



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE ECOLOGIA AQUÁTICA E PESCA DA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA AQUÁTICA E PESCA

CARLOS EDUARDO VASCONCELOS DOS SANTOS

**MAPEAMENTO FÍSICO DE DNAS REPETITIVOS EM ESPÉCIES DE
LORICARÍDEOS PERTENCENTES A SUBFAMÍLIA HYPOSTOMINAE**

BELÉM-PA
2021

CARLOS EDUARDO VASCONCELOS DOS SANTOS

**MAPEAMENTO FÍSICO DE DNAs REPETITIVOS EM ESPÉCIES DE
LORICARÍDEOS PERTENCENTES A SUBFAMÍLIA HYPOSTOMINAE**

Trabalho de dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aquática e Pesca da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ecologia Aquática e Pesca.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Coelho Rodrigues Noronha.

**BELÉM-PA
2021**

CARLOS EDUARDO VASCONCELOS DOS SANTOS

**MAPEAMENTO FÍSICO DE DNAS REPETITIVOS EM ESPECIES DE
LORICARÍDEOS PERTENCENTES A SUBFAMILIA HYPOSTOMINAE**

Trabalho de dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aquática e Pesca da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ecologia Aquática e Pesca.

Banca Examinadora:

Prof^a. Dra. Renata Coelho Rodrigues Noronha (Presidente)

Prof. Dr. Leonardo dos Santos Sena (Membro interno)

Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari (Membro externo)

Prof. Dr. Aduino Lima Cardoso (Membro externo)

Prof^a. Dra. Cleusa Yoshiko Nagamachi (Suplente)

**BELÉM-PA
2021**

RESUMO

A família Loricariidae (Siluriformes) é um grupo de peixes neotropicais que apresenta uma grande diversidade de espécies, e uma filogenia em constante reformulação, com muitos integrantes ainda não propriamente caracterizados. Grande parte do genoma dos organismos eucariontes é constituído por DNA repetitivo, e o uso dessas sequências como marcadores citogenéticos no estudo de peixes neotropicais, têm fornecido dados importantes sobre sua organização e diversificação, e seu papel na evolução genômica, auxiliando na identificação e caracterização taxonômica de espécies e gêneros. Para este estudo foi realizado o mapeamento físico de retroelementos ERV1, famílias multigênicas DNAr 18S, Histonas H1 e H3, snRNA U2 e microssatélite (GATA) n em espécies de loricarídeos, pertencentes a subfamília Hypostominae, com representantes dos gêneros *Hypostomus* (*Hypostomus* sp.), *Hypancistrus* (*Hypancistrus* sp. e *H. zebra*) e *Peckoltia* (*P. vittata*), visando observar o padrão de distribuição dessas sequências repetitivas no cariótipo dessas espécies, compará-los entre si e compreender a dinâmica genômica destes DNAs repetitivos. Os resultados obtidos revelaram que *Hypostomus* sp. apresenta $2n = 64$, enquanto *Hypancistrus zebra*, *Hypancistrus* sp. “pão” e *Peckoltia vittata* apresentam $2n = 52$, com fórmulas cariotípicas divergentes. O bandeamento C revelou a presença de dois ou mais pares cromossômicos apresentando blocos heterocromáticos, localizados nas regiões terminais ou ao longo de braços dos cromossomos. Quanto ao mapeamento de DNAs repetitivos, registramos a presença de sinais dispersos de ERV1, Histona H3 e (GATA) n no cariótipo das quatro espécies, com Histona H1 distribuída ao longo dos cromossomos em *H. zebra*, *Hypancistrus* sp. “pão” e *Hypostomus* sp., enquanto que *P. vittata* apresentou um *cluster* de H1 na região heterocromática intersticial do par 18; a maior parte das espécies apresentou um par de sinais DNAr 18S, exceto *Hypancistrus* sp. “pão”, com 5 *clusters*; associação de sítios DNAr 18S-ERV1 foi observada em todas as espécies; o mapeamento de snRNA U2 em *Hypancistrus zebra* mostrou *clusters* terminais nos pares 1,10 e 19. A presença de pelo menos um par cromossômico com sinais de DNAr 18S em *Hypostomus* sp., *P. vittata* e *H. zebra* foi observada em Loricariidae e outros grupos de peixes, contrastando com *Hypancistrus* sp. “pão” que mostrou presença deste multigene em pares não descritos previamente. A colocalização dos sinais de DNAr 18S e ERV1 indica a interação entre família multigênicas e elementos móveis. A distribuição dispersa das sequências (GATA) n e Histona H1 e H3 corrobora estudos anteriores, sendo, possivelmente, resultante de interferência de TEs. Quanto ao mapeamento de snRNA U2 em *H. zebra*, a presença de *clusters* em múltiplos pares cromossômicos também foi relatada em outros grupos de peixes e atribuída a ação de eventos de transposição. Os dados obtidos indicam que diversos processos como rearranjos cromossômicos e ação de TEs podem influenciar a dinâmica cariotípica em Hypostominae.

Palavras-chave: DNAs repetitivos, elementos transponíveis, ERV1, famílias multigênicas, DNAr 18S, Histonas, snRNA U2, Loricariidae, peixes neotropicais.

ABSTRACT

The Loricariidae family (Siluriformes) is a group of Neotropical fish that presents a great diversity of species, and a phylogeny in constant reformulation, with many members not yet properly characterized. Much of the genome of eukaryotic organisms is made up of repetitive DNA, and the use of these sequences as cytogenetic markers in the study of neotropical fish has provided important data on their organization and diversification, and their role in genomic evolution helping to identify and taxonomic characterization of species and genera. For this study, physical mapping of the retroelement ERV1, multigenic families of DNAr 18S, Histone H1, H3, U2 snRNA and microsatellite (GATA)_n in species of loricarids, belonging to the subfamily Hypostominae, was carried out, with representatives of the genera *Hypostomus* (*Hypostomus* sp.), *Hypancistrus* (*Hypancistrus* sp. “pão” And *H. zebra*) and *Peckoltia* (*P. vittata*), aiming at observing the distribution pattern of these repetitive sequences in the karyotype of these species, comparing them and understanding the genomic dynamics of these repetitive DNAs. The obtained results revealed that *Hypostomus* sp. presents $2n = 64$, *Hypancistrus zebra*, *Hypancistrus* sp. “pão” and *Peckoltia vittata* present $2n = 52$ and have divergent karyotype formula. The C banding revealed the presence of two or more chromosomal pairs presenting heterochromatic blocks, located in the terminal regions or along the arms of the chromosomes. As for the mapping of repetitive DNAs, we recorded the presence of scattered signals of ERV1, Histone H3 and (GATA)_n in the karyotype of the four species, with Histone H1 being distributed along the chromosomes in *H. zebra*, *Hypancistrus* sp. “pão” and *Hypostomus* sp. “pão”, while *P. vittata* presented an H1 *cluster* in the interstitial heterochromatic region of pair 18; most species presented a pair of DNAr 18S signals, except *Hypancistrus* sp., with 5 clusters; association of 18S-ERV1 sites were observed in all species; mapping of U2 snRNA in *Hypancistrus zebra* showed terminal clusters in 1, 10 and 19 pairs. The presence of at least one chromosome pair with DNAr 18S signals in *Hypostomus* sp., *P. vittata* and *H. zebra* was observed in Loricariidae and other fish groups, contrasting with *Hypancistrus* sp. “pão” which showed the presence of this multigene in pairs not previously described. The colocalization of DNAr 18S and ERV1 signals indicates the interaction between multigene family and mobile elements. The dispersed distribution of (GATA)_n and Histone H1 and H3 sequences corroborate previous studies, possibly resulting from TE interference. As for the mapping of U2 snRNA in *H. zebra*, the presence of *clusters* in more than one chromosomal pair has also been reported in other fish groups and attributed the action of transposition events. The data obtained indicate that several processes such as chromosomal rearrangements and TEs action may be influencing the karyotype dynamics in Hypostominae.

