



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA AQUÁTICA E PESCA

LUCIANO FARIAS SOUZA

**MAPEAMENTO FÍSICO DE FAMÍLIAS MULTIGÊNICAS EM ESPÉCIES DE  
LORICARIIDAE (SILURIFORMES)**

BELÉM – PA

2019

LUCIANO FARIAS SOUZA

**MAPEAMENTO FÍSICO DE FAMÍLIAS MULTIGÊNICAS EM ESPÉCIES DE  
LORICARIIDAE (SILURIFORMES)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aquática e Pesca da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do título de mestre em Ecologia Aquática e Pesca.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata Coelho Rodrigues Noronha.

**Banca Examinadora:**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata Coelho Rodrigues Noronha (Presidente)

Prof. Dr. João Bráullio de Luna Sales (membro)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cleusa Yoshiko Nagamachi (membro)

Prof. Dr. Leonardo dos Santos Sena (membro)

Prof. Dr. Jonathan Stuart Ready (suplente)

Prof. Dr. Julio Cesar Pieczarka (suplente)

BELÉM - PA

2019

LUCIANO FARIAS SOUZA

**MAPEAMENTO FÍSICO DE FAMÍLIAS MULTIGÊNICAS EM ESPÉCIES DE  
LORICARIIDAE (SILURIFORMES)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aquática e Pesca, da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de mestre em Ecologia Aquática e Pesca.

Banca examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata Coelho Rodrigues Noronha (Presidente)  
Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aquática e Pesca (ICB/UFPA)

---

Prof. Dr. João Bráullio de Luna Sales (membro)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cleusa Yoshiko Nagamachi (membro)

---

Prof. Dr. Leonardo dos Santos Sena (membro)

---

Prof. Dr. Jonathan Stuart Ready (suplente)

---

Prof. Dr. Julio Cesar Pieczarka (suplente)

BELÉM – PA

2019

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez” (George Bernard Shaw).

Dedico este trabalho à duas  
pessoas que amo muito nessa vida:

Minha mãe Maria de Assunção e  
minha irmã Lohanna Souza.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por todas as graças concedidas e por iluminar minha caminhada durante os anos de graduação e pós-graduação.

À minha orientadora Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Renata Noronha pelos anos de pesquisa. Sou muito grato pelas oportunidades que me foram concedidas e pela confiança no meu trabalho. Sempre busquei oferecer o meu melhor. Gratidão!

Aos professores coordenadores do CEABIO Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Cleusa Yoshiko Nagamachi e Prof. Dr. Julio Cesar Pieckzarka pelo apoio e infraestrutura necessária para a realização desse trabalho.

Ao meu amigo da cultura de células MSc. Jorge Rissino pelos ensinamentos das principais técnicas e por ser a pessoa mais “enjoada” do mundo, mas que admiro muito!

À técnica e amiga da sala de reagentes MSc. Shirley Nascimento. Obrigado por todo aprendizado não só no preparo de soluções, mas pelo aprendizado de vida.

Aos colegas do grupo de peixes Ananda, Milla, Paula, Luan, Kevin, Fernando e Carlos pelo trabalho em equipe.

Aos mestres Bruno Almeida e Manoella Gemaque pelo aprendizado e auxílio na produção de sondas que foi uma etapa fundamental para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos de laboratório, em especial, Luana, Marlyson, Karina, Paulinha, Vergiana, Vinicius e a todos os demais deixo meu muito obrigado pelos momentos felizes que vivenciamos no CEABIO e fora dele também.

À minha mãe que amo muito! Obrigado por todos ensinamentos e por ser a principal responsável pelas minhas maiores conquistas. Por me acompanhar nas minhas vitórias e derrotas e por sempre estar ao meu lado para o que der e vier.

À minha irmã Lohanna Souza pelos anos de amizade e companheirismo. Sempre com uma palavra amiga, um olhar sincero e uma visão de mundo bastante sensata. Obrigado também por me motivar e me apoiar em todos os meus projetos de vida.

Ao meu querido Yuri Barra por ter me acompanhado durante todo esse processo e por estar ao meu lado nos momentos felizes, tristes e complicados com suas palavras positivas e um olhar otimista me fazendo rir até nos momentos de total desespero.

À minha grande amiga da vida Paula Machado por sempre lançar um olhar para o futuro buscando crescimento pessoal e profissional. Minha grande inspiração de vida.

A todos os órgãos de apoio e financiamento envolvidos durante a realização desse trabalho: UFPA, PPGEAP, CAPES, CEABIO e CNPq.

## RESUMO

A família Loricariidae apresenta a maior riqueza de peixes bagres Neotropicais sendo considerada a maior família da ordem Siluriformes com mais de 900 espécies válidas distribuídas em 100 gêneros, entre eles *Scobinancistrus* e *Spatuloricaria*. Estudos citogenéticos em Loricariidae demonstram uma grande variação no grupo, indicando a ocorrência de diferentes tipos de rearranjos cromossômicos. Os DNAs repetitivos correspondem a uma parcela considerável do genoma dos eucariotos e por muito tempo foram considerados como não-codificantes ou “DNA lixo”. No entanto, atualmente sabe-se que estas sequências podem estar envolvidas na organização estrutural e funcional do genoma e estão classificadas em codificantes, representadas pelas famílias multigênicas (DNA ribossomal, DNA histônico e pequenos RNAs nucleares) e não codificantes podendo se organizar em blocos (*in tandem*), incluindo os DNAs satélites, ou dispersas pelo genoma. A técnica de FISH representou um importante avanço em estudos citogenéticos permitindo a visualização de sequências específicas de DNA nos cromossomos. Nesse contexto, realizamos o mapeamento dos genes de Histonas (H1-H3) e snDNA U2 nas espécies *Scobinancistrus aureatus*, *Scobinancistrus pariolispos* e *Spatuloricaria* sp. e a segunda descrição cariotípica de um citótipo do gênero *Spatuloricaria* que apresentou  $2n=66$  e  $NF=82$ . O mapeamento com genes de histonas H1 e H3 evidenciou marcações semelhantes nas duas espécies de *Scobinancistrus* com sinais dispersos ao longo dos cromossomos. Em *Spatuloricaria* sp. estas sequências mostraram-se formando *clusters* na região terminal dos cromossômicos com H1 apresentando sinais nos 3 primeiros pares e H3 apenas nos 2 primeiros. Sugerimos a colocalização dessas sequências nos pares 1 e 2 dessa espécie. SnDNA U2 apresentou padrões distintos nas três espécies, com marcações pericentroméricas em apenas um cromossomo nos pares 3 e 18 de *S.aureatus* e no par 15 de *S. pariolispos*. Na espécie *Spatuloricaria* sp. observamos sinais de marcação na região intersticial do braço longo do par 1. Os diferentes padrões de marcação observados no presente estudo ressaltam a importância do uso de marcadores moleculares em estudos citogenômicos para a compreensão da estrutura e dinâmica organizacional dos genomas de peixes e da família Loricariidae.

Palavras-chave: DNAs repetitivos, famílias multigênicas, histonas, snDNA U2

## SUMÁRIO

RESUMO .....	iv
1 INTRODUÇÃO .....	1
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A FAMÍLIA LORICARIIDAE .....	1
1.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE OS GÊNEROS <i>Spatuloricaria</i> e <i>Scobinancistrus</i> .....	2
1.3 ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM LORICARIIDAE.....	5
1.4 DNAs REPETITIVOS .....	7
1.4.1 Aspectos gerais e classificação .....	7
1.4.2 Famílias multigênicas .....	9
1.4.3 Mapeamento físico de famílias multigênicas em Loricariidae .....	11
2 OBJETIVOS .....	12
2.1 OBJETIVO GERAL.....	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	12
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	12
3.1 AMOSTRAS.....	12
3.2 OBTENÇÃO DE CROMOSSOMOS MITÓTICOS.....	12
3.3 PREPARAÇÃO CITOLÓGICA DAS LÂMINAS .....	13
3.4 TÉCNICA DE COLORAÇÃO CONVENCIONAL.....	13
3.5 EXTRAÇÃO DE DNA.....	13
3.6 ISOLAMENTO DE DNAs REPETITIVOS.....	14
3.7 MARCAÇÃO DAS SONDAS .....	14
3.8 TÉCNICA DE HIBRIDIZAÇÃO <i>in situ</i> FLUORESCENTE. ....	14
3.8.1 LAVAGEM DE ESTRINGÊNCIA .....	15
3.9.2 CAPTURA DE IMAGENS.....	15
4 CAPÍTULO 1.....	16
Descrição cariotípica e mapeamento físico de famílias multigênicas (Histonas H1-H3 e snRNA U2) nas espécies <i>Spatuloricaria</i> sp., <i>Scobinancistrus aureatus</i> e <i>Scobinancistrus pariolispos</i> (Siluriformes, Loricariidae).	
5 CONCLUSÕES.....	36
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A FAMÍLIA LORICARIIDAE

A família Loricariidae apresenta a maior riqueza de peixes bagres Neotropicais sendo considerada a maior família da ordem Siluriformes com mais de 900 espécies válidas compreendendo 100 gêneros (ESCHMEYER & FONG, 2018). Os peixes desta família possuem uma grande diversidade em sua morfologia e nos padrões de coloração (ISBRÜCKER, 1980; ARMBRUSTER, 2004) com distribuição geográfica que abrange a América central e do Sul (ARMBRUSTER, 2004) representando um importante componente da ictiofauna dulcícola (ISBRÜCKER, 1980).

Os loricarídeos são popularmente conhecidos como “cascudos” ou “acaris” e entre suas principais características diagnósticas estão: a presença de placas ósseas recobrimdo o corpo, boca inferior modificada em grandes lábios formando um disco de sucção e dentes dérmicos denominados odontódeos (BURGESS, 1989; SILVANO et al., 2001) (Figura 1). Estas especializações permitem que algumas espécies possuam grandes distribuições, muito embora as mesmas possam apresentar preferência por determinados ambientes (ARMBRUSTER, 2004; MENEZES et al. 2007; CHIACHIO et al. 2008). Podem ser encontrados em habitats lóticos e lênticos (REIS et al., 2003) com expressiva abundância e biomassa em ambientes de corredeiras de rios (ZUANON, 1999) ocupando preferencialmente as regiões bentônicas em bancos de areia e leitos rochosos, além de possuírem hábitos noturnos. No período diurno costumam abrigar-se entre pedras ou troncos de árvores (WEBER, 2003).



**Figura 1:** Exemplar da espécie *Peckoltia greedoi* sp. A) Placas ósseas sobre o corpo (seta branca); B) Boca em forma de disco (seta branca). Retirado e adaptado de ARMBRUSTER et al., 2015.

Em Loricariidae são encontrados bagres de pequeno a médio porte, porém, algumas espécies podem chegar a quase 1m de comprimento (LUJAN et al., 2010). Alimentam-se

principalmente de algas e detritos (BUCK & SAZIMA, 1995), além de espécies com especializações morfológicas para o consumo de madeira, sementes e até macroinvertebrados (LUJAN et al., 2011). Os loricarídeos apresentam uma grande capacidade adaptativa contendo espécies que desempenham uma respiração acessória ou aérea, que é obtida pelo estômago, garantindo a estes organismos a sobrevivência em ambientes com baixo aporte de oxigênio ou até mesmo fora da água por um curto período de tempo (ARMBRUSTER, 1998; LOWE-MCCONNELL, 1999).

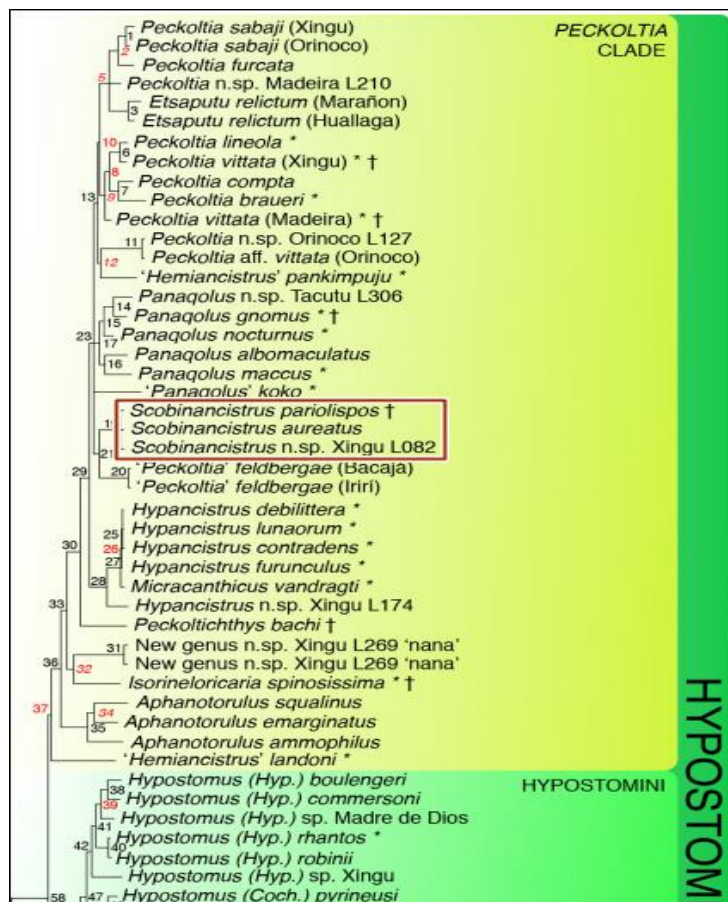
Os peixes desta família possuem grande importância econômica uma vez que as espécies de grande porte são utilizadas na pesca de subsistência e comercial e as de pequeno porte na aquarofilia com destaque para as espécies amazônicas com suas formas exóticas e coloridas (SANTOS et al., 2006). O Estado do Pará tem um importante papel na exploração de peixes ornamentais sendo o principal exportador de peixes da família Loricariidae com cerca de 60 espécies exportadas pelo mercado de espécies ornamentais brasileiro, além daquelas que são comercializadas ilegalmente ou que não possuem classificação taxonômica definida (PRANG, 2007).

A classificação sistemática de Loricariidae tem passado por uma série de revisões e segundo Lujan et al., (2015) foram realizados por volta de 36 estudos filogenéticos reunindo dados morfológicos e moleculares. Armbruster (2004) demonstrou que a taxonomia de Loricariidae ainda é bastante confusa resultando em problemas na classificação de suas subfamílias. A família encontra-se dividida em sete subfamílias: Lithogeninae, Delturinae, Hypoptopomatinae, Neoplecostominae, Loricariinae, Hypostominae e Otothyrinae (SCHAEFER, 1987; ARMBRUSTER, 2004; REIS et al., 2006; CHIACHIO et al., 2008; ROXO et al., 2014) onde Hypostominae apresenta a maior riqueza de espécies com 40 gêneros e mais de 400 espécies válidas (ARMBRUSTER, 2004; LUJAN et al., 2015; REIS et al., 2006) seguida de Loricariinae com mais de 200 espécies válidas (ESCHEMEYER & FONG, 2018) distribuídas em 32 gêneros (COVAIN et al., 2016).

## 1.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE OS GÊNEROS *Scobinancistrus* e *Spatuloricaria*

O gênero *Scobinancistrus* pertence à subfamília Hypostominae (CRAMER et al., 2011; LUJAN et al., 2015) e assim como a maior parte dos *taxa* de Loricariidae apresenta problemas de nível taxonômico. Armbruster (2004) e Lujan et al., (2010) reconheceram três

subgêneros dentro de *Panaque* que inclui *Scobinancistrus* juntamente com *Panaque* e *Panaqolus*. Lujan et al., (2015), através de análises de dados moleculares, propuseram uma filogenia onde esses gêneros foram realocados. Desse modo, o gênero *Panaque* foi inserido no clado Hemiancistrus com *Scobinancistrus* e *Panaqolus* sendo transferidos para o clado Peckoltia (Figura 2). O gênero *Spatuloricaria* por sua vez pertence a subfamília Loricariinae e faz parte da tribo Loricarinii (COVAIN et al., 2008; LUJAN et al., 2015) (Figura 3). A posição filogenética de *Spatuloricaria* ainda é considerada incerta em alguns níveis taxonômicos. Isbrucker (1979) alocou o gênero na subtribo Rineloricariina, porém Armbruster (2004), por meio de dados morfológicos, considerou *Spatuloricaria* em Planiloricariina. Nos trabalhos realizados por Covain et al., (2008) e Luajn et al., (2015) *Spatuloricaria* aparece dentro da subtribo Loricariina.

