCATGCCTC- --TGAGGGAC ACGAGACACA CGACAGTCAG HQ420888.1 GAGAGTGAGA GGTGTGTATT GTATAAAGAT TTGTACTGTA TGTGTGTCAA ATGAGTT-C- TGTTTCTCAT AY817187.1 GAGAGCGAGA GGTGCGTGTG GTGTA----C TCGTACCCT- -GTGTGTCGT ATCAGCT-CA CGTCGGTTRT funding funding funding funding funding funding 270 230 240 250 260 220 280 TPM1 I GGTTCTG--- ACTCTGGTGC CGCTGTCGTG TGTCTCG-TG TCCCTCAGAG GCATGAAGGT CATTGAGAAC AACCAGA--- ACCCGCACGG CCTCTT---A CGGTACA-CA CACAGCACAC GCCTGTACGC GAT---ACAC TPM1 II H0420888.1 ACCGTGGAAC AAAGCGATGG CATTGTTGTA TGTTTCTCTG TCTCTCAGAG GCATGAAGGT CATTGAGAAC AY817187.1 GTCT----C CCATTGATGG CATTGT---A CGTCTAACTC TCTCTCAGAG GCATGAAGGT CATTGAGAAC 320 290 300 310 330 340 350 AGGGCCCTGA AGGACGAGGA GAAGA-TGGA GCTGCAGGAG ATCCAGCTGA A-GGAGGCCA AGCACATTGC TPM1 I TPM1 II ACCTCTCGCT CTCGTCAGCA GCCTTCTCGG CCTCCTCCAG CTTCTGCAGG GCAGTGGCCA GACGCTCCTG HQ420888.1 AGGGCCCTCA AGGATGAGGA GAAGA-TGGA GCTGCAGGAG ATCCAGCTGA A-GGAGGCCA AGCACATTGC AY817187.1 AGGGCCCTCA AGGATGAGGA GAAGA-TGGA GCTGCAGGAG ATCCAGCTGA A-GGAGGCCA AGCACATTGC ·····[····] ····[····] ····] ····] ····] ····] ····] ····] ····] ····] 360 370 380 390 400 410 420 TGAAGAGGCT GACCGAATCG AATTCCCGCG GCCGCCATGG CGGCCGGGAG CATGCGACGT CGGGCCCAAT TPM1 I TPM1 II AGCCCGATCC AACTCAATCG AATTCCCGCG GCCGCCATGG CGGCCGGGAG CATGCGACGT CGGGCCCAAT HQ420888.1 TGAAGAGGCT GACCG AY817187.1 TGAAGAGGCT GACCG 430 440 450 460 470 480 TCGCCCTATA GIGAGTCGTA TTACAATTCA CTGGCCGTCG TTTTACAACG TCGTGACTGG GAAAACCCT TPM1 I TPM1 II ICGCCCTATA GIGAGICGTA TIACAATICA CIGGCCGICG TITIACAACG ICGIGACIGG GAAAACACC HO420888.1 AY817187.1

Figura 10. Alinhamento das sequências de Tropomiosina 1, TPM1 I e TPM1 II de *P. latior* com as sequências HQ 42088.1 de *Colossoma macropomum* e AY817187.1 de *Anostomus taeniatus* disponíveis no GenBank. Os hífens correspondem a deleções.

4.1.5 Discussão

Citogeneticamente, o gênero *Potamorhina* apresenta uma macroestrutura cariotípica diversa, com o número diploide variando de 54 a 102 cromossomos, heterocromatina com distribuição também diversa e RON simples, variando apenas quanto ao par cromossômico portador e coincidente com heterocromatina em *P. altamazonica* e *P. latior* (Feldberg *et al.* 1993; Navarrete e Júlio-Júnior 1997).

A variação interespecífica quanto ao par portador da RON e à distribuição de heterocromatina são comuns na família Curimatidae (Venere 2008). Além disso, duas espécies dos grupos irmãos de *Potamorhina, Cyphocharax platanus* e *Curimata ocellata*, também apresentam variação quanto ao número diploide, contrariando a tendência à estabilidade da macroestrutura cromossômica da família (Feldberg *et al.* 1992; Brassesco *et al.* 2004). Esta variação pode também ser encontrada interpopulacionalmente em *P. altamazonica*, pois populações da bacia do rio Orinoco apresentam 2n=100 (Nirchio *et al.* 2014), enquanto populações da bacia do rio Amazonas apresentam 2n=102. Essa diferença foi explicada pela variação topológica encontrada no eixo Amazonas-Orinoco, que dificulta o fluxo gênico, ocasionando fixação de alterações cromossômicas (Molina 2007; Nirchio *et al.* 2014). O mapeamento cromossômico de elementos repetitivos de DNA em três espécies amazônicas de *Potamorhina* permitiu entender os mecanismos evolutivos envolvidos nesta diferenciação, principalmente quanto a composição e envolvimento do centrômero nesse processo.

O centrômero é uma região cromossômica rica em DNA satélite e portanto dinâmica (Rocchi *et al.* 2012). Com isso, os centrômeros podem reposicionar-se levando a modificações na fórmula cariotípica (Grewal e Jia 2007; Varriale *et al.* 2008; Bühler 2009), mas no caso das espécies de *Potamorhina (P. latior, P. altamazonica e P. pristigaster)* que apresentam heterocromatina principalmente na porção centromérica, os rearranjos foram maiores, pois houve alterações também no número diploide. Assim, pode-se dizer que a diversidade de localização da heterocromática encontrada nestas três espécies de *Potamorhina* pode ter tido um papel fundamental na história evolutiva das mesmas, uma vez que a heterocromátina pode atuar em diversos momentos da célula, como na segregação cromossômica, na organização nuclear, na regulação da expressão gênica a partir de efeitos epigenéticos e também pode afetar o processo de recombinação gênica. Portanto, é possível que ocorra associação de regiões heterocromáticas com DNAr, tais como a associação

18S/heterocromatina encontrada em *P. altamazonica* e *P. latior*, outrora encontrada para outros grupos de peixes (Schneider *et al.* 2012). Em contrapartida, o DNAr 5S de *P. latior* está alocado em regiões heterocromáticas, enquanto das outras duas outras espécies não, o que indica que outros mecanismos de regulação gênica também estão envolvidos na expressão destes genes, não sendo esta exclusivamente realizada pela heterocromatinização/ eucromatinização.