Keywords: Repetitive DNAs, transposable elements, ERV1, multigenic families, DNAr 18S, Histones, U2 snRNA, Loricariidae, Neotropical fish.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à DEUS pela vida que ele me concedeu, e todas as bênçãos em minha vida.

Agradeço a minha família por me dar suporte neste momento da minha vida.

Agradeço a meus amigos de graduação por terem me auxiliado e por sempre estarem do meu lado.

Agradeço à minha orientadora, a Prof^a. Dra. Renata Coelho Rodrigues Noronha, por ter me aceitado como aluno, e por me instruir em meus estudos.

Agradeço aos professores, Prof^a. Dra. Cleusa Yoshiko Nagamachi e Prof. Dr. Julio Cesar Pieczarka, pelas contribuições e por disponibilizarem a infraestrutura necessária.

Agradeço ao Prof. Dr. Bruno Almeida e o Mestre Luan Frade, por terem me auxiliado na orientação para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço aos meus colegas de trabalho, por me auxiliarem e me dado apoio.

Agradeço ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aquática e Pesca (PPGEAP).

Agradeço a equipe de pesquisa do Centro de Estudos Avançados da Biodiversidade (CEABIO).

Agradeço ao CNPq e a CAPES por disponibilizem o auxílio financeiro, através da bolsa, para a produção deste trabalho, e à UFPA pelo suporte ao longo do Mestrado.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	4
1.1. Considerações sobre a família Loricariidae	4
1.2. DNAs repetitivos	10
1.3. Citogenética de Loricariidae	12
2. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivo Geral	15
2.2. Objetivos Específicos	15
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1. Amostragem	16
3.2. Obtenção de cromossomos metafásicos	16
3.3. Preparação citológica das lâminas.....	16
3.4. Classificação morfológica dos cromossomos	17
3.5. Citogenética molecular	17
3.5.1. Isolamento de sequências.....	17
3.5.2. <i>Nick-translation</i>	18
3.5.3. Preparação das lâminas.....	18
3.5.4. Hibridização	19
3.5.5. Lavagem de estringência e detecção das sondas.....	19
3.6. Captura e tratamento das imagens.....	19
4. RESULTADOS	20
5. CONCLUSÃO	38
6. REFERÊNCIAS	39

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações sobre a família Loricariidae

A região neotropical possui uma das mais diversas ictiofaunas do mundo, com aproximadamente 5160 espécies, 739 gêneros, 69 famílias e 20 ordens (REIS et al., 2016; PAIM et al., 2018). A família Loricariidae (Siluriformes) apresenta uma abundante diversidade de espécies (NELSON et al., 2016; REIS et al., 2016; ROXO et al., 2019), sendo considerada a mais diversa entre os Siluriformes, com 1020 espécies válidas distribuídas em 163 gêneros (ISBRUCKER, 1980; ARMBRUSTER, 2004; FRICKE, 2019; ESCHMEYER; FONG, 2021).

Os loricarídeos são representantes importantes da ictiofauna dulcícola (ISBRUCKER, 1980), sendo amplamente distribuídos na região neotropical (BURGESS, 1989; REIS et al., 2003), ocupando ambientes lóticos e lênticos de diversos sistemas hidrográficos ao longo da América do Sul e América Central, desde as correntes andinas, acima de 3.000 metros do nível do mar, até as planícies de inundação do Pantanal e da Amazônia, além de estuários da região costeira ao norte da América do Sul (ARMBRUSTER, 2004; LUJAN et al., 2015).

Popularmente chamados de cascudos ou acari, esses peixes são caracterizados por apresentarem o corpo recoberto por placas dérmicas ósseas, uma boca com lábios modificados formando um disco de sucção localizada na face ventral, possibilitando que estes se fixem no substrato (GEERINCKX, 2011) e pela presença de dentes dérmicos chamados de odontodes (GARG et al., 2010). Alimentam-se de algas e detritos (BUCK; SAZIMA, 1995), com algumas espécies adaptadas ao consumo de madeira, sementes e até macroinvertebrados (LUJAN et al., 2011; 2015).



Figura 1: exemplar de *Peckoltia greedoi* sp. Setas mostram as placas ósseas (a) e a boca modificada para sucção (b) presente nos peixes pertencentes a Loricariidae. (Fonte: retirado e adaptado de ARMBRUSTER et al., 2015).

As espécies de Loricariidae são, em sua maioria, peixes de pequeno e médio porte, com algumas espécies alcançando quase 1 metro de comprimento (LUJAN et al., 2010). Esses animais também apresentam uma grande capacidade adaptativa, com algumas espécies sendo capazes de desempenhar uma respiração acessória ou aérea obtida pelo estômago, garantindo que estes organismos sobrevivam em ambientes com baixo oxigênio ou até mesmo fora da água, por um curto período de tempo (MATTIAS; ARMBRUSTER, 1998; CRUZ et al., 2009).

Esses animais possuem uma grande importância econômica, pois suas formas e cores exóticas os tornam atrativos para o comércio de peixes ornamentais (SANTOS et al., 2006). A pesca ornamental representa uma importante atividade econômica, com países como o Brasil e Colômbia sendo os principais exportadores de peixes ornamentais (DE SOUSA et al., 2018), com grande parte dessas espécies sendo destinadas ao mercado internacional com consumidores como a Europa, América do Norte e Ásia (PRANG, 2007). 88% das exportações de peixes ornamentais no Brasil, concentram-se nos estados do Pará e Amazonas (ARAÚJO et al., 2017), com diversas espécies de loricarídeos sendo comercializadas e encontrados nas bacias do Xingu e Tápajós (BUCKUP & SANTOS, 2010; ARAÚJO, 2016).