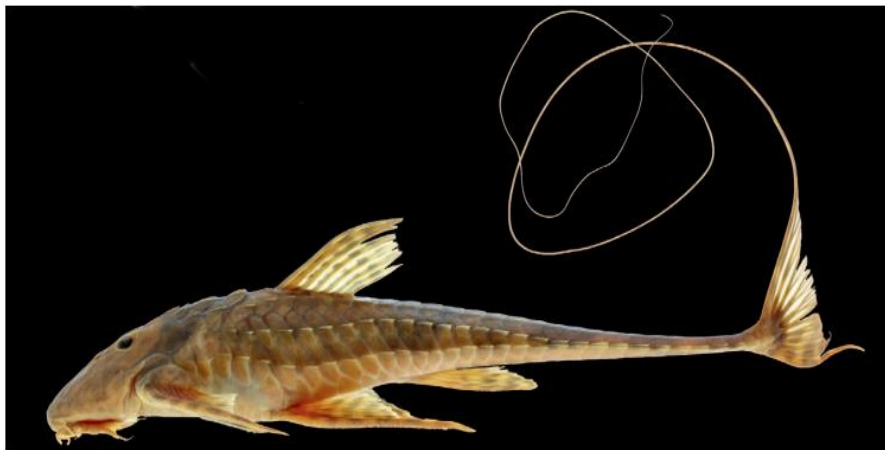


**Figura 2:** Cladograma da subfamília Hypostominae com base em dados moleculares com genes mitocondriais (16S e Cit b) e nucleares (RAG1, RAG2 e MyH3). Em destaque, as espécies do gênero *Scobinancistrus* do clado Peckoltia. Retirado de LUJAN et al., (2015).



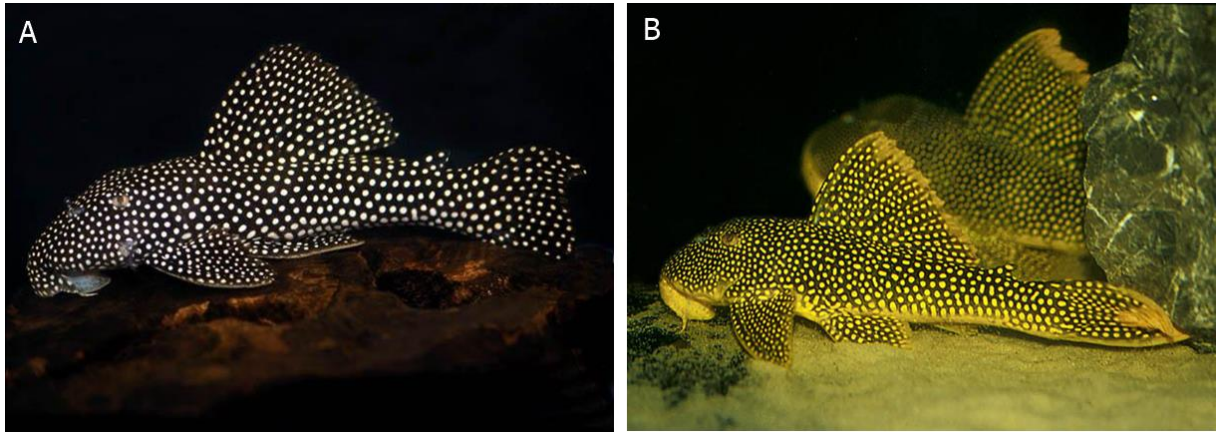
**Figura 3:** Filogenia da subfamília Loricariinae com destaque para a espécie *Spatuloricaria pujanensis* da tribo Loricariini. Retirado de LUJAN et al., (2015).

Atualmente são reconhecidas 12 espécies para o gênero *Spatuloricaria* e apenas 2 para *Scobinancistrus* (Fishbase). Quase todas as espécies de *Spatuloricaria* foram descritas entre a segunda metade do século XIX e a primeira metade do século XX e apenas *Spatuloricaria taira* teve sua descrição realizada no século XXI indicando a necessidade de maiores estudos de sistemática e uma revisão no gênero para a compreensão da diversidade desse táxon (LONDOÑO-BURBANO et al., 2018). Assim como outros membros da subfamília Loricariinae, as espécies do gênero *Spatuloricaria* caracterizam-se por apresentar o corpo deprimido, um pendúnculo caudal fortemente achatado e ausência da barbatana adiposa (Figura 4) (FICHBERG et al., 2014). Além disso é possível observar um dimorfismo sexual onde os machos maduros apresentam odontódeos hipertrofiados ao redor da margem da cabeça e da espinha peitoral. O gênero *Spatuloricaria* apresenta distribuição no Leste e Oeste dos Andes e em bacias no sul da América do Sul (ESCHMEYER et al., 2018; LONDOÑO-BURBANO et al., 2018).



**Figura 4:** Exemplar da espécie *Spatuloricaria terracanticum*. Retirado de LONDOÑO-BURBANO et al., 2018.

Das duas espécies de *Scobinancistrus*, a espécie *Scobinancistrus pariolispos* ocorre nos rios Tocantins e Tapajós enquanto que *Scobinancistrus aureatus* é endêmica do rio Xingu – PA (FISCH-MULLER, 2003; CAMARGO et al., 2012). A presença de um opérculo invertido, coloração e barbatana sem coloração alaranjada em forma de raio que se estende ao longo do tecido adiposo são características que diferem as duas espécies (Figura 5) (CAMARGO et al., 2012).



**Figura 5:** Espécies do gênero *Scobinancistrus*. A) *Scobinancistrus pariolispos* B) *Scobinancistrus aureatus* (Fonte: [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org). Foto: Johnny Jensen).

### 1.3 ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM LORICARIIDAE

Desde a década de 70 estudos citogenéticos clássicos e moleculares vêm contribuindo para a compreensão da taxonomia, sistemática e evolução cromossômica de diversos peixes Neotropicais (ALMEIDA-TOLEDO, 1998). Na família Loricariidae grande parte destes estudos limitam-se a descrição do número de cromossomos e a fórmula cariotípica, além do emprego maciço de diferentes técnicas de citogenética clássica. Ainda assim, são poucos os dados citogenéticos disponíveis na literatura para esta família considerando toda sua diversidade e riqueza de espécies. Com relação ao número diplóide ( $2n$ ), Loricariidae apresenta uma variação de 34 cromossomos observada em *Ancistrus cuiabae* (MARIOTTO et al., 2009) a 96 cromossomos em *Upsilonodus* sp. (KAVALCO et al., 2005) tendo o  $2n = 54$  como provável número diplóide basal (ARTONI & BERTOLLO, 2001). Outro tipo de variação bastante comum dentro desta família está relacionada à macroestrutura dos cromossomos, podendo ocorrer cariótipos compostos predominantemente por cromossomos metacêntricos e submetacêntricos ou por cromossomos subtelocêntricos e

acrocêntricos como observado em *Hypostomus strigaticeps* que apresenta  $2n=74$  e  $NF=86$  (MICHELE et al., 1977). As variações macroestruturais e numéricas observadas nos cariótipos de Loricariidae sugerem a ocorrência de vários rearranjos cromossômicos direcionando para uma evolução cariotípica bastante divergente (ARTONI & BERTOLLO, 2001).

Estudos citogenéticos realizados na família Loricariidae demonstram que a maior parte das espécies analisadas corresponde à subfamília Hypostominae com variação no número diploide de 38 a 80 cromossomos (ARTONI, 1996; ARTONI & BERTOLLO, 1996; ALVES et al., 2003). Entre os representantes desta subfamília podemos encontrar as espécies *Scobinancistrus aureatus* e *Scobinancistrus pariolispos* que possuem o mesmo número diploide ( $2n = 52$ ), no entanto, diferem quanto a sua fórmula cariotípica. Em Loricariinae, embora os dados citogenéticos sejam considerados escassos, as espécies analisadas indicam uma heterogeneidade e diversificação cromossômica (ARTONI & BERTOLLO, 2001; ARAI, 2011). Entre as espécies de Loricariinae estão as que pertencem ao gênero *Spatuloricaria* o qual possui apenas uma descrição citogenética na literatura (FERREIRA et al., 2014).

A maioria das espécies de peixes Neotropicais analisadas citogeneticamente não apresenta cromossomos sexuais diferenciados (MOREIRA-FILHO et al., 1993; CENTOFANTE et al., 2002). Em Loricariidae, de modo geral, esses cromossomos são homomórficos (ARTONI & BERTOLLO, 2001; ALVES et al., 2005; KAVALCO et al., 2005). Entretanto, alguns estudos relataram a ocorrência de cromossomos sexuais heteromórficos em algumas espécies desta família, principalmente do gênero *Ancistrus*, tais como: *Ancistrus* sp. 1, com o sistema XX/X0 (ALVES et al., 2006); *Ancistrus* sp. Purus, *Ancistrus* sp. Macoari (DE OLIVEIRA et al., 2009), *Ancistrus* cf. *dubius* (MARIOTTO & MIYAZAWA, 2006) com o sistema XX/XY; em *Ancistrus* sp. Balbina foi evidenciado o sistema XX/XY1Y2 (DE OLIVEIRA et al., 2008); ZZ/ZW foi descrito para *Ancistrus* cf. *dubius* (MARIOTTO et al., 2004), *Ancistrus ranunculus*, *Ancistrus* sp. Piagaçu (DE OLIVEIRA et al., 2007), *Hypostomus* sp. (ARTONI et al., 1999), *Hemiancistrus spilomma* (DE OLIVEIRA et al., 2006); e Z1Z1Z2Z2/Z1Z2W1W2 em *Ancistrus* sp. Barcelos (DE OLIVEIRA et al., 2008).

Os peixes representam mais da metade das espécies de vertebrados existentes e por constituírem um grupo extremamente diversificado, são modelos atrativos para o estudo de questões evolutivas relacionadas a diversos aspectos de sua biologia, incluindo a investigação

do funcionamento, estrutura e diversificação do genoma (KOCHER, 2004; VOLFF, 2005; NELSON, 2006). A partir de estudos com enfoque citogenético podem ser obtidas boas caracterizações cromossômicas de diferentes espécies, bem como um melhor estabelecimento das relações evolutivas dos cromossomos e cariótipos podendo evidenciar possíveis casos de espécies crípticas (BERTOLLO et al., 1986).

## 1.4 DNAs REPETITIVOS

### 1.4.1 Aspectos gerais e classificação

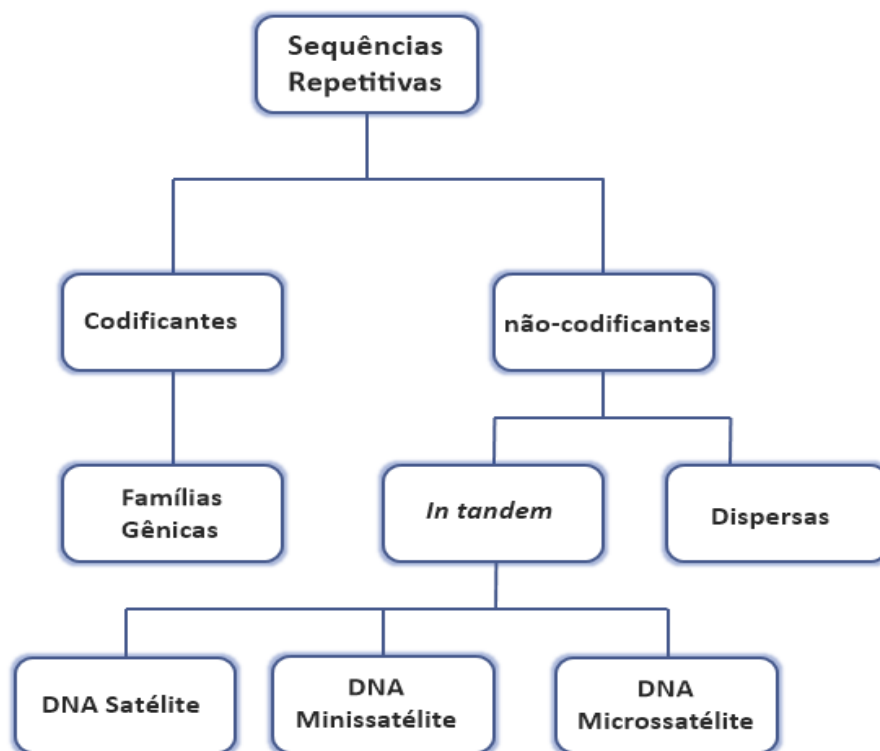
Espécies de diferentes grupos de organismos eucariotos apresentam uma ampla variação na quantidade de DNA refletindo diretamente no tamanho dos seus genomas. Esta variação não está relacionada com a quantidade de genes apresentados e ocorre independentemente da complexidade do organismo (GREGORY, 2005). Acredita-se que as diferenças de tamanho encontradas entre esses genomas sejam decorrentes de diferentes quantidades de DNAs repetitivos (DOOLITTLE & SAPIENZA, 1980; CAVALIER-SMITH, 1985; KIDWELL, 2002; GREGORY et al., 2007).

DNAs repetitivos são fragmentos de DNA presentes em múltiplas cópias no genoma (PATHAK & ALI, 2012) que podem estar repetidos centenas ou milhares de vezes em eucariotos representando em algumas espécies mais da metade do teor total do DNA nuclear da célula (BISCOTTI et al., 2015). Durante muito tempo as sequências da fração repetitiva foram classificadas como “DNA egoísta” (DOOLITTLE & SAPIENZA, 1980; ORGEL & CRICK, 1980) ou “DNA lixo”, entretanto, atualmente sabe-se que estas sequências desempenham um importante papel no genoma de um modo geral podendo estar envolvidas na sua organização estrutural e funcional (KAZAZIAN, 2004; BIÉMONTTE & VIEIRA, 2006) além de participarem de processos como rearranjos cromossômicos atuando em proporções significativas nas variações cariotípicas observadas em vários grupos (KIDWELL, 2002).

Diversos estudos demonstram que as sequências repetitivas podem estar associadas a várias funções (SHAPIRO, 2010) que vão desde a participação na estrutura dos cromossomos e no mecanismo de manutenção dos telômeros e centrômeros (PARDUE & DEBARYSHE, 2003; WONG; CHOO, 2004) até o envolvimento nos processos de replicação do DNA (LI et al., 2002), recombinação (BIET et al., 1999), expressão gênica (LIU et al., 2001; PEASTON et al., 2004; HAN & BOEKE, 2005; VOLFF, 2006) e na origem e evolução de cromossomos

sexuais e supranumerários (LYON, 2000; BACHTROG, 2005, 2006; STEINEMANN; STEINEMANN, 2005; PARISE-MALTEMPI et al., 2007; MATSUNAGA, 2009; CIOFFI et al., 2010).

DNAs repetitivos constituem sequências (idênticas ou semelhantes) classificadas nos genomas eucarióticos em codificantes, representadas pelas famílias multigênicas (DNA ribossomal, proteínas histônicas e pequenos RNAs nucleares) e não-codificantes, podendo se organizar em blocos (*in tandem*) incluindo os DNAs satélites, minissatélites e microssatélites. Além das sequências dispersas ao longo do genoma, como os elementos transponíveis (*Transposable Elements - TEs*). No entanto, em alguns casos, as sequências de TE podem ser encontradas formando *clusters* nos cromossomos (SUMNER, 2003; CHARLESWORTH et al., 1994; NAGODA, et al., 2005; MARTINS et al., 2011) (Figura 6). Estudos relacionados à organização e mapeamento físico dessas sequências possibilitam uma melhor caracterização da biodiversidade e carioevolução da ictiofauna.