Os DNAr 5S e 18S não apresentaram sintenia em nenhuma das três espécies estudadas. Isso ocorre devido as diferenças no processo de transcrição dos DNAr, já que 45S é transcrito pela RNA polimerase I e 5S é transcrito pela RNA polimerase III e também para proteção dessas sequências, tendo em vista que a localização não sintênica evitaria translocações desvantajosas entre regiões contendo os DNAs ribossomais (Martins e Galleti-Jr 1999; Martins 2007). Além disso, a presença de apenas um par cromossômico portador de DNAr 5S e um de 18S, em região intersticial, parece ser uma condição ancestral a diversos grupos de vertebrados, incluindo peixes (Terencio et al. 2012). Das três espécies analisadas neste estudo, apenas em P. altamazonica o DNAr 5S esteve em região intersticial, sendo que nas outras duas, esses marcadores estão em regiões terminais. Ou seja, os rearranjos cromossômicos alteraram também a morfologia e a posição cariotípica dos pares cromossômicos portadores destes sítios, mas possivelmente estes cromossomos sejam homeólogos. Entretanto, poucos trabalhos foram realizados em relação ao mapeamento físico cromossômico dos genes ribossomais 5S e 18S na família Curimatidae, não sendo possível o estabelecimento de um padrão geral, já que algumas espécies apresentam marcações do tipo múltiplas e outras do tipo simples, existindo também variabilidade dos pares portadores entre as diferentes espécies (Rosa et al. 2004; De Rosa et al. 2007; Terribele et al. 2008).

A diferença na organização cariotípica das três espécies também pode ser evidenciada sob a ótica de outras classes de DNA repetitivos, como dos Elementos Transponíveis (ET) Rex 1 e Rex 3, bem como por genes da família gênica da tropomiosina (TPM 1). De maneira geral os retroelementos tem se mostrado importantes na carioevolução de peixes (Gross *et al.* 2009; Schneider *et al.* 2012) já que podem atuar na inativação de genes, recombinação de éxons e de cópias não-homológas gerando rearranjos do tipo deleções, duplicações, inversões e translocações (Volff 2005). Embora os ET possam apresentar uma evolução diferente do curso evolutivo de uma dada espécie, a relação entre a evolução de um ET e de uma espécie é possível, uma vez que sua distribuição compartimentalizada é caracterizada como derivada, em relação à distribuição dispersa no genoma de alguns grupos, como exemplo alguns Perciformes (Ozouf-Costaz *et al.* 2004).

Os retroelementos Rex 1 e Rex 3 foram encontrados nas regiões heterocromáticas das espécies analisadas, o que é característico para peixes, embora existam relatos de ocorrência em regiões eucromáticas (Gross *et al.* 2009; Cioffi *et al.* 2010; Schneider *et al.* 2012; Parsonato-Alves *et al.* 2013). A distribuição de Rex 1 e 3 mostra que esses ET estão sob ação de processos evolutivos em *Potamorhina*, acumulando-se em regiões heterocromáticas, especialmente nas regiões centroméricas, mas com diferença na intensidade de sinais entre as três espécies, o que pode indicar um acúmulo diferencial entre as mesmas. Ainda, é possível verificar que nem toda região heterocromáticos terminais, nenhum sinal de hibridização de ET foi evidenciado nesta região, mostrando que a composição heterocromática é diferencial dentro de uma mesma espécie. Além disso, em *P. latior* estas sequências aparecem associadas com sequências teloméricas intersticiais, o que não foi evidenciado em *P. pristigaster*, que apesar de apresentar um par de cromossomos portador de ITS, nenhum sinal de hibridização destes ETs foi evidenciada nesta região. *Potamorhina altamazonica*, por sua vez teve cinco pares sem nenhum sinal para Rex 3.

Já para tropomiosina, não existe nenhum relato de mapeamento físico cromossômico destas sequências. Nos cromossomos mitóticos das espécies amazônicas de *Potamorhina* a TPM 1 foi encontrada também na região centromérica, coincidente com heterocromatina, de todos os cromossomos de *P. pristigaster* e *P. latior*, enquanto em *P. altamazonica* a TPM 1 esteve ausente em seis pares cromossômicos, mas presente na região centromérica e heterocromática de todos os demais cromossomos, novamente ressaltando a composição heterocromática diferencial nestas espécies. Dessa maneira, a comparação do número de marcações de TPM 1 entre espécies estreitamente relacionadas se mostra importante numa abordagem evolutiva, principalmente quando tais sítios estão associados com retroelementos, que se ativos, podem influenciar na evolução cromossômica (Hoede 2014).

A localização do gene TPM 1 na região centromérica das três espécies gera algumas hipóteses: primeiramente, a heterocromatina pode estar atuando como reguladora da expressão gênica e, por outro lado o gene TPM 1 pode também estar atuando com função de centrômero, agindo na manutenção da heterocromatina, na coesão das cromátides-irmãs ou na formação do cinetocoro, como anteriormente descrito para outros DNAs repetitivos

(DeBaryshe e Pardue 2011; Larson *et al.* 2012; Barbosa *et al.* 2014); em segundo lugar, que a associação de TPM 1 com os retroelementos transponíveis Rex 1 e 3 trata-se de pseudogenes, haja vista que estes elementos podem, em algum momento da evolução, se mobilizado, levar consigo regiões gênicas próximas, como o gene TPM 1 completo ou parcial, o que explicaria a presença de tantas marcações encontradas nas espécies estudadas (Wicker *et al.* 2007). Todavia, os pares cromossômicos com ausência de Rex 3 em *P. altamazonica* não coincidem com os pares onde não houve hibridização de TPM 1. Neste caso análises mais refinadas como a Fiber-FISH (Hibridização Fluorescente *in situ* para fibras de DNA) podem auxíliar a elucidar a questão.