A organização filogenética de Loricariidae é bastante controversa, sofrendo constantes reformulações (REIS et al., 2006; LUJAN et al., 2015; PEREIRA & REIS, 2017). Diversos estudos utilizando dados morfológicos e moleculares foram realizados visando estabelecer as relações filogenéticas de espécies, gêneros e subfamílias pertencentes a este grupo, e propuseram a divisão da família Loricariidae em seis subfamílias: Delturinae, Hypoptopomatinae, Hypostominae, Lithogeninae, Loricariinae e Neoplecostominae (ISBRUCKER, 1980; SCHAEFER, 1987; ARMBRUSTER, 2004, REIS et al., 2006; LUJAN et al., 2015).

Apesar dessas análises filogenéticas terem providenciado um auxílio na classificação de Loricariidae, muitas espécies e gêneros ainda não apresentam uma caracterização concreta, especialmente as pertencentes a subfamília Hypostominae, que concentra a maior diversidade entre os loricarídeos, com aproximadamente 400 espécies e 40 gêneros, (ARMBRUSTER, 2004; LUJAN et al., 2015). Hypostominae, inicialmente foi dividida em cinco tribos: Ancistrini, Hipostomini, Corymbophanini, Pterygoplichthini e Rhineleporini (ARMBRUSTER, 2004), porém análises moleculares realizadas por Lujan et al. (2015) levaram a divisão da subfamília Hypostominae em duas tribos: Ancistrini e

Hypostomini, e a adição de sete clados a nível de tribo: os clados Chaetostoma, Lithoxus, Pseudancistrus, ‘Pseudancistrus’, Acanthis, Hemiancistrus e Peckoltia.

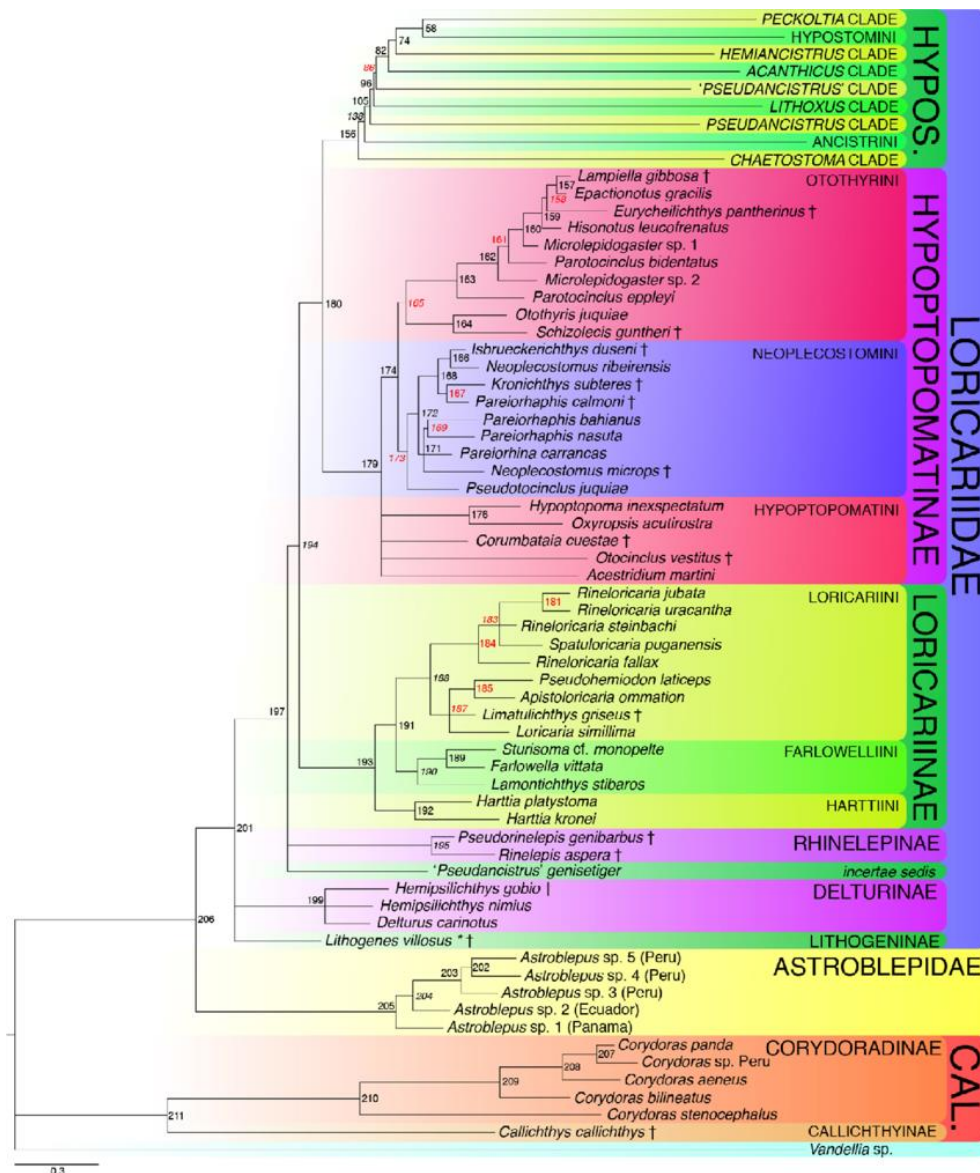


Figura 2: Organização filogenética de Loricariidae. (Fonte: retirado e adaptado de LUJAN et al., 2015).

Hypostomus constitui como o único gênero pertencente a tribo Hypostomini, e apresenta 128 espécies válidas (CARVALHO et al., ZAWADZKI et al., 2010; MARTINS et al., 2012) sendo considerado como o gênero mais rico em espécies entre os loricarídeos. As espécies deste grupo são caracterizadas por apresentarem tamanho pequeno e robusto, e ausência de pedúnculo caudal deprimido e nadadeira adiposa (ARMBRUSTER, 2004), e seus representantes estão distribuídos pela região das Américas Central e do Sul, sendo

capazes de habitar qualquer ambiente aquático embora prefiram locais de águas correntes (MONTROYA-BURGOS, 2003; FERRARIS, 2007).