**Figura 6:** Organização das classes de DNAs repetitivos em eucariotos (Fonte: adaptado de MARTINS et al., 2011).



O grupo de peixes apresenta em seu genoma diversas classes de DNAs repetitivos e muitos trabalhos têm caracterizado esse tipo de sequência, descrevendo sua organização no genoma e a relação destas com diferentes regiões cromossômicas, tais como regiões centroméricas, teloméricas e as regiões consideradas marcadores específicos de cromossomos sexuais e cromossomos B (LANFREDI et al., 2001; MARTINS, 2007; PARISE-MALTEMPI et al., 2007; FERREIRA & MARTINS, 2008; POLETTO et al., 2010; VALENTE et al., 2011). Ainda há muito o que compreender sobre essas sequências repetitivas no genoma de peixes, tendo em vista que este constitui um grupo extremamente diversificado e que representa mais da metade das espécies de vertebrados existentes (OZOUF-COSTAZ et al., 2004).

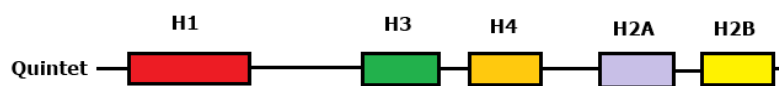
A aplicação de metodologias citogenéticas a nível molecular, representada pela técnica de Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH), permite realizar a identificação de porções diferenciadas da cromatina nos cromossomos, obter informações mais precisas acerca da presença de sequências específicas de DNA, ampliar o conhecimento sobre a estrutura e função cromossômica, detectar rearranjos cromossômicos, construir mapas gênicos e até mesmo estabelecer relações filogenéticas entre os componentes dos diferentes grupos biológicos (PHILLIPS & REED 1996; OLIVEIRA & WRIGHT 1998; HENNING et al. 2008).

#### 1.4.2 Famílias multigênicas

As famílias multigênicas são sequências de DNA que possuem similaridade estrutural e funcional originadas a partir de um gene ancestral comum (NEI & ROONEY, 2005). Acredita-se que tenham sido formadas por meio de uma série de eventos de duplicação durante a evolução e que o acúmulo de mutações ocorridas ao longo do tempo foi responsável pelas pequenas diferenças observadas hoje entre essas sequências gênicas. No entanto, uma característica comum a esse agrupamento gênico é a presença de um número considerável de pseudogenes, que mostram grande semelhança com os genes funcionais da mesma família, mas que perderam sua capacidade de expressão devido a mutações adquiridas (FARAH, 2007).

Entre as famílias multigênicas encontram-se os genes ribossomais (rDNA) organizados em duas famílias distintas compostas por repetições organizadas *in tandem*:

rDNA 45S (incluindo 18S, 5.8S e 28S), que é responsável pela organização do nucléolo e rDNA 5S que é uma sequência de codificação altamente conservada de 120 pares de bases (pb) (LONG & DAWID, 1980). Outro agrupamento de multigenes são representados pelos genes de Histona. DNAs histônicos contêm sequências gênicas responsáveis por codificar cinco tipos de proteínas: H1, H2A, H2B, H3 e H4 (NAGODA et al., 2005), que estão entre as mais conservadas formas de proteínas presentes em todos os eucariotos, possuindo um importante papel em processos celulares, como na regulação da transcrição, formação da heterocromatina e no reparo do DNA (Figura 7). Os genes de histona constituem uma família multigênica complexa com um número variável de cópias agrupadas em uma ou mais regiões cromossômicas (CHILDS et al., 1981). Embora a família das histonas seja considerada como um excelente modelo para estudos de mapeamento cromossômico, segundo Cabrero et al., (2009), esses genes foram mapeados por hibridização *in situ* em apenas poucos organismos. No grupo de peixes com destaque para a família Loricariidae, apesar dos grandes avanços em análises citogenéticas com enfoque nos DNAs repetitivos considera-se que ainda há uma escassez de informação sobre a organização e distribuição dessas sequências.



**Figura 7:** Organização de famílias multigênicas em eucariotos superiores: genes de histona (Adaptado de: Martins et al., 2011)

Em peixes, os dados sobre a localização cromossômica das sequências de histonas já foram mapeados para os genes de histona H1, H3 e H4 (PENDÁS et al., 1994; HASHIMOTO et al., 2011, 2013; LIMA-FILHO et al., 2012; PANSONATO-ALVES et al., 2013a, 2013b; SILVA et al., 2013; PISCOR & PARISE-MALTEMPI, 2015), todos eles apresentando sequências de histonas como blocos conspícuos em cromossomos.

SnRNA U representa uma família multigênica de RNAs classificada em cinco tipos U1, U2, U4, U5, U6 que fazem parte de um grande complexo RNA-proteína conhecido como maquinaria spliceossômica (BRINGMANN & LUHRMANN, 1986; VALADKHAN, 2005). snRNA U2 participa da formação do spliceossomo, atuando ativamente no processo de maturação do mRNA (COLGAN et al., 1998). O gene U2 é altamente conservado no genoma de eucariotos. No entanto, o número de locais dessas sequências pode ser diferente entre as

espécies. Isso ocorre porque as famílias multigênicas podem adotar diferentes estratégias de conservação de suas sequências (MATERA et al., 1990). No grupo de peixes estas sequências foram mapeadas em espécies das famílias Batrachoididae, Characidae, Gymnotidae Merlucciidae e Moronidae (MERLO et al., 2010; ÚBEDA-MANZANARO et al., 2010; UTSUNOMIA et al., 2014; GARCÍA-SOUTO et al., 2015; SILVA et al., 2015).

Apesar de ainda existirem poucos trabalhos utilizando esses marcadores moleculares no grupo de peixes alguns desses estudos evidenciaram características particulares nos cariótipos analisados, como dispersão diferencial de sítios e associação com o rDNA 5S ou 18S (HASHIMOTO et al., 2011, 2013; LIMA-FILHO et al., 2012; PANSONATO-ALVES et al. 2013, 2013b). Outros trabalhos mostraram que os genes das histonas H1, H3 e H4 estão agrupados no mesmo local em peixes do gênero *Astyanax* (PANSONATO-ALVES et al., 2013b, SILVA et al., 2013). Utsunomia et al., (2014) observaram que as sequências de histonas H3 e H4 parecem estar ligadas uma à outra e que no gênero *Synbranchus* sua dispersão ocorre em pequenos grupos ao longo do genoma. Além disso, em alguns pares de cromossomos acrocêntricos, pode haver uma pequena acumulação desses sítios caracterizando um modo distinto de organização dessas sequências em cromossomos de peixes.

#### 1.4.3 Mapeamento físico de famílias multigênicas em Loricariidae

Em Loricariidae os principais estudos de mapeamento cromossômico utilizando sequências de famílias multigênicas foram voltados para os DNAs ribossomais e diversas análises citogenéticas têm sido realizadas, principalmente, com sondas de rDNAs 18S e 5S nesta família, entre os gêneros já estudados estão *Hypostomus* (BUENO et al., 2014; PANSONATO-ALVES et al., 2013; RUBERT et al., 2011; TRALDI et al., 2013), *Hypancistrus* (DA SILVA et al., 2014), *Harttia* (BLANCO et al., 2014; CENTOFANTE et al., 2006), *Ancistrus* (MARIOTTO et al., 2011), entre outros. A maioria destes estudos demonstra uma grande variação tanto no número desses sítios quanto na sua localização. Outra família multigênica utilizada em estudos citogenômicos são as Histonas (MARTINS et al., 2011). Na família Loricariidae o mapeamento físico de genes de Histonas é restrito ao gênero *Hypostomus*, sendo descrita apenas a histona H3 para três espécies: *Hypostomus ancistroides*, *H. strigaticeps* e *H. nigromaculatus*, localizadas predominantemente em região pericentromérica, mas também em região terminal de alguns cromossomos (PANSONATO-ALVES et al., 2013).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Entender a organização cromossômica e o papel das famílias multigênicas na diversidade cariotípica das espécies *Spatuloricaria* sp., *Scobinancistrus aureatus* e *Scobinancistrus pariolispos*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Descrever o cariótipo da espécie *Spatuloricaria* sp.
2. Isolar e caracterizar as sequências repetitivas dos genes de histona (H1 e H3) e snRNA U2 nas espécies *Spatuloricaria* sp., *Scobinancistrus aureatus* e *Scobinancistrus pariolispos*.
3. Comparar os padrões de organização cromossômica das famílias multigênicas entre as espécies de Hypostominae e Loricariinae com os grupos descritos na literatura.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 AMOSTRAS

No presente estudo foram utilizadas amostras de indivíduos machos e fêmeas de 3 espécies da família Loricariidae, entre elas: *Spatuloricaria* sp. (2 machos e 1 fêmea) coletados na cidade de Abaetetuba – PA, rio Caripetuba (S=1°37'23,49'', W=48°55'33''); *Scobinancistrus aureatus* (2 machos e 2 fêmeas) e *Scobinancistrus pariolispos* (1 macho e 3 fêmeas). Provenientes do rio Xingu próximo a Belo Monte (S=03°06'12.8", W=51°43'53.9") e Gorgulho da Rita, Altamira-PA (S=03°20'06.2", W=52°10'32.9"). As coletas foram autorizadas pelo Instituto Chico Mendes de Conservação e Biodiversidade (ICMBIO). Licença de número 020/2005.

### 3.2 OBTENÇÃO DE CROMOSSOMOS MITÓTICOS

Os cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de células do rim cefálico das amostras de peixes. A metodologia empregada seguiu o protocolo proposto por Bertollo et al. (1972), com modificações. Foi injetada uma solução de colchicina na concentração de 0,025%, com a proporção de 1 mL/ 100 g do peso do animal, na região dorso-lateral com o auxílio de uma seringa de insulina (para animais pequenos) ou de uma seringa de 3 mL e

agulha 25 x 7 mm (para animais grandes). Posteriormente, os animais foram mantidos em aquário aerado por 45 minutos e em seguida eutanasiados para a retirada do rim cefálico. O rim foi colocado em solução hipotônica de KCl 0,075 M e com o auxílio de pinça, tesoura e macerador de vidro o órgão foi submetido a um processo de dissociação. Após isso, o material ficou em estufa a 36-37 °C por 30 minutos. Passado o tempo na estufa, os grumos de tecidos que não foram completamente dissociados foram retirados com auxílio de pinça e logo em seguida acrescentou-se de 1 a 2 mL de fixador Carnoy (3 partes de Metanol e 1 parte de Ácido Acético), ressuspensando o material em placa de Petri e transferindo-o para tubos de centrífuga com auxílio de pipeta Pasteur. Feito isso, o material foi centrifugado a 900 rpm, durante 8-10 minutos. O sobrenadante descartado e novamente foi adicionado fixador Carnoy (5-10 mL), ressuspensando suavemente a preparação cromossômica por 5 minutos que posteriormente foi armazenada em freezer -20 °C.

### 3.3 PREPARAÇÃO CITOLÓGICA DAS LÂMINAS

As lâminas foram bem lavadas com sabão neutro, água destilada, álcool 70% e postas para secar ao ar. Após isso, foi realizada a ressuspensão do material com o auxílio de pipeta Pasteur e posteriormente pingou-se 10 µL da suspensão celular sobre a lâmina a qual deve conter uma película de água para que isso proporcione um melhor espalhamento dos cromossomos metafásicos. Em seguida, as lâminas foram colocadas para secar em temperatura ambiente e, ao fim, foram armazenadas em caixas apropriadas mantidas em temperatura ambiente até o momento de sua utilização.

### 3.4 EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA genômico foi extraído a partir do tecido muscular da espécie *Scobinancistrus pariolispos* e fixado em etanol 100% utilizando o método de fenol-clorofórmio descrito por Sambrook & Russel (2001) que consiste em macerar o tecido em um tubo do tipo eppendorf,, adicionar 500 µL de tampão de digestão, aquecer as amostras em banho-maria a 50°C por aproximadamente 1 hora e 30 minutos até que haja uma boa digestão do tecido. Posteriormente adicionar 500 µL de fenol-cloroformio para a homogeneização das amostras durante 15 minutos. Em seguida, centrifugar por 15 minutos a 15.000 rotações por minuto (rpm) e transferir o sobrenadante para um segundo tubo. Acrescentar 0,2 do volume total da reação de NaCl 1M e dois volumes de etanol 100% gelado e agitar suavemente de modo a precipitar o DNA. Centrifugar por 5 minutos a 15.000 rpm, descartar o sobrenadante e acrescentar cuidadosamente 375 µL de etanol 70% para lavar. Centrifugar novamente por 15

minutos a 15.000 rpm, descartar o sobrenadante e secar o DNA (temperatura ambiente ou estufa até 40°C). Para finalizar eluir as amostras com 250 µL de água ultrapura.

### 3.5 ISOLAMENTO DE DNAs REPETITIVOS

Para a amplificação das histonas foram utilizados os conjuntos de *primers*: ScaH3F 5'-GGC NMG NAC NAA RCA RAC e ScaH3R 5'-TGD ATR TCY TTN GGC ATD AT e Sca H1F 5'-GCN ATH AAR AAR TAY AT e ScaH1R 5'-GGY TTN GGN GCY TTN GG desenhados por Cabral-de-Mello et al., (2010). E para snRNA U2: F5'-TCT CGG CCT (AT)(AT)T GGC TAA-3' e R5'-G(AC)G GTA (GC)TG CAA TAC CGG-3' Segundo Colgan et al., (1998).

### 3.6 MARCAÇÃO DAS SONDAS

Os produtos das PCRs foram quantificados em equipamento Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek Instruments) a partir do Software Gen5 2.03.1. Após padronização das PCRs para cada um dos *primers*, as sondas foram obtidas por meio de PCR por Nick Translation e Dig-nick (Roche) para a marcação com digoxigenina.

### 3.7 TÉCNICA DE HIBRIDIZAÇÃO *in situ* FLUORESCENTE

A Hibridização *in situ* Fluorescente foi realizada segundo Pinkel et al., (1986), com modificações: sobre uma lâmina citologicamente preparada pingar 200 µL de solução contendo RNase (1 µL de Rnase para cada 1000 µL de 2 x SSC). Feito isso, cobrir a lâmina com lamínula de vidro (14 x 50 mm) por 20 min. Após, retirar a lamínula para que a lâmina seja lavada em solução de 2 x SSC por 2 minutos. Colocar a lâmina em uma solução de pepsina (50 mL de HCl 4,8 N para 0,5 mL de pepsina) por 3 minutos. Lavar a lâmina em 2 x SSC por 3 vezes por 2 minutos em cada. Desidratar os cromossomos em uma bateria de álcool (2x70% por 2 minutos, 2x90% por 2 minutos cada e 1x100% por 4 minutos). Deixar a lâmina em estufa a 60° C por 1 hora. Posteriormente, imergir a lâmina em solução de formamida 70% à 65° C por 45 segundos para desnaturação dos cromossomos. Em seguida, desidratar novamente os cromossomos em uma bateria de álcool como descrito anteriormente, porém, substituindo o primeiro álcool da bateria por etanol 70% gelado durante 4 minutos. Diluir a sonda em tampão de hibridização (2 µL de sonda marcada com digoxigenina para 10 µL de tampão). Desnaturar a sonda a 70° C por 15 minutos. Pingar 12 µL de solução contendo a sonda na lâmina, cobrir com lamínula e deixar hibridizar durante 24-48 horas em estufa a 37° C.

### 3.7.1 LAVAGEM DE ESTRINGÊNCIA

Retirar a lamínula e colocar a lâmina em formamida 50% a 40° C (2x por 2'30''). Colocar a lâmina em 2 x SSC a 40° C (2x por 2'30''). Colocar a lâmina em de detergente 4 Tween (200 mL de 4 x SSC para 100 µL de Tween) a 40° C por 5 minutos. Pingar 100 µL de solução de detecção (0,2 µL de avidina CY3 para 100 µL de 4 Tween ou 0,4 µL de antidigoxigenina para 100 µL de 4 Tween), cobrir com lamínula e deixar em estufa a 37° C por 30 minutos. Retirar a lamínula e lavar a lâmina em 4 Tween em temperatura ambiente 3 vezes por 2 minutos cada. Pingar 8 µL de DAPI com Antifade Vectashield H-1000 (Vector) sobre as metáfases, cobrir com lamínula de vidro 24 x mm e selar.