O motivo de tantos DNAs repetitivos serem encontrados na região centromérica das três espécies pode ser devido à evolução adaptativa que alguns DNA repetitivos dessa região sofrem (King e Kashi 2009). Ainda, existe uma tendência ao acúmulo de DNAs repetitivos em regiões com baixa recombinação como o centrômero (Pathak e Ali 2012). Esta região é rica em DNA satélite e microssatélite, importantes para ligação nos complexos proteicos durante a divisão celular (Allshire e Karpen 2008; Santaguida e Musacchio 2009; Perpelescu e Fukagawa 2011). Tal composição é similar à composição hetecromática, já que esta tem apresentado alta quantidade de DNAs moderadamente e altamente repetitivos, indicando que esta região cromossômica está suscetível a rearranjos (Grewal e Jia 2007). Entretanto, nem sempre as regiões centroméricas e heterocromáticas apresentam alto grau de similaridade, inclusive em espécies próximas, como em algumas espécies da família Prochilodontidae (Terencio *et al.* 2012).

Diante dos resultados apresentados, infere-se que a diversidade no número e fórmula cromossômica das espécies amazônicas do gênero *Potamorhina* tenha se dado a partir de um ancestral com número diploide 54 e com cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, reafirmando a tendência da estabilidade na macroestrutura cromossômica da família Curimatidae (Venere e Galetti Jr. 1985; Venere 1991; Feldberg *et al.* 1993; Navarrete 1996; Brassesco *et al.* 2004; Rosa *et al.* 2007; Venere *et al.* 2008). Além disso, *P. pristigaster* apresenta 2n=54 e fórmula cromossômica 44m+10sm, sendo esta espécie basal tanto em relação às demais, já estudadas citogeneticamente, como na filogenia proposta por Vari (1984).

Considerando-se que todas as espécies estudadas apresentam grande quantidade de elemento repetitivo no centrômero, dentre eles elementos retrotransponíveis, os quais quando

ativos e sob condições de estresse, instabilidade do ambiente ou tentantiva de hibridização podem se mobilizar e promover rearranjos, dentre eles as fissões (Volff 2005), propõe-se que ao longo do curso evolutivo do gênero, eventos de fissão teriam gerado um ancestral com número diploide alto, provavelmente 102 cromossomos, sendo este o ancestral de *P. squamoralevis*, *P. altamazonica* e *P. latior* (Figura 11). Hoje, provavelmente tais ET estejam inativos, mas seria necessário uma análise de expressão gênica para comprovar isso. Todavia, os Rex não são necessariamente os responsáveis por promover estes rearranjos, mas como os peixes apresentam todos os tipos de retroelementos já descritos (Okada *et al.* 1997; Poulter *et al.* 1999; Volff *et al.* 1999; Aparicio *et al.* 2002), em algum momento alguns destes ETs estiveram ativos e promoveram o aumento em sua quantidade no genoma e mobilização de sequências, incluindo do gene tropomiosina. Por tanto, a atividade de retrotransposons levou a evolução em concerto dentro de *Potamorhina.* O aumento de número diploide por ação de ETs se afirma com a exclusão da hipótese de aumento por poliploidia já que os cromossomos de *P. altamazonica* são menores quando comparados com os cromossomos de *P. pristigaster* ou *P. latior.*

Quanto ao surgimento de uma espécie com redução no número diploide, *P. latior*, provavelmente ocorreram sucessivos rearranjos de fusão cromossômica para o surgimento da mesma a partir de um ancestral com número diploide elevado, novamente por ação de ETs, já que foram encontrados múltiplos sítios de ITS e Rex 1 e 3 na região centromérica de diversos cromossomos da espécie em questão, corroborando a hipótese de rearranjos robertsonianos envolvidos no curso evolutivo de *Potamorhina* como já proposto por Feldberg *et al.* (1993) e Brassesco *et al.* (2004).



Figura 11 Filogenia proposta nesse trabalho para o gênero *Potamorhina*. Baseada em dados citogenéticos do presente estudo, de Feldberg *et al.* (1993) e Brassesco *et al.* (2004) bem como na filogenia proposta por Vari (1984) a partir de dados morfológicos. a) fissão cromossômica e b) fusão cromossômica.

Assim, a variação cromossômica a nível molecular encontrada nas espécies da Amazônia Central mostra a importante ação de elementos transponíveis no processo carioevolutivo de *Potamorhina*. A distribuição de Rex 1 e 3 no genoma sugere que ET estão sob ação de mecanismos evolutivos, tendendo a se acumular em regiões cromossômicas específicas, ou seja de heterocromatina e centrômero, que em seu processo evolutivo acarretaram ao grupo a divergência do número diploide e da fórmula cariotípica, sendo proposta a ocorrência de fissões e fusões cromossômicas durante a evolução cariotípica do mesmo.

5. Conclusões

A caracterização citogenética das três espécies do gênero *Potamorhina* provenientes do entorno de Manaus - AM permitiu as seguintes elucidações quanto aos mecanismos evolutivos na diferenciação cariotípica:

♣ As marcações de DNAr do tipo simples, não sintênicas e variando de pares portadores indicam que esses cromossomos são homeólogos e que rearranjos cromossômicos possivelmente alteraram a morfologia e a posição cariotípica dos pares cromossômicos portadores destes sítios nas diferentes espécies.

♣ Existe uma tendência ao acúmulo de DNAs repetitivos em regiões com baixa recombinação, como o centrômero.

♣ Os retroelementos Rex 1 e Rex 3 estão se acumulando em regiões heterocromáticas e associados com sequências teloméricas em *P. latior*.

♣ Existe variação na composição heterocromática dentro de uma mesma espécie.