Figura 3: exemplar de *Hypostomus regani*. Foto tirada por JJPhoto. (Fonte: Retirada de FISHBASE)

O gênero *Peckoltia*, é constituído por 18 espécies válidas, distribuídas desde pequenas drenagens costeiras nas Guianas até a bacia do Orinoco e muitos rios da bacia Amazônica como, o Amazonas, Tapajós, Jari, Xingu, Tocantins, Araguaia, Juruá, Madeira, Purus, Branco e Uatuma (FISCH-MULLER, 2003; ARMBRUSTER, 2008; OLIVEIRA et al., 2012; ARMBRUSTER et al., 2015). Este gênero possui uma filogenia historicamente controversa e suas espécies são muitas vezes associadas, de forma equivocada, ao gênero *Hemiancistrus* (ARMBRUSTER, 2004; 2008). As espécies de *Peckoltia* caracterizam-se pela presença de selas dorsais escuras, a ausência de carenas nas placas corporais, região abdominal desprovida de placas e a presença de odontodes hipertrofiados nas bochechas (ISBRUCKER, 1980; ARMBRUSTER, 2003, OLIVEIRA et al., 2012). A diferenciação das espécies de *Peckoltia* se dá pelos padrões de coloração, o que os tornam peixes atrativos para a pesca ornamental (ARMBRUSTER, 2008).



Figura 4: Exemplar de *Peckoltia vittata*. Foto tirada por Gabriel Lelis Togni. (Fonte: FISHBASE).

Hypancistrus é um gênero de *Loricariidae* com 8 espécies válidas (TAN, M. & ARMBRUSTER, 2016), sendo sua espécie tipo, o *Hypancistrus zebra* Isbrücker and Nijssen (1991). Os representantes deste gênero são caracterizados por apresentarem uma ampla separação anterior entre o metapterigóide e etmoide lateral, uma crista palatina adutora de ângulo agudo, e falta da parede lateral do canal metaterigóide (ARMBRUSTER, 2002). Espécies de *Hypancistrus* se distinguem morfológicamente de outros Hypostomíneos por apresentarem poucos e maiores dentes na sua região dentária em relação ao seu pré-maxila. *Hypancistrus* são muito procurados pela pesca ornamental por apresentarem exuberantes e diversos padrões de coloração, sendo estes padrões uma das poucas características morfológicas que permitem a identificação e diferenciação de espécies pertencentes a este gênero (ARMBRUSTER, 2004; ARMBRUSTER et al., 2007).



Figura 5: exemplar de *Hypancistrus zebra*. Foto tirada por Seidel, I. (Fonte: FISHBASE).

1.2. DNAs repetitivos

As sequências de DNA repetitivos representam grande parte do genoma dos organismos, apresentando alta variabilidade e constituindo, em alguns casos, mais de 80% do DNA da célula (CHARLESWORTH et al., 1994). Inicialmente, essas sequências foram caracterizadas como “DNA lixo” (DOOLITTLE & SAPIENZA, 1980; ORGEL & CRICK, 1980, SCHMIDT & HESLOP-HARRISON, 1998) entretanto, atualmente sabe-se que os DNAs repetitivos desempenham importantes funções para a organização estrutural e funcional do genoma (KAZAZIAN, 2004; BIÉMONTTE & VIEIRA, 2006), estando envolvidas em processos de recombinação (BIET et al., 1999), expressão gênica (LIU et al., 2001) e replicação do DNA (LI et al., 2002), sendo consideradas como importantes marcadores moleculares, ajudando em esclarecer relações filogenéticas de espécies (DE LA HERRÁN et al., 2001, SAITO et al., 2007, RUBERT et al., 2008; VICARI et al., 2010).

Sequências de DNAs repetitivos podem estar organizadas em repetições *in tandem*, como as famílias multigênicas (DNA ribossomal, proteínas histônicas e pequenos RNAs nucleares) e os DNAs satélites, minissatélites e microssatélites ou podem ser dispersas ao longo do genoma, como os elementos transponíveis (CHARLESWORTH et al., 1994; JURKA et al., 2007).

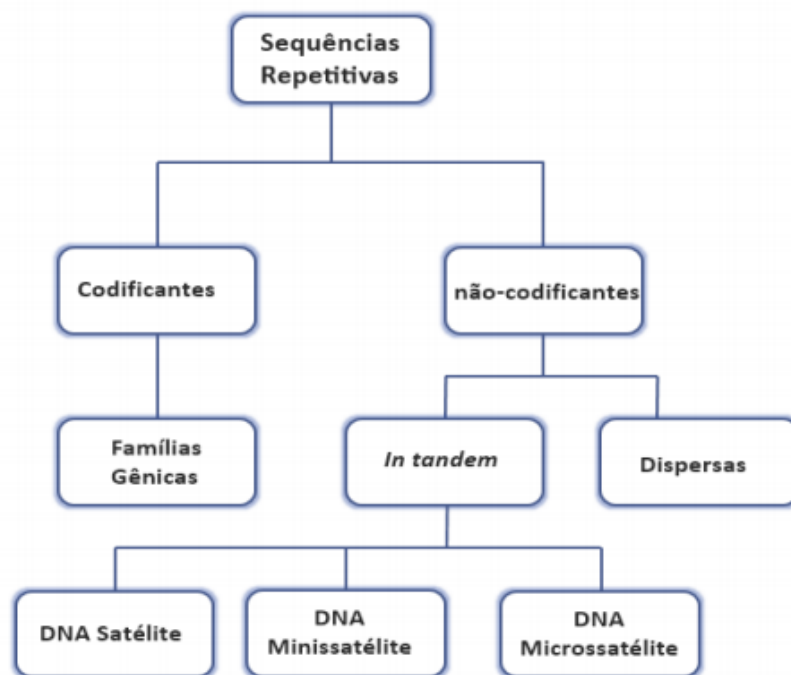


Figura 6: Organização das classes de DNAs repetitivos em eucariotos. (Fonte: adaptado de MARTINS et al., 2011).

As famílias multigênicas são sequências de DNA que possuem similaridade estrutural e funcional originadas a partir de um gene ancestral comum (NEI & ROONEY, 2005). Entre uma das famílias multigênicas encontra-se a família de genes ribossomais (DNAr). Esses genes são classificados em duas famílias de sequências organizadas *in tandem*: DNAr 5S, que corresponde a uma sequência de codificação altamente conservada de 120 pares de bases (bp); e DNAr 45S (incluindo 18S, 5.8S e 28S), que é responsável pela organização do nucléolo (LONG & DAWID, 1980). Genes de histonas constituem uma complexa família multigênica, com variável número de cópias agregadas em uma ou mais regiões cromossômicas (KEDES, 1979; CHILDS et al., 1981). Ainda existem poucas informações sobre a localização e organização de genes histonas no genoma de peixes, especialmente considerando que poucas espécies tiveram o seu genoma mapeado com genes de histonas (PENDÁS et al., 1994; HASHIMOTO et al., 2011, 2013; LIMA-FILHO et al., 2012; PANSONATO-ALVES et al., 2013a, 2013b; SILVA et al., 2013; UTSUNOMIA et al., 2014; PUCCI et al., 2018; TRALDI et al., 2019a). Os resultados obtidos a partir do mapeamento dessas sequências têm mostrado que os genes de histonas formam blocos (*clusters*) conspícuos pelo cariótipo de organismos (PENDÁS et al., 1994; HASHIMOTO et al., 2011, 2013; LIMA-FILHO et al., 2012), embora tenha sido observado a presença de sinais dispersos ao longo do cariótipo, sendo