### 3.7.2 CAPTURA DE IMAGENS

As melhores metáfases foram coradas e observadas em microscópio Olympus BX41 e capturadas com câmera digital CCD 1300QDS. O cariótipo de *Spatuloricaria sp.* foi organizado de acordo com a metodologia proposta por Levan et al., (1964). Já as lâminas previamente hibridizadas foram capturadas utilizando o software Nis-Elements no microscópio Nikon H550S. A edição das imagens de FISH foi realizada com auxílio do programa Adobe Photoshop CS6.

#### 4. CAPÍTULO 1

**Descrição cariotípica e mapeamento físico de famílias multigênicas (Histonas H1-H3 e snDNA U2) nas espécies *Spatuloricaria* sp., *Scobinancistrus aureatus* e *Scobinancistrus pariolispos* (Siluriformes, Loricariidae)**

Luciano Farias Souza<sup>1</sup>, Manoella Gemaque Cavalcante<sup>1</sup>, Cleusa Yoshiko Nagamachi<sup>1,2</sup>, Julio Cesar Pieczarka<sup>1,2</sup>, Renata Coelho Rodrigues Noronha<sup>1</sup>



**Título:** Descrição cariotípica e mapeamento físico de famílias multigênicas (Histonas H1-H3 e snDNA U2) nas espécies *Spatuloricaria* sp., *Scobinancistrus aureatus* e *Scobinancistrus pariolispos* (Siluriformes, Loricariidae).

**Autores:** Luciano Farias Souza<sup>1</sup>, Manoella Gemaque Cavalcante<sup>1</sup>, Cleusa Yoshiko Nagamachi<sup>1,2</sup>, Julio Cesar Pieczarka<sup>1,2</sup>, Renata Coelho Rodrigues Noronha<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Laboratório de Citogenética, Centro de Estudos Avançados em Biodiversidade (CEABIO), Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil.*

<sup>2</sup> *Pesquisador CNPq*

## RESUMO

A família Loricariidae apresenta a maior riqueza de peixes bagres Neotropicais sendo considerada a maior família da ordem Siluriformes com mais de 900 espécies válidas distribuídas em 100 gêneros, entre eles *Scobinancistrus* e *Spatuloricaria*. Estudos citogenéticos em Loricariidae demonstram uma grande variação no grupo, indicando a ocorrência de diferentes tipos de rearranjos cromossômicos. Nesse contexto, realizamos o mapeamento dos genes de Histonas (H1-H3) e snDNA U2 nas espécies *Scobinancistrus aureatus*, *Scobinancistrus pariolispos* e *Spatuloricaria* sp. e a segunda descrição cariotípica de um citótipo do gênero *Spatuloricaria* que apresentou  $2n=66$  e  $NF=82$ . O mapeamento com genes de histonas H1 e H3 evidenciou marcações semelhantes nas duas espécies de *Scobinancistrus* com sinais dispersos ao longo dos cromossomos. Em *Spatuloricaria* sp. estas sequências mostraram-se formando *clusters* na região terminal dos cromossômicos com H1 apresentando sinais nos 3 primeiros pares e H3 apenas nos 2 primeiros. Sugerimos a colocação dessas sequências nos pares 1 e 2 dessa espécie. SnDNA U2 apresentou padrões distintos nas três espécies, com marcações pericentroméricas em apenas um cromossomo nos pares 3 e 18 de *S.aureatus* e no par 15 de *S. pariolispos*. Na espécie *Spatuloricaria* sp. observamos sinais de marcação na região intersticial do braço longo do par 1. Os sítios com padrão disperso revelados no presente estudo podem ser resultado de associações de sequências de histonas (H1-H3) a elementos transponíveis (TEs) devido à similaridade encontrada nos seus padrões de distribuição mapeados em cromossomos de peixes. As sequências da histona H1 em apenas um cromossomo do par 1, provavelmente está relacionada a eventos de recombinação não-homóloga em que partes dessas podem ter sido carregadas para um dos cromossomos correspondentes. Os diferentes padrões de marcação observados no presente estudo ressaltam a importância do uso de marcadores moleculares em estudos citogenômicos para a compreensão da estrutura e dinâmica organizacional dos genomas de peixes e da família Loricariidae.

Palavras-chave: DNAs repetitivos, famílias multigênicas, histonas, snDNA U2

## INTRODUÇÃO

Os DNAs repetitivos são classificados nos genomas eucarióticos em codificantes, representados pelas famílias multigênicas (DNA ribossomal, proteínas histônicas e pequenos RNAs nucleares) e não-codificantes, podendo se organizar em blocos (*in tandem*) incluindo os DNAs satélites, minissatélites e microssatélites. Além das sequências dispersas ao longo do genoma, como os elementos transponíveis (*Transposable Elements - TEs*). Diversos estudos demonstram que sítios ricos em DNAs repetitivos são pontos críticos para a ocorrência de quebras (*double strand breaks - DSB*), recombinação não homóloga e reorganização cromossômica em diferentes organismos (Cazaux et al., 2011; Farré et al., 2011; Barros et al., 2017; Cavalcante et al., 2018).

Os genes de histona compõem uma família multigênica complexa com número variável de cópias agrupadas em uma ou mais regiões cromossômicas (Childs et al., 1981) com sequências responsáveis por codificar cinco tipos de proteínas: H1, H2A, H2B, H3 e H4 (Nagoda et al., 2005). A organização agrupada destes genes torna essas sequências excelentes marcadores moleculares em estudos sobre a variação cromossômica e organização genômica em muitos grupos de eucariotos (Cabral-de-Mello et al., 2011). As altas taxas de mutação em regiões intergênicas de famílias multigênicas representam uma importante fonte de variabilidade genética e podem gerar sítios propensos a quebra conhecidos como “*double strand breaks*” (DSB), os quais promovem a reorganização dos cromossomos durante a evolução cariotípica (Carvalho et al., 2011; Bruschi et al., 2014; Barros et al., 2017; Georgieva & Karagyozov, 2012).

Em peixes, os dados sobre a localização cromossômica de sequências de DNAs histônicos são descritos para os genes de H1, H3 e H4 (Pendás et al., 1994; Hashimoto et al., 2011, 2013; Lima-Filho et al., 2012; Pansonato-Alves et al., 2013a, 2013b; Silva et al., 2013; Piscor & Parise-Maltempa, 2015). Alguns desses estudos demonstram a sintonia dos genes de H1 com genes ribossomais 5S e 18S (Hashimoto et al., 2011, 2013; Costa et al., 2014) e associação entre as sequências de histona H3 e cromossomos B (Utsunomia et al., 2016). Na família Loricariidae o mapeamento físico de genes de histona encontra-se restrito ao gênero *Hypostomus*.

Os genes de snDNA U2 são sequências que participam da formação do spliceossomo atuando ativamente no processo de maturação do RNAm (COLGAN et al., 1998). O

mapeamento destas sequências em diferentes organismos indica que estas possam estar ligadas a outras famílias multigênicas (Peliccia et al., 2001; Manchado et al., 2006). No grupo de peixes os genes de snDNA U2 foram mapeados em espécies das famílias Batrachoididae, Characidae, Gymnotidae, Merlucciidae e Moronidae (Merlo et al., 2010; Úbeda-Manzanaro et al., 2010; Utsunomia et al., 2014; García-Souto et al., 2015; Silva et al., 2015) podendo apresentar diferentes padrões de organização cromossômica (Úbedo-Manzanaro et al., 2010) e estar associados à cromossomos sexuais (Utsunomia et al., 2014).

Em Loricariidae os principais estudos de mapeamento cromossômico utilizando sequências de famílias multigênicas foram voltados para os DNAs ribossomais e diversas análises citogenéticas têm sido realizadas. No entanto, ainda há muito que compreender sobre o papel dessas sequências no genoma de peixes, tendo em vista que este constitui um grupo extremamente diversificado e que representa mais da metade das espécies de vertebrados existentes (Ozouf-Costaz et al., 2004).

Portanto, o presente estudo teve como objetivo descrever o cariótipo da espécie *Spatuloricaria* sp. e realizar o mapeamento físico de famílias multigênicas (genes de histona H1, H3 e snDNA U2) nas espécies *Scobinancistrus aureatus*, *Scobinancistrus pariolispos* e *Spatuloricaria* sp. O mapeamento de elementos repetitivos é uma ferramenta fundamental para compreensão da organização, distribuição e comportamento dessas sequências no genoma (Mehrota & Goyal, 2014).

## MATERIAL E MÉTODOS

No presente estudo foram analisados indivíduos machos e fêmeas de 3 espécies da família Loricariidae: *Spatuloricaria* sp. (2 ♂ e 1 ♀) com ponto de coleta no rio Caripetuba próximo a cidade de Abaetetuba-PA (S=1°37'23,49'', W=48°55'33''); *Scobinancistrus aureatus* (2 ♂ e 2 ♀) e *Scobinancistrus pariolispos* (1 ♂ e 3 ♀) coletados no rio Xingu próximo a Belo Monte (S=03°06'12.8", W=51°43'53.9") e no Gorgulho da Rita, Altamira-PA (S=03°20'06.2", W=52°10'32.9") (Fig. 1). As coletas tiveram autorização do Instituto Chico Mendes de Conservação e Biodiversidade (ICMBIO); Licença de número 020/2005. Os animais foram anestesiados com eugenol e os cromossomos metafásicos extraídos de células mitóticas do rim cefálico como descrito por Bertollo et al., (1972). A organização dos

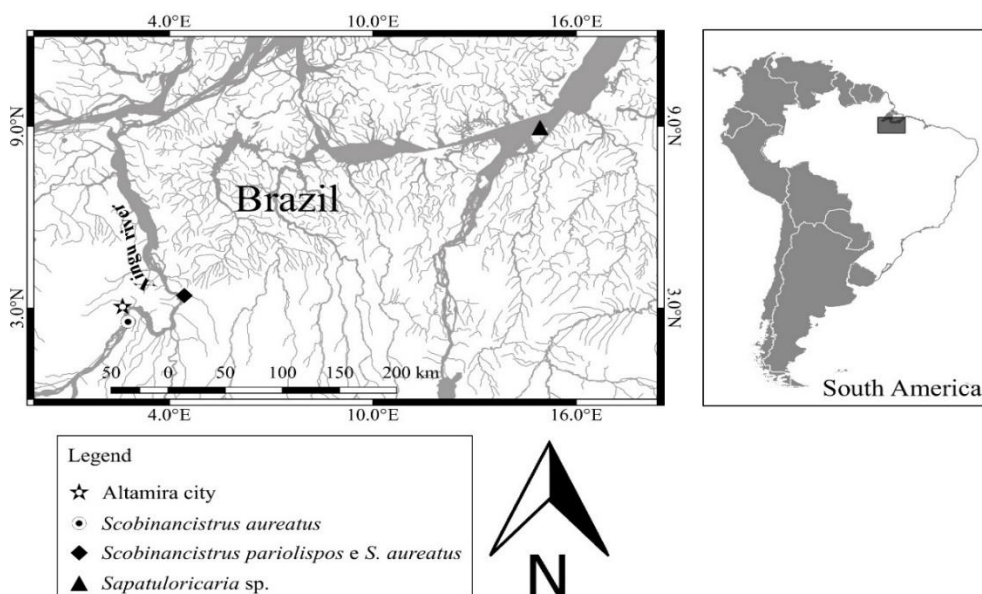
cariótipos seguiu o sistema de classificação descrito por Levan et al., (1964) com cromossomos dispostos aos pares e em ordem decrescente de tamanho.

#### *Produção das sondas de DNA*

O DNA genômico foi extraído de células do tecido muscular da espécie *Scobinancistrus pariolispos* por meio do método de proteinase K e fenol/clorofórmio descrito por Sambrook et al., (1989) e fixado em etanol 100%. A obtenção das sondas se deu pela amplificação das sequências repetitivas de H1, H3 e snDNA U2 por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) através de um conjunto de *primers* (Tabela 1). Os fragmentos de DNA foram purificados utilizando GenElute Gel Extraction Kit (Sigma-Aldrich) de acordo com as recomendações do fabricante e as sondas foram marcadas por *Nick-Translation* com DIG-Nick Translation Mix (Roche) para a marcação com digoxigenina.

#### *Hibridização in situ Fluorescente (FISH)*

A técnica de FISH foi realizada segundo o protocolo descrito por Pinkel et al., (1986) com modificações. Os sinais de marcação foram detectados por meio de uma solução de detecção (0.4 µl do fluorocromo anti-digoxigenina FITC e 100 µl de 4xTween). Os cromossomos foram contracolorados com 7 µl de DAPI contendo Antifade Vectashield H-100 (Vector). As metáfases foram visualizadas em microscópio de epifluorescência com filtros apropriados para cada fluorocromo e fotografadas através do software Nis-Elements no microscópio Nikon H550S. A edição das imagens foi feita no programa Adobe Photoshop CS6.



**Figura 1:** Pontos de coleta das amostras analisadas no presente estudo.

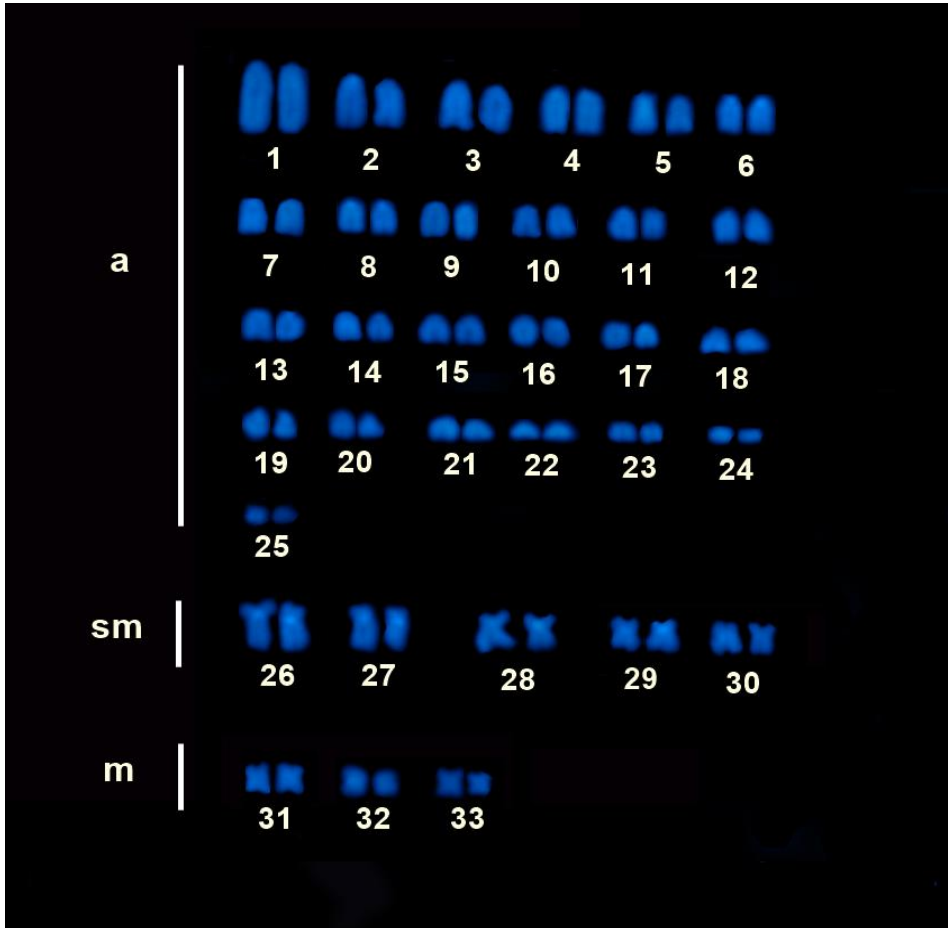
**Tabela 1:** Conjunto de *primers* utilizados para a produção das sondas do presente estudo

DNA repetitivo	<i>Primers</i>	Referências
<b>H1</b>	8SF 5'-TCTAAGTACRCRCGGCCGGTA 18SR 5'-CAAGAACGAAAGTCGGAGGTT	Cabral-de-Mello et al., (2010).
<b>H3</b>	ScaH3F 5'-GGC NMG NAC NAA RCA RAC ScaH3R 5'-TGD ATR TCY TTN GGC ATD AT	Cabral-de-Mello et al., (2010).
<b>SnDNA U2</b>	F5'-TCT CGG CCT (AT)(AT)T GGC TAA-3' R5'-G(AC)G GTA (GC)TG CAA TAC CGG-3'	Colgan et al., (1998)