♣ Acredita-se que a diversidade no número e forma cromossômica das espécies amazônicas do gênero *Potamorhina* tenham se dado a partir de um ancestral com número diploide 54 e cromossomos metacêntricos e submetacêntricos.

♣ Ao longo do curso evolutivo do gênero, eventos de fissão possivelmente geraram um ancestral com número diploide alto, provavelmente 102 cromossomos, sendo este o ancestral de *P. squamoralevis, P. altamazonica* e *P. latior* já que todas as espécies estudadas apresentaram grande quantidade de elemento repetitivo no centrômero.

6. Referências

- Allshire, R.C.; Karpen, G.H. 2008. Epigenetic regulation of centromeric chromatin: old dogs, new tricks? *Nature Reviews Genetics*, 12: 923-37.
- Almeida, L.M.; Carareto, C.M.A. 2005. Origem, proliferação e extinção de elementos transponíveis: Qual seria a importância da transferência horizontal na manutenção desse ciclo? 1da ed. Monografia SBG, São Paulo, 40p.
- Aparicio, S.; Chapman, J.; Stupka, E.; Putnam, N.; Chia, J.M.; Dehal, P. 2002. Whole genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes*. *Science*, 297: 1301-1310.
- Azevedo, M.F.C.; Oliveira, C.; Martins, C.; Wasko, A.P.; Foresti, F. 2005. Isolation and characterization of a satellite DNA family in *Achirus lineatus* (Teleostei: Pleuronectiformes: Achiridae). *Genetica*, 125: 205–210.

- Barbosa, C.M.; Mareco, E.A.; Silva, M.D.P.; Martins, C.; Alves-Ccosta, F.A. 2014. Differential expression of a retrotransposable element, Rex6, in *Colossoma macropomum* fish from different Amazonian environments. *Mobile Genetic Elements*, 4: e30003.
- Bertollo, L.A.C.; Takahashi, C.S.; Moreira-Filho, O. 1978 Cytotaxonomic considerations on Hoplias lacerdae (Pisces, Erythrinidae). Brazilian Journal of Genetics, 1(2): 103-120.
- Bevilaqua, D.R. 2009. Parâmetros populacionais de <u>Pygocentrus nattereri</u> Knerr, 1858 e <u>Potamorhina latior</u> (Spix e Agassiz, 1829) (Osteichthyes: Characiformes) em lagos de várzea da região de Manacapuru, AM. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Amazonas, Amazonas, Manaus, 56p.
- Brassesco, M.S.; Pastori, M.C.; Roncati, H.A., Fenocchio, A.S. 2004. Comparative cytogenetic studies of Curimatidae (Pisces, Characiformes) from the middle Paraná River (Argentina). *Genetics and Molecular Research*, 3(2): 293-301.
- Bühler, M. 2009. RNA turnover and chromatin-dependent gene silencing. *Chromosoma*, 118: 141–151
- Capy, P. 1998. *Dynamics and evolution of transposable elements*. France, Landes Bioscience, 197p.
- Carvalho, M.; Oliveira, C.; Foresti, F. 2001. Cytogenetic analysis of three species of the families Characidae and Curimatidae (Teleostei, Characiformes) from the Acre River. Chromosome Science, 5: 91–96.
- Carvalho, N.D.M.; Gross, M.C.; Schneider, C.H.; Terencio, M.L.; Zuanon. J.; Feldberg, E. 2012. Cytogenetics of Synbranchiformes: a comparative analysis of two *Synbranchus* Bloch, 1795 species from the Amazon. *Genetica*, 140: 149-158.
- Cioffi M.B.; Martins C.; Bertollo L.A.C.; 2010. Chromosome spreading of associated transposable elements and ribosomal DNA in the fish *Erythrinus erythrinus*. Implications for genome change and karyoevolution in fish. *BMC Evolutionary Biology*, 10: 217.

- Cioffi, M.B.; Bertollo, L.A.C. 2012. Distribution and evolution of repetitive DNAs in fish. In: Garrido-Ramos, M.A. (Ed.). *Repetitive DNA*. Karger, Genome Dyn., Basel, p. 197–221.
- Cox-Fernandes, C. 1997. Lateral migration of fishes in Amazon floodplains. *Ecology of Freshwater Fish*, 6: 36-44.
- Concea. 2013. *Diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA*. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Brasil, Distrito Federal, 54p.
- Cranz-Mileva, S.; Pamula, M.C.; Barua, B.; Desai, B.; Hong, Y.H.; Russell, J.; Trent, R.;Wang, J.; Walwort, N.C.; Hitchcock-DeGregori, S.E. 2013. A Molecular EvolutionApproach to Study the Roles of Tropomyosin in Fission Yeast. *Plos one*, 8(10): e76726.
- Debaryshe, P.G.; Pardue, M.L. 2011. Differential maintenance of DNA sequences in telomeric and centromeric heterochromatin. *Genetics*, 187(1): 51-60.
- De Rosa, L.V.S.; Foresti, F.; Martins, C.; Oliveira, C.; Sobrinho, P.E.; Wasco, A.P. 2007. Cytogenetic analyses of two Curimatidae species (Pisces; Characiformes) from the Paranapanema and Tiete Rivers. *Brazilian Journal of Biology*, 67(2): 333-338.
- Feldberg, E.; Porto, J.I.R.; Bertollo, L.A.C. 1992. Karyotype evolution in curimatidae (Teleostei, Characiformes) of the Amazon region. I. studies on the genera *Curimata*, *Psectrogaster*, *Steidachnerina* and *Curimatella*. *Revista Brasileira de Genetica*, 2: 369-382.
- Feldberg, E.; Porto, J.I.R.; Nakayama, C.M.; Bertollo, L.A.C. 1993. Karyotype evolution in Curimatidae (Teleostei, Characiformes) from the Amazon region. 2. Centric fissions in the genus *Potamorhina*. *Genome*, 36(2): 372-376.
- Fernandez-Yepez, A. 1948. Los Curimatidos (catalogo descriptivo com nuevas adiciones genericas y especificas). Boletin taxonómico n1 del laboratorio de Pesqueria de Caiguire-Edo. Sucre Venezuela-Caracas. p. 7-79.
- Ferreira, I.A.; Martins, C. 2008. Physical chromosome mapping of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* using repetitive DNA sequences. *Micron*, 39: 411-418.