resultado da possível interação com elementos transponíveis (UTSUNOMIA et al., 2014; PUCCI et al., 2018; TRALDI et al., 2019a). Outra família multigênica presente no genoma dos organismos são os genes de snRNA (small nuclear RNA) U, uma família de genes de RNAs não codificantes subdividida em cinco tipos U1, U2, U4, U5 e U6, e que atuam no processo de *splicing* do RNA (BRINGMANN & LUHRMANN, 1986; VALADKHAN, 2005; NEI & ROONEY, 2005). O mapeamento de genes snRNA U2 são restritas a poucas espécies de peixes (MERLO et al., 2010; 2012; UBEDA-MANZANARO et al., 2010; CABRAL DE MELLO et al., 2012; SUPIWONG et al., 2013; UTSUNOMIA et al. 2014b; PISCOR et al., 2018; PUCCI et al., 2018) onde apresentam um padrão conservado. Também foi observado a interação destes genes com famílias multigênicas ribossomais, embora estes estudos sejam escassos (YANO et al., 2017).

Microsatélites ou sequências simples repetidas (SSRs) são DNAs repetitivos curtos, altamente dinâmicos, organizados *in tandem* e repetidos de 5 a 100 vezes pelo genoma (EPPLEN & EPPLEN-HAUPT, 2002; MARTINS, 2007), estando envolvidos em processos de expressão de genes e estruturação cromossômica (PUCCI et al., 2016). O elemento (GATA)_n é um microsatélite que compõe o satDNA BKM (Banded krait minor) isolado do cromossomo W da espécie de cobra *Elaphe radiata*, e conservado em outras espécies (EPPLEN et al., 1982; SINGH et al., 1984; JONES & SINGH, 1985). Estudos realizados mostram a associação entre o elemento (GATA)_n e cromossomos sexuais de espécies, desempenhando um importante papel na organização genômica, e auxiliando na identificação de diferenças moleculares e estruturais entre seres vivos (SINGH et al., 1984; SRIVASTAVA et al., 2008).

Elementos transponíveis (TEs), são sequências de DNA que apresentam a capacidade de se locomover pelo genoma (HARLT et al., 1992), provocando alterações funcionais de genes os quais estão associados, além de desempenhar uma grande influência nos processos evolutivos dos genomas dos organismos (CAPY et al., 1998), sendo considerados *hotspots* de mutação (KIDWELL, 2002). Os TEs são classificados de acordo com a sua organização estrutural e seu mecanismo de transposição, sendo da classe I os retrotransposons, que se propagam com intermediários de RNA e da classe II aqueles cujos intermediários são moléculas de DNA, se inserindo diretamente no genoma (FINNEGAN, 1989; KIDWELL, 2002; WICKER et al., 2007). Entre os membros da classe dos retrotransposons destacam-se os retrovírus endógenos (ERVs), elementos originados a partir da inserção de material genético viral que é integrado no genoma do organismo hospedeiro. Uma vez inseridos, esses genes vêm a fazer parte do genoma

hospedeiro por milhões de anos através de transmissão vertical já que estes genes são herdados de pais para filhos (FESCHOTTE & GILBERT, 2012). Estes elementos atuam no funcionamento do genoma e na sua estruturação, contribuindo para a evolução dos organismos (BOURQUE et al., 2008; FESCHOTTE, 2008).

Com o auxílio da hibridização *in situ* fluorescente (FISH) é possível realizar o mapeamento físico dessas sequências a fim de observar sua organização e distribuição nos cromossomos de organismos, possibilitando identificar a diversificação e conservação entre espécies (SCHWARZACHER, 2003; CIOFFI & BERTOLLO, 2012).

1.3. Citogenética de Loricariidae

Estudos citogenéticos em espécies de Loricariidae mostram que este grupo de vertebrados apresenta uma ampla variação quanto ao número diplóide ($2n$), desde $2n=34$ em *Ancistrus cuiabae* (MARIOTTO et al., 2009) até $2n=96$ em *Upsilon* sp. (KAVALCO et al., 2005), tendo o $2n=54$ como provável número diploide ancestral (ARTONI & BERTOLLO, 2001). A variação de $2n$ em Loricariidae se dá pelos diferentes padrões polimórficos intra e interespecíficas originados a partir de rearranjos robertsonianos (GIULIANO-CAETANO et al., 1998; MENDES-NETO et al., 2011; ZIEMNICZAK et al., 2012).

Entre os Loricarídeos, análises citogenéticas abordando membros da subfamília Hypostominae são representativos, sendo uma subfamília bastante complexa (MARTINEZ et al., 2011). A partir de análises realizadas sobre Hypostominae por Artoni e Bertollo (2001), foi observado a relação invertida entre o número diploide e a quantidade de cromossomos de dois braços, sugerindo a ocorrência de rearranjos cromossômicos durante a evolução deste grupo. A presença de cromossomos sexuais diferenciados em peixes loricarídeos não são comumente evidenciados, embora eles já tenham sido relatados (ALVES et al., 2006; DE Oliveira et al., 2007; 2008; BLANCO et al., 2014). No gênero *Hypostomus* foi encontrado a presença de um sistema sexual simples XX/XY e ZZ/ZW em espécies como *Hypostomus* sp. G, *H. cf. plecostomus*, *H. ancistroides* e *H. macrops* (ARTONI et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2015; ROCHA-REIS et al., 2018).

Heterocromatina é um importante fator para a diversificação cariotípica em peixes (OJIMA & UETA, 1979; ARTONI & BERTOLLO, 1999; GALETTI JR., 2000) e a localização de regiões heterocromáticas tem auxiliado na identificação de polimorfismos, caracterizando a variabilidade intra-populacional de algumas espécies (MANTOVANI et

al., 2000; ALVES et al., 2003; DE OLIVEIRA et al., 2007; 2008; 2009). Em peixes, a presença e quantidade de blocos heterocromáticos indica a ocorrência de rearranjos cromossômicos, especialmente durante a origem de certos tipos de cromossomos, como cromossomos B e sexuais (VICARI et al., 2010). Em Loricariidae é observado que a quantidade e distribuição de heterocromatina constitutiva é bastante diversificada entre espécies, apresentando grandes ou pequenos blocos de heterocromatina distribuídos pelo cariótipo, ou regiões heterocromáticas presentes em múltiplos cromossomos ou em apenas alguns pares (ARTONI & BERTOLLO, 1999; KAVALCO et al., 2004; SOUZA et al., 2009; DA SILVA et al., 2014)

Dados sobre o gênero *Hypostomus*, mostram que este gênero apresenta grande variação no valor do seu número diploide, variando de $2n=52$ em *Hypostomus emarginatus* (ARTONI E BERTOLLO, 2001) a $2n=84$ em *Hypostomus* sp. (CEREALI et al., 2008). Além do valor do seu número diploide, estes peixes apresentam características não conservadas em relação a macroestrutura cariotípica e bandeamento cromossômico (ARTONI E BERTOLLO, 1996). Em relação a sua dinâmica cromossômica, este grupo é considerado altamente diversificado, e estudos apontam que processos de rearranjos cromossômicos como fissões cêntricas, inversões pericêntricas, deleções, duplicações e heterocromatinização contribuem para a evolução cromossômica desse gênero (ARTONI & BERTOLLO, 2001; BUENO et al., 2012).