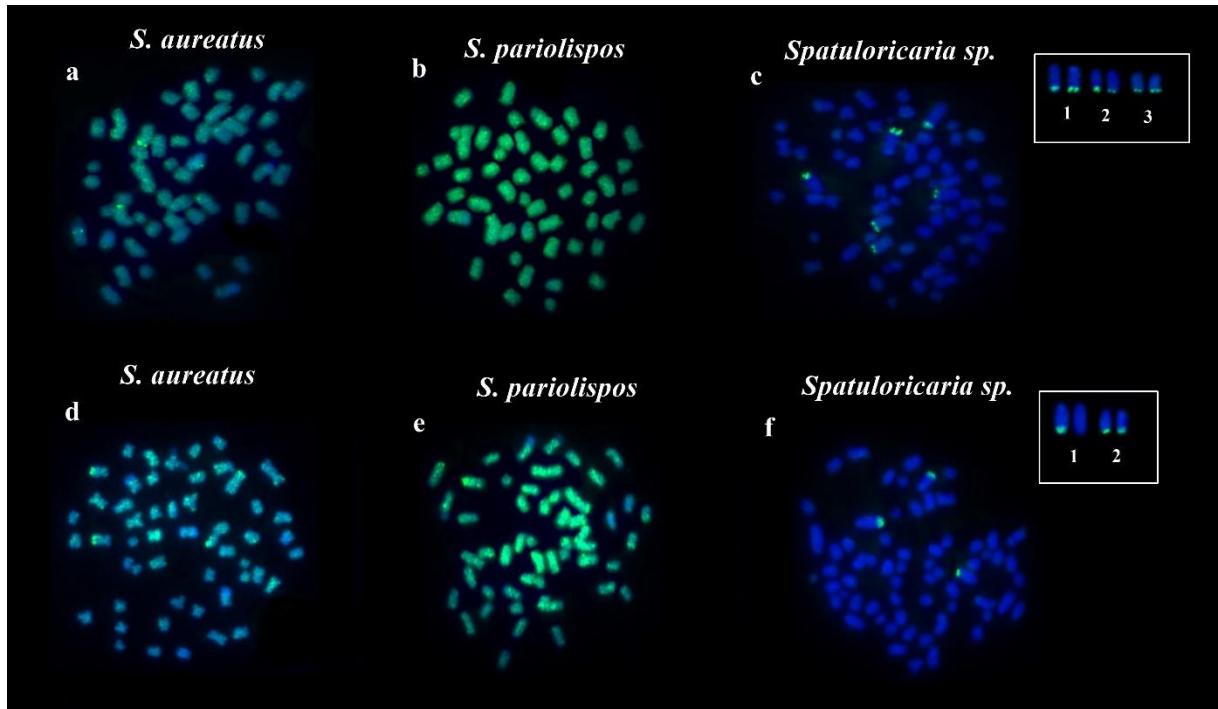
## RESULTADOS

*Spatuloricaria sp.* apresentou número diploide de  $2n=66$  e fórmula cariotípica composta por 50 cromossomos acrocêntricos, 10 submetacêntricos e 6 metacêntricos (50a, 10sm e 6m) com número fundamental de  $NF=82$ . Não foram observados cromossomos sexuais com diferenciação morfológica para essa espécie (Fig. 2).

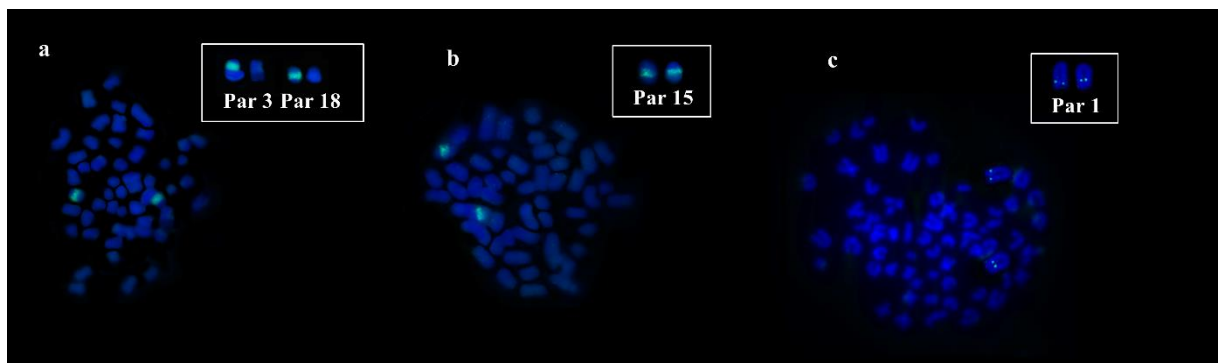
A FISH com os genes de histona H1 apresentou um padrão disperso em *Scobinancistrus aureatus* e *Scobinancistrus pariolispos* (Fig. 3a e 3b). Em *Spatuloricaria sp.* foram detectados pequenos blocos dispostos na região terminal dos cromossomos dos pares 1, 2 e 3 (Fig. 3c). O padrão de marcação da Histona H3 foi similar às marcações encontradas para a histona H1 nas duas espécies de *Scobinancistrus*, com a presença de sinais dispersos distribuídos ao longo dos cromossomos (Fig. 3d e 3e). Na espécie *Spatuloricaria sp.* foram identificados blocos de sequências de histona H3 localizadas nas regiões terminais dos pares 1 e 2, no entanto, no par 1 a marcação foi evidenciada em apenas um dos cromossomos (Fig. 3f). Os sinais de hibridização das sequências de snDNA U2 foram observados em cromossomos de pares diferentes na espécie *S. aureatus* com marcações na região pericentromérica em apenas um dos cromossomos dos pares 3 e 18 (Fig. 4a). Em *S. pariolispos* foram observadas marcações pericentroméricas no par submetacêntrico 15 (Fig. 4b). *Spatuloricaria sp.* apresentou sinais de marcação na região intersticial do braço longo dos cromossomos do par 1 (Fig. 4c).



**Figura 2:** Cariótipo da espécie *Spatuloricaria* sp. corado com fluorocromo DAPI.



**Figura 3:** Mapeamento físico dos genes de histonas H1 a) *S. aureatus* b) *S. pariolispos* c) *Spatuloricaria sp.*; H3 d) *S. aureatus* e) *S. pariolispos* f) *Spatuloricaria sp.*



**Figura 4:** Mapeamento do snDNA U2 no genoma de a) *S. aureatus* b) *S. pariolispos* c) *Spatuloricaria sp.*



## DISCUSSÃO

### *Descrição cariotípica de *Spatuloricaria* sp.*

Das 12 espécies do gênero *Spatuloricaria* reconhecidas na literatura até o presente estudo, apenas uma havia sido caracterizada citogeneticamente. *Spatuloricaria* sp. apresentou número diploide de  $2n=66$  assim como o citótipo descrito nos trabalhos de Ferreira et al. (2014). No entanto, com relação ao estudo anterior, apesar de haver uma manutenção no  $2n$ , observamos diferenças na macroestrutura dos cromossomos refletindo no número fundamental (NF). *Spatuloricaria* sp apresentou NF=82 diferentemente do NF=92 descrito por Ferreira et al (2014). Os dois cariótipos são formados predominantemente por cromossomos acrocêntricos. Desse modo, sugerimos que a origem desses cromossomos esteja relacionada a rearranjos Robertsonianos do tipo fissão cêntrica. Diversos estudos demonstram que entre os principais eventos envolvidos na diversificação cariotípica de Loricariidae destacam-se os mecanismos de fusão e fissão cêntrica (Alves et al., 2003; Ziemniczack et al., 2012; Blanco et al., 2013; Errero-Porto et al., 2014).

Assim como no estudo de Ferreira et al. (2014), não observamos a presença de cromossomos sexuais com diferenciação morfológica. Portanto, *Spatuloricaria* sp conserva o caráter homomórfico que é considerado comum entre os representantes da família Loricariidae. A maioria das espécies de peixes Neotropicais estudadas citogeneticamente não apresenta cromossomos sexuais diferenciados (Moreira-Filho et al., 1993; Centofante et al., 2002). É importante considerar que a heterogametia só foi observada em cerca de 6% das espécies de peixes cariotipadas, das quais estima-se que por volta de 63 casos correspondem aos peixes Neotropicais (Oliveira et al., 2009).

### *Organização cromossômica de famílias multigênicas*

Os sinais de marcação dispersos evidenciados por FISH para os genes das histonas H1-H3 em *S. aureatus* e *S. pariolispos* revelaram um padrão de distribuição considerado atípico para estes marcadores, uma vez que a maioria dos estudos mostram *clusters* dessas sequências bastante conservados com relação a localização física nos cromossomos de organismos relacionados, como observado em espécies de gafanhotos (Cabreró et al., 2009) e em outras espécies de peixes (Pendás et al., 1994a; Hashimoto et al., 2011). Resultado semelhante foi encontrado por Utsunomia et al. (2014) que mapearam os genes das histonas H1-H4 em *Synbranchus marmoratus* e propuseram que estes sítios estão organizados em

pequenas repetições e são abundantes no genoma. Pucci et al. (2018) ao mapearem a distribuição dos sítios de histonas H1-H4 em espécies do gênero *Characidium* encontraram sinais de marcação adicionais dispersos e, através do isolamento e análise dessas sequências, perceberam que há uma inserção de elementos transponíveis (ERV1 e Gypsy) e que estes podem ter atuado na dispersão dos genes de histonas pelo genoma. Desse modo acreditamos que, assim como proposto no estudo anterior, os sítios com padrão disperso revelados no presente estudo tenham sido resultado de associações de sequências de histonas (H1-H3) a elementos transponíveis (TEs) devido à similaridade encontrada nos seus padrões de distribuição mapeados em cromossomos de peixes (Ferreira et al., 2011a, 2011b) onde a análise das sequências será fundamental para corroborar os resultados.

Sugerimos que na espécie *Spatuloricaria* sp. os genes das histonas H1-H3 possam estar colocalizados, onde seu padrão de marcação evidenciou a presença de blocos conpíscuos nas regiões terminais dos três primeiros pares cromossômicos. A presença de sequências repetitivas ocorrendo na mesma região cromossômica foi relatada nos trabalhos de Ayres-Alves et al. (2017) que descreveram a colocalização cromossômica do elemento transponível *Rex1* e rDNA 18S em duas espécies da subfamília Hypostominae. Destacamos que em *Spatuloricaria* sp. as sequências da histona H1 foram evidenciadas em apenas um cromossomo do par 1 e acreditamos que isso esteja relacionado a eventos de recombinação não-homóloga em que partes dessas podem ter sidos carregadas para um dos cromossomos correspondentes ao primeiro par ou que essas sequências estejam presentes em uma quantidade tão pequena nesse cromossomo tornando difícil sua detecção pela técnica de FISH.

Entre as famílias multigênicas mapeadas em estudos anteriores ressaltamos que, ao contrário dos cístrons de rDNA, os genes de histona geralmente são encontrados em 1 ou 2 pares cromossômicos no grupo de peixes assim como nos demais vertebrados (Pendás et al., 1994a; Hashimoto et al., 2011, 2013; Silva et al. 2014; Costa et al. 2014). Com base nos nossos dados e em estudos mais recentes acreditamos que a distribuição dos genes de histonas em cromossomos de peixes parece não ser tão conservada como se pensava anteriormente. Nossos resultados demonstram um padrão incomum para o grupo, no entanto, destacamos que são necessários mais estudos utilizando esses marcadores moleculares para o melhor entendimento da sua organização cromossômica na família Loricariidae e no grupo de peixes de modo geral.

A localização dos sítios de snDNA U2 nas regiões pericentroméricas de cromossomos de peixes já foi reportada na literatura, como observado nos trabalhos de Pucci

et al. (2018) que descreveram a presença desses genes no primeiro par cromossômico de três espécies de *Characidium* relatando um provável conservadorismo dessas sequências na organização cromossômica das espécies desse gênero. Em contrapartida, nossos resultados mostraram um padrão de marcação diferente entre as duas espécies do gênero *Scobinancistrus* onde observamos a localização diferencial em *S. aureatus* com *clusters* em cromossomos não homólogos nos quais foram encontrados sinais de marcação presentes em apenas um dos cromossomos do par 3 e 18. Em *Scobinancistrus pariolispos* as marcações de snDNA U2 foram evidenciadas no par 15. Assim, sugerimos que esse gênero não é conservado quanto a localização física dessas sequências. Em estudos anteriores foi relatada a colocação de sequências de snDNA U2 com sítios ribossômicos (Cross & Rebordinos, 2005; Manchado et al., 2006; Úbeda-Manzanaro et al., 2010; Scacchetti et al., 2015a). No entanto, não observamos marcações que possam estar associadas aos sítios de sequências de rDNA que já foram mapeados para as duas espécies de *Scobinancistrus* (Ferreira et al., 2014).

Nossos resultados mostraram que a espécie *Spatuloricaria* sp. apresenta sítios de snDNA U2 localizados na região intersticial do braço longo dos cromossomos do par 1. Garcia-Souto et al. (2015) observaram um padrão semelhante destas sequências que foram evidenciadas na região intersticial/subcentromérica do par 13 em *Merluccius merluccius*. Dados sobre a localização física de sítios de snDNA U2 em peixes são considerados escassos e dois padrões comuns de marcação foram reconhecidos para este grupo: (I) formando *clusters* em um ou mais pares cromossômicos como observado em nossos resultados e (II) dispersos pelo genoma (Úbeda-Manzanaro et al. 2010, Utsunomia et al. 2014, Scacchetti et al. 2015, Silva et al. 2015). Observa-se que assim como no presente estudo as sequências de snDNA U2 podem apresentar diferentes padrões de distribuição em outros grupos de peixes. Nossos resultados sugerem que independente da localização cromossômica o número de sítios de snDNA U2 parece ser conservado nas 3 espécies analisadas, assim como descrito para os gêneros *Astyanax* e *Bryconamericus* (Silva et al., 2015; piscor et al., 2016, Piscor et al., 2018). Os diferentes padrões de marcação observados no presente estudo ressaltam a importância do uso de marcadores moleculares em estudos citogenômicos para a compreensão da estrutura e dinâmica organizacional dos genomas de peixes e da família Loricariidae.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA-TOLEDO, L.F. (1998). Cytogenetic markers in Neotropical freshwater fishes. In: Malabarba, L.R.; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena, Z.M. S.; Lucena, C.A (eds). Phylogeny and classification of Neotropical fishes. EDIPUCRS. Porto Alegre, RS, BR. p. 583-588.
- ALVES, A.L. OLIVEIRA, C., FORESTI, F. (2003). Karyotype variability in eight species of the subfamilies Loricariinae and Ancistrinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). *Caryologia*, 56(1): 57-63.
- ARAI, R. 2011. Fish karyotypes: a check list. Springer Science & Business Media. Tóquio, JHS, JP. 340pp.
- ARMBRUSTER, J.W. (2004). Phylogenetic relationships of the suckermouth armoured catfishes (Loricariidae) with emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. *Zoological Journal of the Linnean Society*. 141: 1–80.
- ARTONI, R. F. & BERTOLLO, L. A. C. (2001). Trends in the karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). *Hereditas*. 134: 201-210.
- ARTONI, R. F. & BERTOLLO, L. A. C. (1996). Cytogenetic studies on Hypostominae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). Considerations on karyotype evolution in the genus *Hypostomus*. *Caryologia*. 49: 81–90.
- ARTONI, R.F. (1996). Estudos citogenéticos na família Loricariidae, com ênfase no gênero *Hypostomus* Lacépède (1803) (Pisces, Siluriformes). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo. 162pp
- AYRES-ALVES T, CARDOSO AI, NAGAMACHI CN, De SOUZA LM, PIECZARKA JC, NORONHA RCR. Karyotypic evolution and chromosomal organization of repetitive DNA sequences in species of *Panaque*, *Panaqolus*, and *Scobinancistrus* (Siluriformes and Loricariidae) from the Amazon basin. *Zebrafish* 2017;14:251–260.
- BARROS, AV; Wolski, MAV; NOGAROTO, V; ALMEIDA, MC; MOREIRA-FILHO, O; VICARI, MR (2017) Fragile sites, dysfunctional telomere and chromosome fusions: What is 5S rDNA role? *Gene* 608: 20-27.
- BERTOLLO, L. A. C.; TAKASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. (1972). Citotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal of Genetics*

2:103-120.