- Friesen, V.L.; Congdon, B.C.; Kidd, M.G.; Birt, T.P. 1999. Polymerase chain reaction (PCR) primers for the amplification of five nuclear introns in vertebrates. *Molecular Ecology*, 8: 2141–2152.
- Friesen, V.L. 2000. Introns. p. 274-294. In: Baker, A.J. (Ed.) Molecular Methods in Ecology. Blackwell Science, Oxford.
- Gonçalves, C.; Batista, V.S. 2008. Avaliação do desembarque pesqueiro efetuado em Manacapuru, Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica*, 38(1): 135-144.
- Gravena, W.; Teribele, R.; Giuliano-Caetano, L.; Dias, A.L. 2007. Occurrence of B chromosomes in *Cyphocharax modestus* (Fernández-Yépez, 1948) and *Steindachnerina insculpta* (Fernández-Yépez, 1948) (Characiformes, Curimatidae) from the Tibagi River basin (Paraná State, Brazil). *Brazilian Journal of Biology*, 67(4, Suppl.): 905-908.
- Grewal, S.I.S.; Jia, S. 2007. Heterochromatin revisited. Nature Reviews Genetics, 8: 35-46.
- Gross, M.C.; Schneider, C.H.; Valente, G.T.; Porto, J.I.R.; Martins, C.; Feldberg, E. 2009. Comparative Cytogenetic Analysis of the Genus Symphysodon (Discus Fishes, Cichlidae): Chromosomal Characteristics of Retrotransposons and Minor Ribosomal DNA. Cytogenetic and Genome Research, 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.
- Gunning, P.W.; Schevzov, G.; Kee, A.J.; Hardeman E.C. 2005. Tropomyosin isoforms: divining rods for actin cytoskeleton function. *Trends Cell Biol*; 15(6): 333-341.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/96/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41:95-98.
- Hoede, C.; Arnoux, S.; Moisset, M.; Chaumier, T.; Inizan, O.; Jamilloux, V.; Quesneville, H.
 2014. PASTEC: An Automatic Transposable Element Classification Tool. *Plos one*, 9(5): e91929.
- Holland, P.W. 1999. Gene duplication: past, present and future. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 10(5): 541-547.

- Howell, W.M; Denton, T.E.; Diamond, J.R. 1975. Differential staining of the satellite regions of human acrocentric chromosomes. *Experientia*, 31(2): 260–262.
- Howell, W.M.; Black, D.A. 1980. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 3: 1014-1015.
- Hřibová, E.; Doleželová, M.; Town, C.D.; Macas, J.; Doležel, J. 2007. Isolation and characterization of the highly repeated fraction of the banana genome. *Cytogenetic and Genome Research*, 119: 268–274.
- Ijdo, J.W.; Wells, R.A.; Baldini, A.; Reeders, S.T. 1991. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)n generated by PCR. *Nucleic Acids Research*, 19: 4780.
- Ikeda, D.; Toramoto, T.; Ochiai, Y.; Suetake, H.; Suzuki, Y.; Minoshima, S.; Shimizu, N.; Watabe, S. 2003. Identification of novel tropomyosin 1 genes of pufferfish (*Fugu rubripes*) on genomic sequences and tissue distribution of their transcripts. *Molecular Biology Reports*, 30: 83–90.
- Inanov, A.; Adams, P.D. 2011. A damage limitation exercise. *Nature Cell Biology*, 13(3): 193-195.
- Irimia, M.; Maeso, I.; Gunning, P.W.; Garcia-Fernàndez, J.; Roy, S.W. 2010. Internal and External Paralogy in the Evolution of Tropomyosin Genes in Metazoans, *Molecular Biology and Evolution*, 27(7): 1 504–1517.
- Janco, M.; Suphamungmee, W.; Li, X.; Lehman, W.; Lehrer, S.; Geeves, M. 2013. Polymorphism in tropomyosin structure and function. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 34: 177-187.
- Jurka, J.; Kapitonov, V.V.; Pavlicek, A.; Klonowski, P.; Kohany, O.; Walichiewicz, J. 2005. Repbase update, a database of eukaryotic repetitive elements. *Cytogenetic and Genome Research*, 110: 462–467.
- Kidwell, M.G. 2002. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. *Genetica*, 115: 49-63.

King, D.G.; Kashi, Y. 2009. Heretical DNA sequences? Science, 326: 229-230.

Kouzarides, T. 2007. Chromatin modifications and their function. Cell, 128: 693-705.

- Larson, K.; Yan, S.; Tsurumi, A.; Liu, J.; Zhou, J.; Gaur, K.; Guo, D.; Eickbush, T.H.; Li, W.X. 2012. Heterochromatin Formation Promotes Longevity and Represses Ribosomal RNA Synthesis. *Plos One Genetics*, 8: e 1002473.
- Levan, A.; Fredga, K.; Sandberg, A.A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220.
- Lowe-McConnell, R.H. 1975. Fish communites in tropical freshwaters. Logaman Publishing, 337p.
- Marston, S; Gautel, M. 2013. Introducing a special edition of the Journal of Muscle Research and Cell Motility on tropomyosin: form and function. *The Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 34: 151 - 153.
- Marston, S. 2014. Important announcement: a rational nomenclature for tropomyosin variants. *The Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 34: Editorial.
- Martins, C.; Giuliano-Caetano, L.; Dias, A.L. 1996. Occurrence of a B chromosome in *Cyphocharax modesta* (Pisces, Curimatidae). *Cytobios*, 85: 247–253.
- Martins, C.; Galetti, P.M. 1999. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Research*, 7: 363-367.
- Martins, C. 2007. Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In: Pisano, E.; Ozouf-Costaz, C.; Foresti, F.; Kapoor, B.G. (eds). *Fish Cytogenetics*, Inc., Science Publisher, New Hampshire, USA. p. 421-453.
- Martins, C.; Cabral-de-Mello, D.C.; Valente, G.T.; Mazzuchelli, J.; Oliveira, S.G. 2011. Cytogenetic mapping and its contribution to the knowledge of animal genomes. In: *Advances in Genetics Research*, Vol. 4 Kevin V. Urbano (Ed.). Nova Science Publisher, Hauppauge, NY, USA. p. 1-82.
- Micco, R.D.; Sulli, G.; Dobreva, G.; Liontos, M.; Botrugno, O.A.; Gargiulo, G.; dal Zuffo, R.; Matti, V.; d'Ario, G.; Montani, E.; Mercurio, C.; Hahn, W.C.; Gorgoulis, V.; Minucci,