Estudos citogenéticos sobre espécies de *Peckoltia* são limitados. A literatura de *Peckoltia* mostra que estes animais apresentam em sua maioria $2n=52$, indicando que este gênero possui um cariótipo bastante conservado (SOUZA et al., 2009; PETY et al., 2018). Estudos de citogenética molecular voltados a espécies de *Peckoltia* são limitados à análise de sequências DNAr 18S e 5S, que mostraram presença de *clusters* inativos de DNAr 18S em espécies de *P. cavatica*, *P. multispinis* e *P. sabaji*, bem como, presença de diversos sinais de DNAr 5S em espécies de *P. cavatica*, *P. sabaji* e *P. braueri* (SOUZA et al., 2009; PETY et al., 2018); em contraste, um único sinal DNAr 5S foi descrito em *P. oligospila* e *P. multispini* (PETY et al., 2018).

A partir de análises citogenéticas, é observado que espécies de *Hypancistrus* apresentam um conservado número diploide $2n=52$, com fórmula cariotípicas diferentes e ausência de cromossomos sexuais (DA SILVA et al., 2014; CARDOSO et al., 2016). A citogenética clássica realizada em *Hypancistrus* apresenta diferenças nos padrões de distribuição de Regiões Organizadoras de Nucléolo (NOR) e de regiões heterocromáticas nos cromossomos (DA SILVA et al., 2014). Dados sobre o mapeamento de sequências

repetitivas neste gênero se restringe a sequências repetitivas como os multigenes DNAr 18S e 5S e o elemento retrotransposon REX 3 (DA SILVA et al., 2014; CARDOSO et al., 2016).

Considerando a diversidade da família Loricariidae, o mapeamento de sequências repetitivas no genoma de suas espécies proporciona importantes informações sobre a organização e função dessas sequências, as possíveis interações desses genes relacionados a evolução deste grupo de peixes, bem como auxilia na melhor identificação de espécies e gêneros com a obtenção de marcadores, já que muitas de suas espécies são bastante desejadas para a pesca ornamental. Porém, trabalhos realizados sobre o mapeamento de DNAs repetitivos em Loricariidae ainda são bastante limitados (CENTOFANTE et al., 2006; MARIOTTO et al., 2011; CARDOSO et al., 2013; TRALDI et al., 2013a; 2013b; PANSONATO-ALVES et al., 2013; BLANCO et al., 2014; DA SILVA et al., 2014; BUENO et al., 2014; RUBERT et al., 2016; PETY et al., 2018, PRIMO et al., 2018; TRALDI et al., 2019b), e restritos a genes ribossomais DNAr 18S e 5S, destacando-se representantes dos gêneros *Hypostomus* (BUENO et al., 2014; PANSONATO-ALVES et al., 2013; TRALDI et al., 2013a; RUBERT et al., 2016), *Hypancistrus* (DA SILVA et al., 2014), *Harttia* (BLANCO et al., 2014; CENTOFANTE et al., 2006), *Ancistrus* (MARIOTTO et al., 2011) e *Peckoltia* (PETY et al., 2018). Outras classes de DNAs repetitivos mapeados anteriormente em Loricarideos inclui os retroelementos REX, analisados em representantes de gêneros como *Hypancistrus*, *Ancistrus*, *Hypostomus* e *Harttia* (DA SILVA et al., 2014; FAVARATO et al., 2017; TRALDI et al., 2019a); e o microssatélite (GATA)_n e Histona H3 em espécies de *Hypostomus* (PANSONATO-ALVES et al., 2013a; TRALDI et al., 2019a).

Apesar dos dados obtidos destes estudos terem proporcionado importantes informações sobre a organização genômica de Loricariidae, o uso de outras sequências como sondas para mapeamento físico permite não somente, inferir informações sobre a história evolutiva e a biodiversidade dos organismos estudados, como também obter dados importantes sobre as características dessas sequências, suas influências na evolução cariotípica de espécies, e associações com outras sequências repetitivas (CIOFFI et al., 2010; VALENTE et al., 2011; TRALDI et al., 2013b; UTSUNOMIA et al., 2014).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Analisar a organização genômica de DNAs repetitivos (DNAr 18S, Histona H1 e H3, ERV1, sRNA U2 e (GATA)n) em *Peckoltia vittata*, *Hypancistrus* sp. “pão”, *H. zebra* e *Hypostomus* sp., visando compreender a dinâmica cromossômica macro e microestrutural dessas espécies, bem como identificar a inter-relação entre estas sequências.

2.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar citogeneticamente as espécies *Hypostomus* sp., *Hypancistrus* sp. “pão”, *H. zebra* e *Peckoltia vittata*.
- Analisar a distribuição de hetercromatina constitutiva em *Hypostomus* sp., *Hypancistrus* sp. “pão”, *H. zebra* e *Peckoltia vittata*.
- Mapear a localização física das sequências ERV1, DNAr 18S, Histona H1 e H3, snRNA U2 e (GATA)n.
- Propor possíveis papéis funcionais de ERV1, DNAr 18S, Histona H1 e H3, snRNA U2, e (GATA)n no genoma de Loricariidae.
- Identificar, a partir do mapeamento de sequências repetitivas, rearranjos cromossômicos que contribuíram para evolução cromossômica em Loricariidae.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostragem

As amostras utilizadas neste estudo foram compostas de: 10 espécimes de *Hypostomus* sp. (3 machos, 5 fêmeas e 2 não identificados), provenientes do município de Abaetetuba, Pará, Brasil; 6 espécimes de *Hypancistrus* sp. “pão” (6 machos), provenientes do município de Altamira, Pará, Brasil; 8 espécimes de *P. vittata* (6 machos e 2 fêmeas) provenientes do município de Altamira, Pará, Brasil; e 6 espécimes de *H. zebra* (6 machos) provenientes do município de Altamira, Pará, Brasil. As amostras foram coletadas sob licença (SISBIO N° 21078) e o trabalho foi realizado de acordo com a aprovação da Comissão de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal do Pará (CEUA 68-2015).