BIÉMONT, C. & VIEIRA, C. (2006). Junk DNA as an evolutionary force. *Nature*. 443: 521-524.

BLANCO D.R, VICARI M.R, LUI L.R, BERTOLLO L.A.C, TRALDI J.B, MOREIRA-FILHO, O. (2013). The role of Robertsonian rearrangements in the origin of the XX/XY1Y2 sex chromosome system and in the chromosomal differentiation in *Hartia* species (Siluriformes, Loricariidae). *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 23: 127-134.

BRUSCHI DP, RIVERA M, LIMA AP, ZÚÑIGA AB, RECCO-PIMENTEL SM (2014) Interstitial Telomeric Sequences (ITS) and major rDNA mapping reveal insights into the karyotypical evolution of Neotropical leaf frogs species (Phyllomedusa, Hylidae, Anura). *Molecular Cytogenetics*, 7:22.

CABRAL-DE-MELO, D. C.; MOURA, R. C.; MARTINS C. (2010). Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the beetle *Dichotomius geminatus* provide the first evidence for an association of 5S rRNA and histone H3 genes in insects, and repetitive DNA similarity between the B chromosome and A complement. *Heredity*. 104:393-400.

CABRAL-DE-MELLO DC, MOURA RC, MARTINS C (2011) Cytogenetic Mapping of rRNAs and Histone H3 Genes in 14 Species of *Dichotomius* (Coleoptera, Scarabaeidae, Scarabaeinae) Beetles. *Cytogenet Genome Res*;134:127–135

CABRERO J, LÓPEZ-LEÓN MD, TERUEL M, CAMACHO JPM. Chromosome mapping of H3 and H4 histone gene clusters in 35 species of acridid grasshoppers. *Chromosome Res* 17:397–404. 2009.

CARVALHO A, GUEDES-PINTO H, LIMA-BRITO J (2011) Physical localization of NORs and ITS length variants in old Portuguese durum wheat cultivars. *J Genet*, 90(1):95–101.

CAZAUX B, Catalan J, VERYUNES F, DOUZERY EJP, BRITTON-DAVIDIAN J (2011) Are ribosomal DNA clusters rearrangement hotspots? A case in the genus *Mus* (Rodentia, Muridae). *BMC Evol Biol*, 11:124.

COSTA, G.W.W.F., CIOFFI, M.B., BERTOLLO, L.A.C., MOLINA, W.F. (2014). Unusual dispersion of histone repeats on the whole chromosomal complement and their colocalization

with ribosomal genes in *Rachycentron canadum* (Rachycentridae, Perciformes). *Cytogenet Genome Res*, 144(1):62–67.

CAVALCANTE MG; BASTOS, CEMC; NAGAMACHI, CY; PIECZARKA JC; VICARI MR; NORONHA, RCR. Physical mapping of repetitive DNA suggests 2n reduction in Amazon turtles *Podocnemis* (Testudines: Podocnemididae).(2018). *PLoS ONE* 13(5): e0197536. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197536>.

CAVALIER-SMITH, T. (1985). Selfish DNA and the origin of introns. *Nature*, 315: 283–284.

OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; HILSDORF, A. W. S. Genetics of Neotropical fish: from chromosomes to populations. *Fish Physiology Biochemistry*, v. 35, p. 81– 100, 2009.

CENTOFANE L.; BERTOLLO, L.A.C; MOREIRA-FILHO, O. (2002). A ZZ/ZW sex chromosome system in a new species of the genus *Parodon* (Pisces, Parodontidae). *Caryologia* 55:139-150.

CHIACHIO, M. C.; OLIVEIRA, C.; MONTOYA-BURGOS, J. I. (2008). Molecular systematic and historical biogeography of the armored Neotropical catfishes Hypoptopomatinae and Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 49: 606–617.

CHILDS G.; MAXSON R.; COHN R.H., KEDES L.; ORPHONS: dispersed genetic elements derived from tandem repetitive genes of eukaryotes. (1981). *Cell* 23:651–663.

COLGAN DJ, MCLAUCHLAN A, WILSON GDF, LIVINGSTON SP, EDGECOMBE GD, MACARANAS J, CASSIS G, GRAY MR (1998). Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. *Austral J Zool* 46: 419–437.

COSTA, G.W.W.F., CIOFFI, M.B., BERTOLLO, L.A.C., and MOLINA, W.F. (2014). Unusual dispersion of histone repeats on the whole chromosomal complement and their colocalization with ribosomal genes in *Rachycentron canadum* (Rachycentridae, Perciformes). *Cytogenet Genome Res*, 144(1):62–67. doi:10.1159/000366301. PMID:25341625.

COVAIN, R.; FISCH-MULLER, S.; OLIVEIRA, C.; MOL, J.H.; MONTOYA-BURGOS, J.I., DRAY, S. (2016). Molecular phylogeny of the highly diversified catfish subfamily Loricariinae (Siluriformes, Loricariidae) reveals incongruences with morphological classification. *Mol Phylogenet Evol.* 94: 492–517.

DOOLITTLE, W.F. & SAPIENZA, C. (1980). Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature* 284:601-603.

ERRERO-PORTO F, DE ROSSI VIEIRA MM, BARBOSA LM, BORIN-CARVALHO LA, VICARI MR, DE BRITO PORTELA-CASTRO AL, MARTINS-SANTOS IC. (2014). Chromosomal Polymorphism in *Rinerolicaria lanceolata* Gunther, 1868 (Loricariidae, Loricariinae) of the Paraguay Basin (Mato Grosso do Sul, Brazil). Evidence of Fusions and Their Consequences in Population. *Zebrafish.* 11(4)

ESCHMEYER, W.N. & FONG, J.D. (2018): Species of fishes by family/ subfamily (<http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>). Acesso em: 17 Jan. 2018.

FARRÉ, M., BOSCH, M., LOPEZ-GIRALDEZ, F., PONSÁ, M., RUIZ-HERRERA, A (2011) Assessing the role of tandem repeats in shaping the genomic architecture of great apes. *PLoS One* 6:e27239.

FERREIRA, R.O.; PEREIRA, A.L.; NAGAMACHI, C.Y.; PIECZARKA, J.C.; de Sousa, L.M.; NORONHA, R.C.R. (2014). Caracterização citogenética de uma espécie de *Spatuloricaria* (Siluriformes, Loricariidae) do rio Xingu (Pará, Amazônia, Brasil). *Biota Amazônia*, 4(1): 30-36.

FERREIRA, D.C.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. A new dispersal element in the genome of the catfish *Hisonotus leucofrenatus* (Teleostei: Siluriformes: Hypoptonomatinae). *Mobile Genetic Elements*, v. 1, n. 2, p. 103-106, 2011b.

FERREIRA, D.C.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Chromosome mapping of retrotransposable elements Rex1 and Rex3 in three fish species in the subfamily Hypoptonomatinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). *Cytogenetic and Genome Research*, v. 132, p. 64-70, 2011a.

GARCIA-SOUTO, D., TRONCOSO, T., PEREZ, M., & PASANTES, J. J. (2015). Molecular Cytogenetic Analysis of the European Hake *Merluccius merluccius* (Merlucciidae,

Gadiformes): U1 and U2 snRNA Gene Clusters Map to the Same Location. PLOS ONE, 10(12), e0146150.

GREGORY, T. R.; NICOL, J. A.; TAMM, H.; KULLMAN, B.; KULLMAN, K.; LEITCH, I. J.; MURRAY, B. G.; KAPRAUN, D. F.; GREILHUBER, J.; BENNETT, M. D. (2007). Eukaryotic genome size databases. Nucleic Acids Research, v. 35, n. Database, p. D332–D338.

HASHIMOTO, D.T.; FERGUSON-SMITH, M.A.; RENS, W.; PRADO, F.D.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. (2013). Cytogenetic mapping of H1 histone and ribosomal RNA genes in hybrids between cat-fish species *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum*. Cytogen Genome Res.139: 102–106.

HASHIMOTO, D.T.; FERGUSON-SMITH, M.A.; RENS, W.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. (2011). Chromosome mapping of H1 histone and 5S rRNA genes clusters in three species of *Astyanax* (Teleostei, Characiformes) Cytogen Genome Res.134: 64–71.

HENNING, F.; TRIFONOV, V.; FERGUSON-SMITH, M.A.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. (2008). Non-homologous sex chromosomes in two species of the genus *Eigenmannia* (Teleostei: Gymnotiformes). Cytogenetic and Genome Research, 121: 55-58.

KAVALCO, K. F.; PAZZA, R.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. (2005). Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). Heredity. 94: 180-186.

KAZAZIAN, H. H. (2004). Mobile elements: drivers of genome evolution. Science. 303: 1626-1632.

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

LEVAN A; FREDGA K; SANDBERG AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas.52: 201-220.

LIMA-FILHO, P.A.; CIOFFI, M.B.; BERTOLLO, L.A.C.; MOLINA, W.F. (2012) Chromosomal and morphological divergences in Atlantic populations of the frillfin *Bathygobius soporator* (Gobiidae, Perciformes) J Exp Mar Biol Ecol.:34:63–70.



MANCHADO M, ZUASTI E, CROSS I, MERLO A, INFANTE C, REBORDINOS L. (2006) Molecular characterization and chromosomal mapping of the 5S rRNA gene in *Solea senegalensis* : a new linkage to the U1, U2, and U5 small nuclear RNA genes. *Genome* 49:79–86.

MARIOTTO, S.; CENTOFANTE, L.; MIYAZAWA, C. S.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA FILHO, O. (2009). Chromosome polymorphism in *Ancistrus cuiabae*. *Neotropical Ichthyology*, 7(4):595-600.

MERLO, M.A.; CROSS, I.; CHAIRI, H.; MANCHADO, M.; REBORDINOS, L. (2010). Analysis of three multigene families as useful tools in species characterization of two closely-related species, *Dicentrarchus labrax*, *Dicentrarchus punctatus* and their hybrids. *Genes & Genetic Systems*. 85:341-349.

MEHROTRA, S. & GOYAL, V. (2014). Repetitive Sequences in Plant Nuclear DNA: Types, Distribution, Evolution and Function. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 12, 164–171.

MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C. and GALETTI, Jr., P.M. (1993) Distribution of sex chromosome mechanisms in neotropical fish and description of a ZZ/ZW system in *Parodon hilarii* (Parodontidae). *Caryologia* 46: 115-125.

NAGODA, N., FUKUDA, A., NAKASHIMA, Y., MATSUO, Y. (2005). Molecular characterization and evolution of the repeating units of histone genes in *Drosophila americana*: coexistence of quartet and quintet units in a genome. *Insect MolBiol* 14: 713-717.

OLIVEIRA, C. & WRIGHT, J.M. (1998). Molecular cytogenetic analysis of heterochromatin in the chromosomes of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). *Chromosome Research*, 6: 205- 11.

ORGEL, L.E. & CRICK. (1980). Selfish DNA: The ultimate parasite. *Nature*, 284: 604-607.

OZOUF-COSTAZ C, BRANDT, J.; KORTING, C.; PISANO, E.; BONILLO, C.; COUNTACEAU, J.P.; VOLFF, J.N. Genome dynamics and chromosomal localization of the non-LTR retrotransposons *Rex 1* and *Rex 3* in Antarctic fish. *Antarct Sci* 16:51-57, 2004.

PANSONATO-ALVES, J.C.; SERRANO, E.A.; UTSUNOMIA, R.; SCACCHETTI, P.C.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. (2013a) Mapping five repetitive DNA classes in sympatric species of *Hypostomus* (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae): Analysis of chromosomal variability. *Rev Fish Biol Fisher* 23:477–489.

PANSONATO-ALVES, J.C.; HILSDORF, A.W.S.; UTSUNOMIA, R.; SILVA, D.M.Z.A.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. (2013b) Chromosomal mapping of repetitive DNA and cytochrome C oxidase I sequence analysis reveal differentiation among sympatric samples of *Astyanax fasciatus*(Characiformes, Characidae) *Cytogenet Genome Res.* 41:133–142.

PATHAK, D. & ALI, S. (2012). Repetitive DNA: A Tool to Explore Animal Genomes/Transcriptomes. *Functional Genomics*. Doi:org/10.5772/48259.

PELLICCIA F, BARZOTTI R, BUCCIARELLI E, ROCCHI A. (2001). 5S ribosomal and U1 small nuclear RNA genes: a new linkage type in the genome of a crustacean that has three different tandemly repeated units containing 5S ribosomal DNA sequences. *Genome* 44:331–335.

PHILLIPS, R.B. & REED, K.M. (1996). Application of fluorescence in situ hybridization (FISH) techniques to fish genetics: a review. *Aquaculture*, 140: 197-216.

PISCOR, D.; FERNANDES, C.A.; PARISE-MALTEMPI, P. P. (2018). Conserved number of U2 snDNA sites in *Piabina argentea*, *Piabarchus stramineus* and two *Bryconamericus* species (Characidae, Stervadinae). *Neotrop. Ichthyol.*, 6: 1679-6225.

PISCOR, D.; PARISE-MALTEMPI, P. P. (2016a). Chromosomal mapping of H3 histone and 5S rRNA genes in eight species of *Astyanax* (Pisces, Characiformes) with different diploid numbers: syntenic conservation of repetitive genes. *Genome* 59, 167–172.

PENDÁS, A.M.; MORÁN, P.; GARCÍA-VÁZQUEZ E. (1994a). Organization and chromosomal location of the major histone cluster in brown trout, Atlantic salmon and rainbow trout. *Chromosoma* 103:147–152.

PUCCI MB, NOGAROTO V, MOREIRA-FILHO O. (2018). Dispersion of transposable elements and multigene families: Microstructural variation in *Characidium* (Characiformes: Crenuchidae) genomes. *Genetics and Molecular Biology*, 41(3): 585-592.

REIS, R. E.; PEREIRA, E. H. L.; ARMBRUSTER, J. W. (2006). Delturinae, a new loricariid catfish subfamily (Teleostei, Siluriformes), with revisions of *Delturus* and *Hemipsilichthys*. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 147: 277–299.

ROXO, F. F.; ALBERT, J. S.; SILVA, G. S.; ZAWADZKI, C. H.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. (2014). Molecular Phylogeny and Biogeographic History of the Armored Neotropical Catfish Subfamilies Hypoptopomatinae, Neoplecostominae and Otothyriinae (Siluriformes: Loricariidae). *PLOS ONE* 9(8): e105564. doi: 10.1371/journal.pone.0105564

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

SILVA, D. M. Z. A., UTSUNOMIA, R., PANSONATO-ALVES, J. C., OLIVEIRA, C., & FORESTI, F. (2015). Chromosomal Mapping of Repetitive DNA Sequences in Five Species of *Astyanax* (Characiformes, Characidae) Reveals Independent Location of U1 and U2 snRNA Sites and Association of U1 snRNA and 5S rDNA. *Cytogenetic and Genome Research*, 146(2), 144–152.

SILVA, D.M.Z.A., PANSONATO-ALVES, J.C., UTSUNOMIA, R., ARAYA-JAIME, C., RUIZ-RUANO, F.J., DANIEL, S.N., et al. (2014). Delimiting the origin of a B chromosome by FISH mapping, chromosome painting and DNA sequence analysis in *Astyanax paranae* (Teleostei, Characiformes). *PLoS ONE*, 9(4):e94896. doi:10.1371/journal.pone.0094896.

SILVA, D.M.Z.A., PANSONATO-ALVES, J.C., UTSUNOMIA, R., DANIEL, S.N., HASHIMOTO, D.T., OLIVEIRA, C., PORTO-FORESTI, F., FORESTI, F. (2013). Chromosomal organization of repetitive DNA sequences in *Astyanax bockmanni* (Teleostei, Characiformes): Dispersive location, association and co-localization in the genome. *Genetica*;141:329–336.