S.; Fagagna, d'A. 2011. Interplay between oncogene-induced DNA damage response and heterochromatin in senescence and cancer. *Nature Cell Biology*, 13(3): 292-302.

- Milhomem, S.S.R.; Scacchetti, P.C.; Pieczarka, J.C.; Ferguson-Smith, M.A.; Pansonato-Alves, J.C.; O'Brien, P.C.M.; Foresti, F.; Nagamachi, C.Y. 2013. Are NORs always located on homeologous chromosomes? A FISH investigation with rDNA and whole chromosome probes in *Gymnotus* fishes (Gymnotiformes). *Plos One*, 8(2): e55608.
- Molina, W.F. 2007. Chromosomal changes and stasis in marine fish groups. In: Pisano, E.; Ozouf-Costaz, C.; Foresti, F.; Kapoor, B.G. (Eds.). *Fish Cytogenetics*. Enfield, NH: Science Publishers. p.69-110.
- Monagham, P. 2010. Telomeres and life histories: the long and the short of it. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1206: 130-142.
- Moura, N.A.; Val, A.L. 2000. Maturidade sexual de Psectrogaster duriventris (Eigenmann e Kennedy, 1903) e Potamorhina squamoralevis (Braga e Azpelicueta, 1983) no pantanal de Mato Grosso. III Simpósio sobre recursos naturais e sócio-econômicos do Pantanal: desafios do novo milênio. Corumbá, MS.
- Multani, A.S.; Ozen, M.; Furlong, C.L.; Zhao, Y.J.; Hsu, T.C., Pathak, S. 2006. Heterochromatin and interstitial telomeric DNA homology. *Chromosoma*, 110: 214-220.
- Nanda, I.; Schrama, D.; Feichtinger, W.; Haaf, T.; Schartl, M.; Schmid, M. 2002. Distribution of telomeric (TTAGGG) sequences in avian chromosomes. *Chromosoma*, 111: 215-227.
- Navarrete, A.C. 1996. Estudos citogenéticos sobre Curimatidae do pantanal do Mato Grosso do Sul (Osteichthyes: Characiformes: Curimatidae). Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná. 26p.
- Navarrete, M.C.; Júlio-Júnior, H.F. 1997. Cytogenetic analysis of four curimatids from the Paraguay basin, Brazil (Pisces: Characiformes: Curimatidae). Cytologia, 62: 241–247.
- Nirchio, M.; Rossi, A.R.; Foresti F.; Oliveira, C. 2014. Chromosome evolution in fishes: a new challenging proposal from Neotropical species. *Neotropical Ichthyology*, DOI: 10.1590/1982-0224-20130008

Ocalewicz, K. 2013. Telomeres in fishes. Cytogenetics and Genome Research, 141: 114-125.

- Okada, N.; Hamada, M.; Ogiwara, I.; Ohshima, K. 1997. SINEs and LINEs share common 39 sequences: a review. *Gene*, 205: 229-243.
- Oliveira, C.; Foresti, F. 1993. Occurrence of supernumerary microchromosomes in Steindachnerina insculpta (Pisces, Characiformes, Curimatidae). *Cytobios* 76:183–186.
- Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L.F.; Foresti, F.; Toledo-Filho, S.A. 1988. Supernumerary chromosomes, robertsonian rearrangement and multiple NORs in *Corydoras aeneus* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). *Caryologia*, 41: 227-236.
- Oliveira, R.M. 2010. *Citogenética clássica e molecular de três espécies de curimatídeos, com ênfase no cromossomo B de* Cyphocharax nagelii (*Characiformes, Curimatidae*). Tese de doutorado, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo.
- Ozouf-costaz, C.; Brandt, J.; Körting, C.; Pisano, E.; Bonillo, C.; Coutanceau, J.; Volff, J. 2004. Genome dynamics and chromosomal localization of the non-LTR retrotransposons Rex1and Rex3in Antarctic fish.Antarct Sci 16:51-57
- Panopoulou, G.; Hennig, S.; Groth, D.; Krause, A.; Poustka, A.J.; Herwig, R.; Vingron, M.; Lehrach, H. 2003. New evidence for genome-wide duplications at the origin of vertebrates using an amphioxus gene set and completed animal genomes. *Genome Research*, 13(6A): 1056-1066.
- Pathak, D.; Ali, S. 2012. Repetitive DNA: A Tool to Explore Animal Genomes/Transcriptomes. In: *Functional Genomics*. INTECH (Ed.) Rijeka, Croatia, p.155-180.
- Perpelescu, M.; Fukagawa, T. 2011. The ABCs of CENPs. Chromosoma, 120(5): 425-46.
- Perry, S.V. 2001. Vertebrate tropomyosin: distribution, properties and function. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 22(1): 5-49.
- Pansonato-Alves, J.C.; Hilsdorf, A.W.S.; Utsunomia, R.; Silva, D.M.Z.A.; Oliveira, C.; Foresti, F. 2013. Chromosomal Mapping of Repetitive DNA and Cytochrome C Oxidase I Sequence Analysis Reveal Differentiation among Sympatric Samples of Astyanax fasciatus (Characiformes, Characidae). *Cytogeneticy and Genome Research*, 141:133– 142.