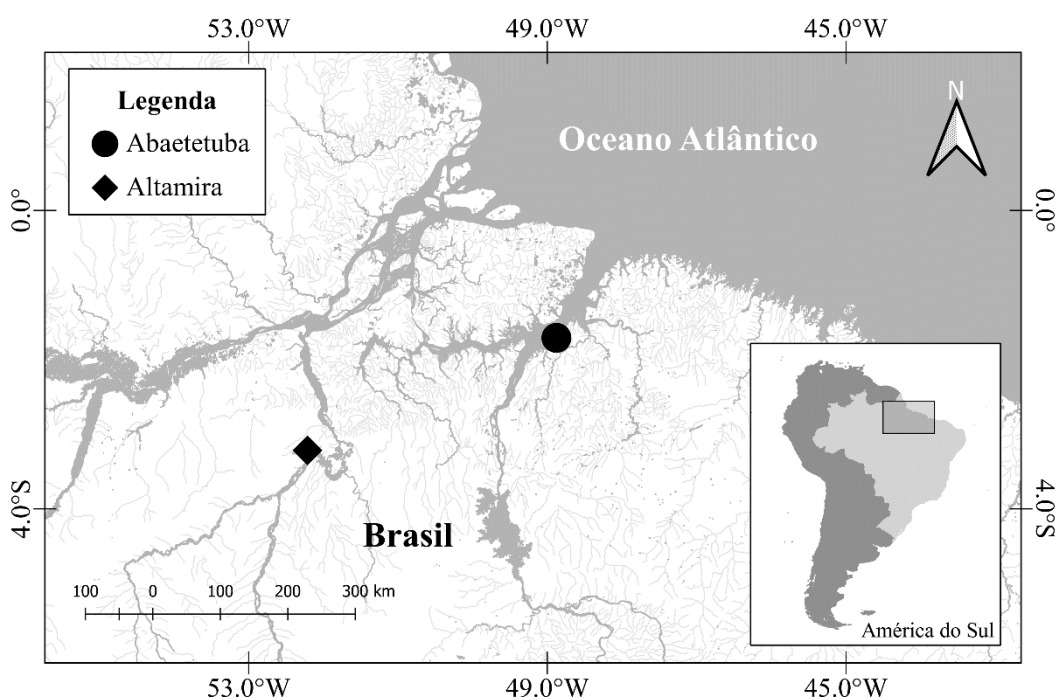


Figura 7: Mapa das localidades de coleta. Produzido por Luan Frade.

Tabela 1- Espécimes coletadas no Estado do Pará, Brasil.

Espécies	Localidade	Quantidade
<i>Hypostomus</i> sp.	Abaetetuba (PA)	3 machos, 5 fêmeas e 2 não identificados
<i>Hypancistrus</i> sp. "pão"	Altamira (PA)	6 machos
<i>Hypancistrus zebra</i>	Altamira (PA)	6 machos
<i>Peckoltia vittata</i>	Altamira (PA)	6 machos e 5 fêmeas

3.2. Obtenção de cromossomos metafásicos

O material cromossômico foi obtido de células do rim encefálico dos peixes, a partir da técnica de air-drying, segundo o protocolo de Bertollo et al. (1978) com algumas modificações, como segue: Injetar a solução de colchicina 0,025%, na proporção de 1mL/100g de peso do animal, na região dorso-lateral do animal com o auxílio de uma seringa de insulina; posteriormente manter o animal em aquário aerado por 45 minutos e em seguida eutanásia-lo para a retirada do rim encefálico. Após a extração, o rim deve ser colocado em solução hipotônica de KCl 0,075 M e, com o auxílio de pinça e tesoura, cortado em pedaços menores e dissociado com um macerador de vidro. Em seguida, o material deve ser levado a estufa a 37°C por 30 minutos. Ao sair da estufa, partes dos tecidos que não foram completamente dissociados devem ser retirados com auxílio de pinça. Deve-se acrescentar 1mL de fixador Carnoy (3 partes de Metanol e 1 parte de Ácido Acético), ressuspender o material em placa de petri e transferi-lo para tubos de centrifuga, com o auxílio de uma pipeta Pasteur. A suspensão celular transferida para os tubos deverá ser centrifugada a 1000 rpm, durante 10 minutos e o sobrenadante descartado, novamente deve-se adicionar fixador Carnoy (5-10 ml). O material deve ser ressuspensionado e armazenado em freezer a -20°C.

3.3. Preparação citológica das lâminas

Para a preparação citológica das lâminas, estas foram lavadas com sabão neutro, água destilada e álcool 70%, e secadas a temperatura ambiente. O material foi então ressuspensionado e, posteriormente, foi pingado 8 µL do mesmo sobre a lâmina contendo uma película de água quente, possibilitando um melhor espalhamento dos cromossomos metafásicos.

3.4. Classificação morfológica dos cromossomos

A morfologia cromossômica foi determinada de acordo com Levan et al. (1964). Para cálculo do número fundamental de braços, os cromossomos classificados como metacêntricos e submetacêntricos foram considerados de dois braços, enquanto os subtelocêntricos e acrocêntricos considerados de um braço.

3.5. Citogenética molecular

3.5.1. Isolamento de sequências

O DNA genômico de indivíduos adultos de *Peckoltia vittata*, *Hypancistrus* sp. “pão”, *Hypancistrus zebra* e *Hypostomus* sp. foram extraídos através do GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep kit (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA). Sequências utilizadas na produção de sondas para análise de FISH foram amplificadas por PCR com o seguinte conjunto de primers: H3 (ScaH3F 5' - GGC NMG NAC NAA RCA RAC e ScaH3R 5' - TGD ATR TCY TTN GGC ATD AT) e H1 (ScaH1F 5' - GCN ATH AAR AAR TAY AT e ScaH1R 5' - GGY TTN GGN GCY TTN GG) desenhados por Cabral-de-Mello et al. (2010); ERV1 (F- AAG AAG CAG ACC GAA ACC AA e R- GGG AGA CTT GGC GAC TTT C) baseados a partir de sequências de Parodontidae do estudo de Traldi et al (2019a); DNAr 18S (18SF 5'- TCT AAG TAC RCR CGG CCG GTA e 18SR 5'- CAA GAA CGA AAG TCG GAG GTT) desenhados por Gross et al. (2010); GATA (GATA)₇ e (TATC)₇ desenhados por Blanco et al. (2014); e snRNA U2 (5'-TCT CGG CCT (AT) (AT) T GGC TAA-3' e 5'-G(AC)G GTA (GC) TG CAA TAC CGG-3') desenhado por Colgan et al. (1998). As misturas das reações feitas continham 100 ng/μl de DNA genômico, 2,5 μl de Buffer 10x, 1,25 μl MgCl₂, 2,5 μl de DNTP mix (2mM), 1 μl de cada Primer (10mM), 0,3 μl de Taq polimerase (Invitrogen) e 16,5 μl de água pura. A PCR das sequências foram realizadas de tal forma: um ciclo de 95°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 56°C – 60°C por 50 segundos, 72°C por 2 minutos, um ciclo de 72°C por 10 minutos e depois um hold a 4°C.