ÚBEDA-MANZANARO, M.; MERLO, M.A.; PALAZON, J.L.; CROSS, I, SARASQUETE, C.; REBORDINOS, L. (2010). Chromosomal mapping of the major and minor ribosomal genes, (GATA)<sub>n</sub> and U2 snRNA gene by double-colour FISH in species of the Batrachoididae family. *Genetica*;138:787-794.

UTSUNOMIA, R., SILVA, D. M. Z. de A., RUIZ-RUANO, F. J., ARAYA-JAIME, C., PANSONATO-ALVES, J. C., SCACCHETTI, P. C., FORESTI, F. (2016). Uncovering the Ancestry of B Chromosomes in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Teleostei, Characidae). *PLOS ONE*, 11(3).

UTSUNOMIA, R., SCACCHETTI, P. C., PANSONATO-ALVES, J. C., OLIVEIRA, C., & FORESTI, F. (2014). Comparative Chromosome Mapping of U2 snRNA and 5S rRNA Genes in *Gymnotus* Species (Gymnotiformes, Gymnotidae): Evolutionary Dynamics and Sex Chromosome Linkage in *G. pantanal*. *Cytogenetic and Genome Research*, 142(4), 286–292. doi:10.1159/000362258.

ZIEMNICZACK K., BARROS A.V, ROSA K.O, NOGAROTO V., ALMEIDA M.C, CESTARI MM, MOREIRA-FILHO O., ARTONI R.F, VICARI M.R. (2012). Comparatives Cytogenetics of Loricariidae (Actnopterygii: Siluriformes). Emphasis in Neoplecostominae and Hypoptopomatidae. *Italian Journal of zoology*. 79: 492-501.

## 5. CONCLUSÕES

- ✓ A espécie *Spatuloricaria* sp. apresentou número diploide semelhante ao citótipo descrito na literatura ( $2n=66$ ), mas a diferença observada no número fundamental sugere pequenas alterações macroestruturais na subfamília Loricariinae. A abundância de cromossomos acrocêntricos pode indicar uma tendência evolutiva no gênero *Spatuloricaria* mediada por rearranjos Robertsonianos do tipo fissão cêntrica,
- ✓ A marcação dispersa dos genes das histonas H1 e H3 em *Scobinancistrus aureatus* e *Scobinancistrus pariolispos* sugere que os sítios dessas sequências nos cromossomos em peixes possam não ser tão conservados como demonstrado em estudos anteriores e que associações com elementos de transposição podem estar atuando na dispersão desses genes.
- ✓ Nossos resultados sugerem que independentemente da localização cromossômica o número de sítios de snDNA U2 parece ser conservado entre as espécies descritas marcando em apenas 1 par cromossômico em cada espécie, corroborando os estudos mais recentes com mapeamento dessas sequências em peixes.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA-TOLEDO, L.F. (1998). Cytogenetic markers in Neotropical freshwater fishes. In: Malabarba, L.R.; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena, Z.M. S.; Lucena, C.A (eds). Phylogeny and classification of Neotropical fishes. EDIPUCRS. Porto Alegre, RS, BR. p. 583-588.
- ALVES, A. L.; OLIVEIRA, C.; NIRCHIO, M.; GRANADO, A.; FORESTI, F. (2006) Karyotypic relationships among the tribes of Hypostominae (Siluriformes:Loricariidae) with description of XO sex chromosome system in a Neotropical fish species. *Genetica*, 128: 1-9.
- ALVES, A. L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. (2005) Comparative cytogenetic analysis of eleven species of subfamilies Neoplecostominae and Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae). *Genetica*, 124: 127-136.
- ALVES, A.L. OLIVEIRA, C., FORESTI, F. (2003). Karyotype variability in eight species of the subfamilies Loricariinae and Ancistrinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). *Caryologia*, 56(1): 57-63.
- ARAI, R. 2011. Fish karyotypes: a check list. Springer Science & Business Media. Tóquio, JHS, JP. 340pp.
- ARMBRUSTER, J.W. (2004). Phylogenetic relationships of the suckermouth armoured catfishes (Loricariidae) with emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. *Zoological Journal of the Linnean Society*. 141: 1–80.
- ARMBRUSTER, J. W. (1998). Modifications of the digestive tract for holding air in loricariid and scoloplacid catfishes. *Copeia*: 663–675.
- ARTONI, R. F. & BERTOLLO, L. A. C. (2001). Trends in the karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). *Hereditas*. 134: 201-210.
- ARTONI, R. F. & BERTOLLO, L. A. C. (1999). Nature and distribution of constitutive heterochromatin in fishes, genus *Hypostomus* (Loricariidae). *Genetica* 106: 209–214.
- ARTONI, R. F. & BERTOLLO, L. A. C. (1996). Cytogenetic studies on Hypostominae (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). Considerations on karyotype evolution in the genus *Hypostomus*. *Caryologia*. 49: 81–90.

ARTONI, R.F. (1996). Estudos citogenéticos na família Loricariidae, com ênfase no gênero *Hypostomus* Lacépède (1803) (Pisces, Siluriformes). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo. 162pp

BACHTROG, D. A dynamic view of sex chromosome evolution. (2006) *Curr Opin Genetic. Dev* 16: 578-85.

BACHTROG, D. (2005). Sex chromosome evolution: molecular aspects of Y-chromosome degeneration in *Drosophila*. *Genome Research*, v. 15, n. 10, p. 1393-1401.

BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. e GALETTI Jr., P. M. (1986) Cytogenetics and taxonomy: considerations based on chromosome studies of freshwater fish. *J. Fish Biol.*, 28: 153-159.

BERTOLLO, L. A. C.; TAKASHI, C. S.; MOREIRA-FILHO, O. (1972). Citotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Brazilian Journal of Genetics* 2:103-120.

BIÉMONT, C. & VIEIRA, C. (2006). Junk DNA as an evolutionary force. *Nature*. 443: 521-524.

BIET, E., SUN J., DUTREIX, M. Conserved sequence preference in DNA binding among recombinant proteins: abnormal effect of ssDNA secondary structure. *Nucleic Acids Research*. v27, p596-600, 1999.

BISCOTTI, M. A.; OLMO, E.; HESLOP-HARRISON JS (Pat). (2015). Repetitive DNA in eukaryotic genomes. *Chromosome Res.* Doi: 10.1007/s10577-015-9499-z

BLANCO, D. R.; VICARI, M. R.; LUI, R. L.; ARTONI, R. F.; DE ALMEIDA, M. C.; TRALDI, J. B.; MARGARIDO, V. P.; MOREIRA-FILHO, O. (2014) Origin of the X1X1X2X2/X1X2Y sex chromosome system of *Harttia punctata* (Siluriformes, Loricariidae) inferred from chromosome painting and FISH with ribosomal DNA markers. *Genetica*. Apr. 142 (2):119-26.

BRINGMANN, P. & LUHRMANN, R. (1986). Purification of the individual snRNPs U1, U2, U5 and U4/U6 from HeLa cells and characterization of their protein constituents. *EMBO*

Journal. 5(13):3509-3516.

BUCK, S. & SAZIMA, I. (1995) An assemblage of mailed catfishes (Loricariidae) in southeastern Brazil: distribution, activity, and feeding. *Ichthyol. Explor. Freshwaters* 6: 325–332.

BUENO, V.; VENERE, P. C.; KONERAT, J. T.; ZAWADZKI, C. H.; VICARI, M. R.; MARGARIDO, V. P. (2014). Physical Mapping of the 5S and 18S rDNA in Ten Species of *Hypostomus* Lacépède 1803 (Siluriformes: Loricariidae): Evolutionary Tendencies in the Genus. *Hindawi Publishing Corporation e Scientific World Journal*.

BURGESS, W.E. An atlas of freshwater and marine catfish. T. F. H. Publications. 784- 1989.

CAVALIER-SMITH, T. (1985). Selfish DNA and the origin of introns. *Nature*, 315: 283–284.

CABRAL-DE-MELO, D. C.; MOURA, R. C.; MARTINS C. (2010). Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the beetle *Dichotomius geminatus* provide the first evidence for an association of 5S rRNA and histone H3 genes in insects, and repetitive DNA similarity between the B chromosome and A complement. *Heredity*. 104:393-400

CABRERO J, LÓPEZ-LEÓN MD, TERUEL M, CAMACHO JPM. (2009). Chromosome mapping of H3 and H4 histone gene clusters in 35 species of acridid grasshoppers. *Chromosome Res* 17:397–404. 2009.

CAMARGO, M.; GIMÊNES-JUNIOR, H.; PY-DANIEL, L. R. (2012). *Acaris ornamentais do médio rio Xingu*. Belém, 177 pp.

CENTOFANTE, L.; BERTOLLO, L. A.; MOREIRA-FILHO, O. (2006). Cytogenetic characterization and description of an XX/XY1Y2 sex chromosome system in catfish *Harttia carvalhoi* (Siluriformes, Loricariidae). *Cytogenet Genome Res*. 112(3-4):320-4.

CENTOFANE L.; BERTOLLO, L.A.C; MOREIRA-FILHO, O. (2002). A ZZ/ZW sex chromosome system in a new species of the genus *Parodon* (Pisces, Parodontidae). *Caryologia* 55:139-150.

CHARLESWORTH, B.; SNLEGOWSHI, P.; STEPHAN, W. (1994). The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 371: 215-220, 1994.

CHIACHIO, M. C.; OLIVEIRA, C.; MONTOYA-BURGOS, J. I. (2008). Molecular systematic and historical biogeography of the armored Neotropical catfishes Hypoptopomatinae and Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 49: 606–617.

CHILDS G.; MAXSON R.; COHN R.H., KEDES L.; ORPHONS: dispersed genetic elements derived from tandem repetitive genes of eukaryotes. (1981). *Cell* 23:651–663.

CIOFFI, M.B.; MARTINS, C.; BERTOLLO, L.A.C. (2010). Chromosomal spreading of associated transposable elements and ribosomal DNA in the fish *Erythrinus erythrinus*. Implications for genome change and karyoevolution in fish. *BMC Evolutionary Biology*.

COLGAN DJ, MCLAUCHLAN A, WILSON GDF, LIVINGSTON SP, EDGECOMBE GD, MACARANAS J, CASSIS G, GRAY MR (1998). Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. *Austral J Zool* 46: 419–437.

COVAIN, R.; FISCH-MULLER, S.; OLIVEIRA, C.; MOL, J.H.; MONTOYA-BURGOS, J.I., DRAY, S. (2016). Molecular phylogeny of the highly diversified catfish subfamily Loricariinae (Siluriformes, Loricariidae) reveals incongruences with morphological classification. *Mol Phylogenet Evol*. 94: 492–517.

COVAIN, R., Dray, S., FISCH-MULLER, S., MONTOYA-BURGOS, J.I.. (2008). Assessing phylogenetic dependence of morphological traits using co-inertia prior to investigate character evolution in Loricariinae catfishes. *Mol. Phylogenet. Evol*. 46, 986–1002.

CRAMER, C. A.; BONATTO, S. L.; REIS, R. E. (2011). Molecular phylogeny of the Neoplecostominae and Hypoptopomatinae (Siluriformes: Loricariidae) using multiple genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. V. 59, 43–52.

DA SILVA, M.; RIBEIRO, E. D.; MATOSO, D. A.; SOUSA, L. M.; HRBEK, T.; PYDANIEL, L. R.; FELDBERG, E. (2014). Chromosomal polymorphism in two species of *Hypancistrus* (Siluriformes: Loricariidae): an integrative approach for understanding their biodiversity. *Genetica*. 142:127-139.



DE OLIVEIRA, R. R.; FELDBERG, E.; ANJOS, M. B.; ZUANON, J. (2009). Mechanisms of chromosomal evolution and its possible relation to natural history characteristics in *Ancistrus* catfishes (Siluriformes: Loricariidae). *Journal of Fish Biology*. 75: 2209–2225.

DE OLIVEIRA, R. R.; FELDBERG, E.; DOS ANJOS, M. B.; ZUANON, J. (2008). Occurrence of multiple sexual chromosomes (XX/XY1Y2 and Z1Z1Z2Z2/Z1Z2W1W2) in catfishes of the genus *Ancistrus* (Siluriformes: Loricariidae) from the Amazon basin. *Genetica*. 134:243–249. Doi 10.1007/s10709-007-9231-9.

DE OLIVEIRA, R. R.; FELDBERG, E.; ANJOS, M. B.; ZUANON, J. (2007). Karyotype characterization and ZZ/ZW heteromorphism in two species of the catfish genus *Ancistrus* Kner, 1854 (Siluriformes: Loricariidae) from the Amazon basin. *Neotropical Ichthyology*. 5(3): 301–306.

DE OLIVEIRA, R. R.; SOUZA, I. L.; VENERE, P. C. (2006). Karyotype description of three species of Loricariidae (Siluriformes) and occurrence of the ZZ/ZW sexual system in *Hemiancistrus spilomma* Cardoso & Lucinda, 2003. *Neotropical Ichthyology*. 4(1): 93–97.

DOOLITTLE, W.F. & SAPIENZA, C. (1980). Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature* 284:601-603.

ESCHMEYER, W.N. & FONG, J.D. (2018): Species of fishes by family/ subfamily (<http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>). Acesso em: 17 Jan. 2018.

FARAH, S.B. Decifrando o genoma humano. In: DNA Segredos e Mistérios. 2007

FERREIRA, R.O.; PEREIRA, A.L.; NAGAMACHI, C.Y.; PIECZARKA, J.C.; de Sousa, L.M.; NORONHA, R.C.R. (2014). Caracterização citogenética de uma espécie de *Spatuloricaria* (Siluriformes, Loricariidae) do rio Xingu (Pará, Amazônia, Brasil). *Biota Amazônia*, 4(1): 30-36.

FERREIRA, I. A.; MARTINS, C. (2008). Physical chromosome mapping of repetitive DNA sequences in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: Evidences for a differential distribution of repetitive elements in the sex chromosomes. *Micron*, v. 39, n. 4, p. 411–418.

FICHBERG, I., OYAKAWA, O. T., & de PINNA, M. (2014). The End of an Almost 70-Year Wait: A New Species of *Spatuloricaria* (Siluriformes: Loricariidae) from the Rio Xingu and Rio Tapajós Basins. *Copeia* (2), 317–324. doi:10.1643/ci-13-103

FISCH-MULLER, S. (2003) Loricariidae-Ancistrinae (Armored catfishes). In: Reis RE, Kullander SO, Ferraris CJ Jr (Eds). Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre, 373–400.

FISHBASE. Disponível em <<http://www.fishbase.org/search.php>>. Acesso em: 08 Fev. 2018.

GARCIA-SOUTO, D., TRONCOSO, T., PEREZ, M., & PASANTES, J. J. (2015). Molecular Cytogenetic Analysis of the European Hake *Merluccius merluccius* (Merlucciidae, Gadiformes): U1 and U2 snRNA Gene Clusters Map to the Same Location. *PLOS ONE*, 10(12), e0146150.

GREGORY, T. R.; NICOL, J. A.; TAMM, H.; KULLMAN, B.; KULLMAN, K.; LEITCH, I. J.; MURRAY, B. G.; KAPRAUN, D. F.; GREILHUBER, J.; BENNETT, M. D. (2007). Eukaryotic genome size databases. *Nucleic Acids Research*, v. 35, n. Database, p. D332–D338.

GREGORY, T. R. (2005). Synergy between sequence and size in Large-scale genomics. *Nature Reviews Genetics*. 6: 699–708.

HAN, J.S. & BOEKE, J.D.; LINE-1 retrotransposons: Modulators of quantity and quality of mammalian gene expression? (2005). *BioEssays* 27:775–84.

HASHIMOTO, D.T.; FERGUSON-SMITH, M.A.; RENS, W.; PRADO, F.D.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. (2013). Cytogenetic mapping of H1 histone and ribosomal RNA genes in hybrids between cat-fish species *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum*. *Cytogen Genome Res.*139: 102–106.

HASHIMOTO, D.T.; FERGUSON-SMITH, M.A.; RENS, W.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. (2011). Chromosome mapping of H1 histone and 5S rRNA genes clusters in three species of *Astyanax* (Teleostei, Characiformes) *Cytogen Genome Res.*134: 64–71.