- Pinkel, D.; Straume, T.; Gray, J.W. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 83: 2934-2938.
- Postepska-Igielska, A.; Krunic, D.; Schmitt, N.; Greulich-Bode, K.M.; Boukamp, P.; Grummt, I. 2013. The chromatin remodelling complex NoRC safeguards genome stability by heterochromatin formation at telomeres and centromeres. *EMBO reports*, 14(8): 704-710.
- Pouilly, M.; Rodriguez, M. A. 2004. Determinism of fish assemblage structure in Neotropical floodplain lakes: Influence of internal and landscape lake condition. *Proceedings of the Second International Symposium on the Management of Large Rivers for Fisheries* (LARS2), Bangkok, Thailand, p.243 – 265.
- 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.
- Resende, E.K.; Pereira, R.A.C. 2008. *Metodologia para determinação de dieta alimentar de peixes detritívoros*. Corumbá: Embrapa Pantanal. 4p.
- Ridley, M. 2006. Evolução. 3ra ed. Editora Artmed, 752p.
- Rocchi, M.; Archidiacono, N.; Schempp, W.; Capozzi, O.; Stanyon, R. 2012. Centromere repositioning in mammals. *Heredity*, 108(1): 59-67.
- Rosa, L.V.S.; Wasco, A.P.; Oliveira, C.; Martins, C.; Foresti, F. 2004. Análise citogenética em espécies de peixes da família Curimatidae (Characiformes, Characidae). 50° Congresso Brasileiro de Genética, Santa Catarina, Brasil.
- Rosa, L. V. S.; Foresti, F.; Wasko, A. P.; Oliveira, C.; Martins, C. 2006. Nucleotide sequence, genomic organization and chromosome localization of 5S rDNA in two species of Curimatidae (Teleostei, Characiformes). *Genetics and Molecular Biology*, 29, 2, 251-256.

- Rosa, L.V.S.; Foresti, F.; Martins, C.; Oliveira, C.; Sobrinho, P.E.; Wasko, A.P. 2007.
 Cytogenetic analyses of two Curimatidae species (Pisces, Characiformes) from the Paranapanema and Tiete Rivers. *Brazilian Journal of Biology*, 67: 333-338.
- Rosa, L.V.S.; Foresti, F.; Martins, C.; Oliveira, C.; Wasko, A.P. 2008. Identification and description of distinct B chromosomes in Cyphocharax modestus (Characiformes, Curimatidae). *Genetics and Molecular Biology*, (31) 1:265-269.
- Ruffino, M.L.; Lopes, J.R.U.; Soares, E.C.; Silva, C.O.; Barthem, R.B.; Batista, V.; Estupinãn, G.; Isaac, V.J.; Fonseca, S.; Pinto, W. 2005. *Estatística Pesqueira do Amazonas e Pará* – 2002. Manaus: IBAMA/ProVárzea, 84p.
- Ruffino, M.L.; Silva, E.C.S.; Silva, C.O.; Barthem, R.B.; Silva, V.B.; Estupian, G., Willer, P.
 2006. *Estatística Pesqueira do Amazonas e Pará* 2003. Manaus: IBAMA/Provárzea, 76 p.
- Sambrook, J.; Russell, D.W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Vol. I. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY. p. 633-664.
- Sampaio, T.R.; Gravena, W.; Gouveia, J.G.; Giuliano-Caetano, L.; Dias A.L. 2011. B microchromosomes in the family Curimatidae (Characiformes): mitotic and meiotic behavior. *Comparative Cytogenetics*, 5(4): 301–313.
- Santaguida, S.; Musacchio, A. 2009. The life and miracles of kinetochores. *EMBO Journal*, 28(17): 2511-31.
- Santos, L.V.D.R.; Foresti, F.; Wasko, A.P.; Oliveira, C.; Martins, C. 2006. Nucleotide sequence, genomic organization and chromosome localization of 5S rDNA in two species of Curimatidae (Teleostei, Characiformes). *Genetics and Molecular Biology*, 29(2): 251-256.
- Schneider, C.H.; Gross, M.C.; Terencio, M.L.; Artoni, R.F.; Vicari, M.R.; Martins, C.; Feldberg, E. 2012. Chromosomal evolution of Neotropical cichlids: the role of repetitive DNA sequences in the organization and structure of karyotype. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 23: 201-214.

- Schneider, C.H. 2013. Mapeamento cromossômico comparativo de ciclídeos amazônicos utilizando sequências repetitivas de DNA. Tese de doutorado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia, Amazonas.
- Sumner, A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, 75: 304-306.
- Terencio, M.L.; Schneider, C.H.; Gross, M.C.; Vicari, M.R.; Feldberg, E. 2012. Stable Karyotypes: a general role for the fish of the family Prochilondontidae? *Hydrobiologia*, 686: 147-156.
- Terencio, M.L. 2013. Mapeamento físico cromossômico de elementos repetitivos em <u>Semaprochilodus</u> spp. (Characiformes, Prochilodontidae): estudo comparativo em diferentes tipos de águas amazônicas. Tese de doutorado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Amazonas. 103p.
- Terribele, R.; Gravena, W.; Carvalho, K.; Giuliano-Caetano, L.; Dias, A.L. 2008. Karyotypic analysis in two species of fishes of the family Curimatidae: AgNO₃, CMA₃ and FISH with 18S probe. *Caryologia*, 61(3): 211-215.
- Thomé-Souza, M.J.F.; Raseira, M.B.; Ruffino, M.L.; Silva, C.O.; Batista, V.S.; Barthem, R.B.; Amaral, E.S.R. 2007. *Estatística Pesqueira do Amazonas e Pará* – 2004. Manaus: IBAMA/ProVárzea, 74p.
- Toit, A.D. 2012. Chromatin: Defining heterochromatin. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13: 684-685.
- Thompson, J.D.; Higgins, D. G.; Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22, 4673–4680.
- Toramoto, T.; Ikeda, D.; Ochiai, Y; Minoshima, S.; Shimizu, N.; Watabe, S. 2004. Multiple gene organization of puferish *Fugu rubripes* tropomyosin isoforms and tissue distribution of their transcripts. *Gene*, 331: 41-51.
- Tsurumi, A.; Willis, W. 2012. Global heterochromatin loss: A unifying theory of aging? *Epigenetics*, 7(7): 680-688.

- Vari, R.P. 1982. Systematics of the Neotropical characoid genus *Curimatopsis* (Pisces, Characoidei). *Smithsonian Contributions to Zoology*, 373: 1-28.
- Vari, R.P. 1983. Phylogenetic relationships of the families Curimatidae, Prochilodontidae, Anostomidae, and Chilodontidae (Pisces: Characiformes). Smithsonian Contributions to Zoology, 378: 1-60.
- Vari, R.P. 1984. Systematics of the Neotropical Characiform Genus *Potamorhina* (Pisces: Characiformes). *Smithsonian Contributions to Zoology*, 400: 1-36.
- Vari, R.P. 1987. The Curimatidae a lowland Neotropical fish family (Pisces, Characiformes): distribution, endemism and phylogenetic biogeography. In: Heyer, W.R.; Vanzolini, P.E. (eds.), *Neotropical Distribution Patterns: Proceedings of a 1987 Workshop*.
- Vari, R.P. 1989. A phylogenetic study of the Neotropical characiform family Curimatidae (Pisces: Ostariophysi). Smithsonian Contributions to Zoology, 471: 1-71.
- Vari, R.P. 2003. Family Curimatidae. In: Reis, R.E.; Kullander, S.O.; Ferraris Jr, C.J. Check list of the freshwater fishes of South and Central America. EDIPUC, Rio Grande do Sul, p. 51-64.
- Varriale, A.; Torelli, G.; Bernardi, G. 2008. Compositional properties and thermal adaptation of 18S rRNA in vertebrates. *RNA*, 14: 1492-1500.
- Venere, P.C. 1991. Citogenética comparativa de peixes da família Curimatidae (Characiformes). Dissertação de mestrado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brazil.
- Venere, P.C.; Galetti Jr., P.M. 1985. Natural triploidy and chromosome B in the fish *Curimata modesta* (Curimatidae, Characiformes). *Brazilian Journal of Genetics*, 8: 681-687.
- Venere, P.C.; Galetti Jr., P.M. 1989. Chromosome relationships of some Neotropical Characiformes of the family *Curimatidae*. *Brazilian Journal of Genetics*, 12(1): 17-25.
- Venere, P.C.; Galetti Jr., P.M. 1995. Multiple longitudinal bands in fish chromosomes: comparison of structural G-banding and replication R bands among curimatids. *Cytobios*, 84: 71–78.

- Venere, P.C.; Miyazawa, C.S.; Galetti Jr., P.M. 1999. New cases of supernumerary chromosomes in characiform fishes. *Genetics and Molecular Biology*, 22: 345–349.
- Venere, P.C.; Ferreira, I.A.; Martins, C.; Galetti Jr, P.M. 2004. A novel ZZ/ZW sex chromosome system for the genus Leporinus (Pisces, Anostomidae, Characiformes). *Genetica* 121:75-80.
- Venere, P.C.; Souza, I.L.; Silva, L.K.S.; dos Anjos, M.B.; de Oliveira, R.R.; Galetti Jr.; P.M. 2008. Recent chromosome diversification in the evolutionary radiation of the freshwater fish family *Curimatidae* (Characiformes). *Journal of Fish Biology*, 72: 1976–1989.
- Volff, J.N.; Korting, C.; Sweeney, K.; Schartl, M. 1999. The non -LTR retrotransposon Rex3 from the fish *Xiphophorus* is widespread among teleosts. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 1427-1438.
- Volff, J.N.; Kor ting, 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.; Bouneau, L.; Ozouf-Costaz, C.; Fischer, C. 2003. Diversity of retrotransposable elements in compact pufferfish genomes. *Trends in Genetics*, 19: 674-678.
- Volff, J. N. 2005. Genome evolution and biodiversity in teleost fish. *Heredity*, 94, 280 294.
- Vrhovski, B.; Thézé, N.; Thiébaud, P. 2008. Structure and Evolution of Tropomyosin Genes Advances in Experimental Medicine and Biology, 644: 6-26.
- Winemiller, K.O. 1989. Ontogenetic diet shifts and resource partitioning among piscivorous fishes in the Venezuelanilanos. *Environmental Biology of Fishes*, 26: 177-199.
- Wicker, T.; Robertson, J.S.; Schulze, S.R.; Feltus, F.A.; Magrini, V.; Morrison, J.A.; Mardis, E.R.; Wilson, R.K.; Peterson, D.G.; Paterson, A.H.; Ivarie, R. 2005. The repetitive landscape of the chicken genome. *Genome Research*, 15: 126–136.
- Wicker, T.; Sabot, F.; Hua-Van, A.; Bennetzen, J.L.; Capy, P.; Chalhoub, B.; Flavell, A.; Leroy, P.; Morgante, M.; Panaud, O.; Paux, E.; SanMiguel, P.; Schulman, A.H. 2007. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Genetics*, 8: 973-982.

- Yano, C.F.; Bertollo, L.A.C.; Molina, W.F.; Liehr, T.; Cioffi, M.B. 2014. Genomic organization of repetitive DNAs and its implications for male karyotype and the neo-Y chromosome differentiation in *Erythrinus erythrinus* (Characiformes, Erythrinidae). *Comparative Cytogenetics*, 89(2): 139-151.
- Ye, J.; Renault, V.M.; Jamet, K.; Gilson, E. 2014. Transcriptional outcome of telomere signalling. *Genetics*, 15: 491-503.