HENNING, F.; TRIFONOV, V.; FERGUSON-SMITH, M.A.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. (2008). Non-homologous sex chromosomes in two species of the genus *Eigenmannia* (Teleostei: Gymnotiformes). *Cytogenetic and Genome Research*, 121: 55-58.

ISBRÜCKER, I. J. H. (1980). Classification and catalogue of the mailed Loricariidae (Pisces, Siluriformes). *Verslagen en Technische Gegevens*. 22: 1–181.

ISBRÜCKER, I. J. H. (1979). Description préliminaire de nouveaux taxa de la famille des Loricariidae, poissons-chats cuirassés néotropicaux, avec un catalogue critique de la sousfamille nominale (Pisces, Siluriformes). *Revue Française d'Aquariologie et Herpetologie*, (5, for 1978): 86-116.

KAVALCO, K. F.; PAZZA, R.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. (2005). Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). *Heredity*. 94: 180-186.

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

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

KOCHER, T.D. (2004). Adaptive evolution and explosive speciation: the cichlid fish model. *Nature*. 5:288-298.

LANFREDI, M.; CONGIU, L.; GARRIDO-RAMOS, M. A.; HERRÁN, R. dela; LEIS, M.; CHICCA, M.; ROSSI, R.; TAGLIAVINI, J.; REJÓN, C. R.; REJÓN, M. R.; FONTANA, F. (2001). Chromosomal location and evolution of a satellite DNA family in seven sturgeon species. *Chromosome Research*, v. 9, n. 1, p. 47–52.

LEVAN A; FREDGA K; SANDBERG AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*. 52: 201-220.

LIMA-FILHO, P.A.; CIOFFI, M.B.; BERTOLLO, L.A.C.; MOLINA, W.F. (2012) Chromosomal and morphological divergences in Atlantic populations of the frillfin *Bathygobius soporator* (Gobiidae, Perciformes) *J Exp Mar Biol Ecol.*:34:63–70.

LONDOÑO-BURBANO, A.; URBANO-BONILLA, A.; ROJAS-MOLINA, Y.; RAMÍREZ-GIL, H. & PRADA-PEDREROS, S. (2018). A New Species of *Spatuloricaria* Schultz, 1944 (Siluriformes: Loricariidae), from the Orinoco River Basin, Colombia. *Copeia*, 106(4), 611–621. doi:10.1643/ci-18-087.

LONG, E.O. & DAVID, J.B. (1980) Repeated genes in eukaryotes. *Ann. Ver. Biochem.*, v.49, p.727-764.

LI, Y.C., KORD, A.B., FAHIMA T., BERLES A., NERO, E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutation mechanisms: a review. *Molecular Ecology*. V.11, p2453-2465. 2002.

LIU, Z.; Li, P.; KOCABAS, A.; KARSI, A.; JU, Z. (2001) Microsatellite-Containing Genes from the Channel Catfish Brain: Evidence of Trinucleotide Repeat Expansion in the Coding Region of Nucleotide Excision Repair Gene RAD23B. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001; 289:317–24

LOWE-MCCONNELL, R.H. (1999). *Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais*. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo. 533pp.

LUJAN, N. K.; ARMBRUSTER, J. W.; LOVEJOY, N. R.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, H. (2015). Multilocus molecular phylogeny of the suckermouth armored catfishes (Siluriformes: Loricariidae) with a focus on subfamily Hypostominae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 82: 269–288.

LUJAN, N. K.; ARMBRUSTER, J. W. (2011). Two new genera and species of Ancistrini (Siluriformes: Loricariidae) from the western Guiana Shield. *Copeia* 2, 216–225.

LUJAN, N. K.; HIDALGO, M.; STEWART, D. J. (2010). Revision of Panaque (Panaque), with descriptions of three new species from the Amazon Basin (Siluriformes, Loricariidae). *Copeia*. 676–704.

LYON, M.F. LINE-1 elements and X chromosome inactivation: A function for “junk” DNA? (2000) *Proc Natl Acad Sci*, 97: 6248–9.

MARIOTTO, S.; CENTOFANTE, L.; VICARI, M. R.; ARTONI, R. F.; MOREIRAFILHO, O. (2011). Chromosomal diversification in ribosomal DNA sites in *Ancistrus*

Kner, 1854 (Loricariidae, Ancistrini) from three hydrographic basins of Mato Grosso, Brazil. *CompCytogen* 5(4): 289–300. Doi: 10.3897/CompCytogen.v5i4.1757.

MARIOTTO, S.; CENTOFANTE, L.; MIYAZAWA, C. S.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA FILHO, O. (2009). Chromosome polymorphism in *Ancistrus cuiabae*. *Neotropical Ichthyology*, 7(4):595-600.

MARIOTTO, S. & MIYAZAWA, C. S. (2006). *Ancistrus cf. dubius* (Siluriformes, Ancistrinae), a complex of species. 1. Chromosomic characterization of four populations and occurrence of sexual chromosomes of type XX/XY, in the Pantanal basin of Mato Grosso, Brazil. *Caryologia*. 59, 299–304.

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

MARTINS C.; CABRAL-DE-MELLO DC, VALENTE G.T.; MAZZUCHELLI, J., OLIVEIRA S.G; PINHAL, D. (2011). Animal genomes under the focus of cytogenetics. New Hampshire: Nova Science Publisher.

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*, p. 421–453. Science Publisher Inc., Enfiel.

MATERA, A.G & WEINER, A.M. (1990) Schmid CW. Structure and evolution of the U2 small nuclear RNA multigene family in primates: Gene amplification under natural selection? *Molecular and Cellular Biology*. 10:5876-5882

MATSUNAGA, S. (2009) Junk DNA promotes sex chromosome evolution. *Heredity*, v. 102, n. 6, p. 525-526.

MENEZES, N. A.; WEITZMAN, S. E.; OYAKAWA, O. T.; LIMA, F. C.; CASTRO, R. M. C. C. & WEITZMAN, M. J. (2007). Peixes de água doce da Mata Atlântica. São Paulo: Museu de Zoologia da USP.

- MERLO, M.A.; CROSS, I.; CHAIRI, H.; MANCHADO, M.; REBORDINOS, L. (2010). Analysis of three multigene families as useful tools in species characterization of two closely-related species, *Dicentrarchus labrax*, *Dicentrarchus punctatus* and their hybrids. *Genes & Genetic Systems*. 85:341-349
- MICHELE, J.L.; TAKAHASHI, C.S.; FERRARI, I. (1977) Karyotypic study of some species of the family Loricariidae (Pisces). *Cytologia*, 42: 539-546.
- MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C. and GALETTI, Jr., P.M. (1993) Distribution of sex chromosome mechanisms in neotropical fish and description of a ZZ/ZW system in *Parodon hilarii* (Parodontidae). *Caryologia* 46: 115-125.
- NAGODA, N., FUKUDA, A., NAKASHIMA, Y., MATSUO, Y. (2005). Molecular characterization and evolution of the repeating units of histone genes in *Drosophila americana*: coexistence of quartet and quintet units in a genome. *Insect MolBiol* 14: 713-717.
- NEI, M. & ROONEY, A.P. (2005). Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. *Ann Rev Genetics* 39:121-152.
- NELSON, J.S. (2006). *Fishes of the World*. 4. ed. New Jersey: John Wiley & Sons.
- OLIVEIRA, C. & WRIGHT, J.M. (1998). Molecular cytogenetic analysis of heterochromatin in the chromosomes of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). *Chromosome Research*, 6: 205- 11.
- ORGEL, L.E. & CRICK. (1980). Selfish DNA: The ultimate parasite. *Nature*, 284: 604-607.
- OZOUF-COSTAZ C, BRANDT, J.; KORTING, C.; PISANO, E.; BONILLO, C.; COUNTACEAU, J.P.; VOLFF, J.N. Genome dynamics and chromosomal localization of the non-LTR retrotransposons *Rex 1* and *Rex 3* in Antarctic fish. *Antarct Sci* 16:51-57, 2004.
- PANSONATO-ALVES, J.C.; SERRANO, E.A.; UTSUNOMIA, R.; SCACCHETTI, P.C.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. (2013a) Mapping five repetitive DNA classes in sympatric species of *Hypostomus* (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae): Analysis of chromosomal variability. *Rev Fish Biol Fisher* 23:477–489.

PANSONATO-ALVES, J.C.; HILSDORF, A.W.S.; UTSUNOMIA, R.; SILVA, D.M.Z.A.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. (2013b) Chromosomal mapping of repetitive DNA and cytochrome C oxidase I sequence analysis reveal differentiation among sympatric samples of *Astyanax fasciatus*(Characiformes, Characidae) Cytogenet Genome Res. 41:133–142.

PARDUE, M.L. & DEBARYSHE, P.G. (2003). Retrotransposons Provide an Evolutionarily Robust Non-Telomerase Mechanism to Maintain Telomeres. Annu Rev Genet; 37:485–511.

PARISE-MALTEMPI, P.P.; MARTINS, C.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. (2007) Identification of a new repetitive element in the sex chromosomes of *Leporinus elongatus* (Teleostei: Characiformes: Anostomidae): new insights into the sex chromosomes of *Leporinus*. Cytogenetic Genome Research, 116:218–23.

PATHAK, D. & ALI, S. (2012). Repetitive DNA: A Tool to Explore Animal Genomes/Transcriptomes. Functional Genomics. Doi:org/10.5772/48259.

PENDÁS, A.M.; MORÁN, P.; GARCÍA-VÁZQUEZ E. (1994). Organization and chromosomal location of the major histone cluster in brown trout, Atlantic salmon and rainbow trout. Chromosoma 103:147–152.

PEASTON, A.E.; EVSIKOV, A.V.; GRABER, J.H.; de Vries, W.N.; HOLBROOK, A.E.; SOLTER, D and KNOWLES, B.B. (2004). Retrotransposons regulate host genes in mouse oocytes and preimplantation embryos. Dev Cell 7:597-606.

PHILLIPS, R.B. & REED, K.M. (1996). Application of fluorescence in situ hybridization (FISH) techniques to fish genetics: a review. Aquaculture, 140: 197-216.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 83: 2934-2938.

PISCOR, D.; PARISE-MALTEMPI, P. P. (2016a). Chromosomal mapping of H3 histone and 5S rRNA genes in eight species of *Astyanax* (Pisces, Characiformes) with different diploid numbers: syntenic conservation of repetitive genes. Genome 59, 167–172.

POLETTI, A. B.; FERREIRA, I. A.; MARTINS, C. The B chromosomes of the African cichlid fish *Haplochromis obliquidens* harbour 18S rRNA gene copies. BMC Genetics, v. 11, n. 1, p. 1, 2010.

PRANG, G. (2007). An Industry Analysis of the Freshwater Ornamental Fishery with Particular Reference to the Supply of Brazilian Freshwater Ornamentals to the UK Market. UAKARI. V. 3, n. 1, p. 7 – 51.

REIS, R. E.; PEREIRA, E. H. L.; ARMBRUSTER, J. W. (2006). Delturinae, a new loricariid catfish subfamily (Teleostei, Siluriformes), with revisions of *Delturus* and *Hemipsilichthys*. Zoological Journal of the Linnean Society, 147: 277–299.

REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS JR, C. J. (2003). Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. EDIPUCRS. Porto Alegre. 742 p.

RUBERT, M.; DA ROSA, R.; JEREP, F. C.; BERTOLLO, L. A. C.; GIULIANOCAETANO, L. (2011). Cytogenetic characterization of four species of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Loricariidae) with comments on its chromosomal diversity. CompCytogen 5(5): 397–410.

SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2 ed. Vol 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 253p.

SANTOS, G. M.; FERREIRA, E. J. G.; ZUANON, J. A. S (2006). Peixes comerciais de Manaus. 2. Ed. Manaus: Ibama/AM, ProVárzea.

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

SILVA, D.M.Z.A, PANSONATO-ALVES, J.C., UTSONOMIA, R., DANIEL, S.N., HASHIMOTO, D.T., OLIVEIRA, C., PORTO-FORESTI, F., FORESTI, F. (2013). Chromosomal organization of repetitive DNA sequences in *Astyanax bockmanni* (Teleostei, Characiformes): Dispersive location, association and co-localization in the genome. Genetica;141:329–336.



SHAPIRO, J.A. Mobile DNA and evolution in the 21st century. *Mobile DNA*;1:4; Disponível em: <http://www.mobilednajournal.com/content/1/1/4.2010>.

SILVA, D. M. Z. A., UTSUNOMIA, R., PANSONATO-ALVES, J. C., OLIVEIRA, C., & FORESTI, F. (2015). Chromosomal Mapping of Repetitive DNA Sequences in Five Species of *Astyanax* (Characiformes, Characidae) Reveals Independent Location of U1 and U2 snRNA Sites and Association of U1 snRNA and 5S rDNA. *Cytogenetic and Genome Research*, 146(2), 144–152.

SILVANO, R. A. M.; OYAKAWA, O. T.; DO ANIARAL, B. D.; BEGOSSI, A. (2001). Peixes do alto rio Juruá (Amazônia, Brasil). São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo: Imprensa Oficial do Estado, 298p.

STEINEMANN, S.; STEINEMANN, M. (2005) Retroelements: tools for sex chromosome evolution. *Cytogenetic and Genome Research*, v. 110, n. 1-4, p. 134-143.

SUMNER, A. Chromosomes Organization and Functions. (2003). Blackwell Science Ltd. Cap 7- p. 84-96.

ÚBEDA-MANZANARO, M.; MERLO, M.A.; PALAZON, J.L.; CROSS, I, SARASQUETE, C.; REBORDINOS, L. (2010). Chromosomal mapping of the major and minor ribosomal genes, (GATA)<sub>n</sub> and U2 snRNA gene by double-colour FISH in species of the Batrachoididae family. *Genetica*;138:787-794.

TRALDI, J. B.; BLANCO, D. R.; VICARI, M. R.; MARTINEZ, J. F.; LUI, R. L.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O. (2013). Physical mapping of (GATA)<sub>n</sub> and (TTAGGG)<sub>n</sub> sequences in species of *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae). *J. Genet.* 92, 127–130.

UTSUNOMIA, R., SCACCHETTI, P. C., PANSONATO-ALVES, J. C., OLIVEIRA, C., & FORESTI, F. (2014). Comparative Chromosome Mapping of U2 snRNA and 5S rRNA Genes in *Gymnotus* Species (Gymnotiformes, Gymnotidae): Evolutionary Dynamics and Sex Chromosome Linkage in *G. pantanal*. *Cytogenetic and Genome Research*, 142(4), 286–292. doi:10.1159/000362258.

VALENTE, G. T.; MAZZUCHELLI, J.; FERREIRA, I. A.; POLETTO, A. B.; FANTINATTI, B. E. A.; MARTINS, C. (2011). Cytogenetic Mapping of the Retroelements *Rex1*, *Rex3* and *Rex6* among Cichlid Fish: New Insights on the Chromosomal Distribution of Transposable Elements. *Cytogenetic and Genome Research*, v. 133, n. 1, p. 34–42.

VICARI, M. R.; NOGAROTO, V.; NOLETO, R. B.; CESTARI, M. M.; CIOFFI, M. B.; ALMEIDA, M. C. (2010). Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: methods, applications and perspectives. *J Fish Biol.* 76:1094–1116. Doi:10.1111/j.1095-8649.2010.02564.x.

VOLFF, J.N. (2006) Turning junk into gold: Domestication of transposable elements and the creation of new genes in eukaryotes. *BioEssays* 28:913–22.

VOLFF, J.N. (2005). Genome evolution and biodiversity in teleost fish. *Heredity*, 94:280-294.

WEBER, C. (2003). Subfamily Hypostominae (armored catfishes). In: Reis, R. E., S. O. Kullander & C. J. Ferraris, Jr. (eds.), *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. EDIPUCRS, Porto Alegre. xi + 729 pp.

WONG, L. H. & CHOO, K. H. A. (2004). Evolutionary dynamics of transposable elements at the centromere. *Trends in Genetics*, v. 20, n. 12, p. 611–616, 2004

ZUANON, J. A. S. (1999). História natural da ictiofauna de corredeiras do rio Xingu, na região de Altamira, Pará. Tese (doutorado em Ecologia), Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 197 p.