Tabela 2- Sequência de iniciadores utilizados para a produção de sondas de DNA no presente trabalho

Primer	Sequência	Temp. anel	Referência
H3	ScaH3F 5' - GGC NMG NAC NAA RCA RAC ScaH3R 5' - TGD ATR TCY TTN GGC ATD AT	58°C	Cabral-de-Mello et al. (2010)
H1	ScaH1F 5' - GCN ATH AAR AAR TAY AT ScaH1R 5' - GGY TTN GGN GCY TTN GG	58°C	Cabral-de-Mello et al. (2010)
DNAr 18S	18SF 5' - TCT AAG TAC RCR CGG CCG GTA 18SR 5' - CAA GAA CGA AAG TCG GAG GTT	56°C	Gross et al. (2010)
ERV1	F- AAG AAG CAG ACC GAA ACC AA R- GGG AGA CTT GGC GAC TTT C	56°C	
(GATA) _n	(GATA) ₇ e (TATC) ₇	60°C	Blanco et al. (2014)
snRNA U2	5'-TCT CGG CCT (AT) (AT) T GGC TAA-3' 5'-G(AC)G GTA (GC) TG CAA TAC CGG-3'	57°C	Colgan et al. (1998)

3.5.2. Nick-translation

As sondas foram marcadas por *nick-translation* com biotina-14-dATP ou digoxigenina-11-dUTP (Kit Dig-Nick, Roche, EUA). Em um tubo de volume 0,25 mL foram adicionados 1 µL de DNA (concentração de 1000ng/µL), 5 µL de DNTP mix, 5 µL de mix da enzima, e 15 µL de água. A reação correu por 90 minutos (a 15°C ou 16°C, dependendo do kit utilizado). Após isso, a solução foi submetida a uma temperatura de 65°C por 10 minutos, e foi adicionado 1 µL de stop buffer para parar a reação.

3.5.3. Preparação das lâminas

A hibridização *in situ* fluorescente foi realizada seguindo o protocolo de Pinkel et al. (1996) com alterações como segue: As lâminas foram colocadas em solução de PBS (36 ml de água + 4 ml de PBSx10) por 5 minutos, depois submetidas a solução de pepsina (50 ml de HCl 4,8 N + 500 µL de pepsina) por 15 minutos em estufa a 37°C. As lâminas foram retiradas da pepsina e colocadas na solução PBS novamente por 4 minutos, a fim de interromper a ação da pepsina. Após isso, os cromossomos foram desidratados na

bateria de álcool (duas vezes em álcool 70% por 2 minutos em cada, duas vezes em álcool 90% por 2 minutos em cada e uma vez em álcool 100% por 4 minutos). Em seguida as lâminas foram colocadas na estufa 65°C por 1 hora.

3.5.4. Hibridização

Para a desnaturação cromossômica, as lâminas foram mergulhadas em uma solução de formamida 70%, a 62°C por 15 segundos. Após a desnaturação, o material foi colocado no álcool 70% gelado por 4 minutos, e subsequentemente passou pela bateria de álcool novamente. Após isso, foi colocado sobre a lâmina tratada, 10µL de solução de hibridização contendo a sonda previamente desnaturada (70°C por 15min). Em seguida as lâminas foram cobertas com lamínulas de vidro, seladas e colocadas em câmara úmida para hibridizar durante 24 horas na estufa 37°C.

3.5.5. Lavagem de estringência e detecção das sondas

Após a retirada das lamínulas as lâminas foram submetidas a formamida 50% por 1 minuto e meio, em 2xSSC e 4xTween (200mL de 4xSSC + 100µL de Tween) por 2 minutos, a 42°C. Em seguida, foi depositado 200 µL de solução de detecção: 0,2µL de avidina-Cy3 para 100µL de 4xTween para sondas marcadas com biotina e 0,4µL de antidigoxigenina-FITC para 100µL de 4xTween para marcações com digoxigenina, em seguida, as laminas foram cobertas com parafilme e deixadas para incubar em câmara úmida a 37°C por 30 minutos.

Para retirar o excesso de fluorocromo as lâminas foram lavadas em tubos de 4xTween em temperatura ambiente 3 vezes por 3 minutos cada. Os cromossomos foram contra corados, adicionando 8µl de DAPI com Anti-fading Vectashield sobre as lâminas, que foram cobertas com lamínula de vidro e levadas ao microscópio de epifluorescência para visualização.

3.6. Captura e tratamento das imagens

As imagens dos cariótipos submetidos a FISH foram capturadas através do Software Zen 2, no microscópio de epifluorescência Zeiss Axio Imager. D2, acoplado a um sistema de captura de imagem Zeiss axiocam 503 mono. A edição das imagens (ajuste de brilho e contraste, montagem do cariótipo etc.) foi feita com o auxílio do programa Adobe Photoshop CS5.

4. RESULTADOS

Mapeamento cromossômico de cinco classes de DNAs repetitivos em espécies de Hypostominae (Siluriformes, Loricariidae) da Amazônia Brasileira

Carlos Eduardo Vasconcelos dos Santos¹; Bruno Rafael Ribeiro de Almeida²; Luan Felipe da Silva Frade¹; Cleusa Yoshiko Nagamachi^{1, 5}; Marcelo Ricardo Vicari^{3, 5}; Leandro Melo de Souza⁴; Julio Cesar Pieczarka^{1, 5}; Renata Coelho Rodrigues Noronha¹

*

¹Centro de Estudos Avançados da Biodiversidade, Universidade Federal do Pará, Campus Guamá, Rua Augusto Corrêa, nº 01. Guamá, Belém – Pará, Brasil.

²Instituto Federal de Ciência e Tecnologia do Pará, R. Universitário, s/n - Maria Magdalena, Itaituba-Pará, Brasil, CEP 68183-300

³Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

⁴Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Campus de Altamira, Altamira, PA, Brasil

⁵Pesquisador CNPq

*Corresponding Author:

Renata Coelho Rodrigues Noronha

E-mail: renatarcrn@gmail.com Centro de Estudos Avançados da Biodiversidade, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Campus do Guamá, Rua Augusto Corrêa, nº 01. Guamá, 66075-900 Belém – Pará, Brasil

RESUMO

Loricariidae (Siluriformes) compreende cerca de 1020 espécies de peixes neotropicais, sendo considerada a mais diversa entre os Siluriformes. Estudos a respeito do DNA repetitivo têm fornecido dados importantes sobre evolução dos genomas de membros desta família, especialmente da subfamília Hypostomina. No presente estudo foi realizado o mapeamento cromossômico por FISH de seis diferentes sequências repetitivas (DNAr 18S, Histonas H1 e H3, snRNA U2, ERV1 e microssatélite GATA) em quatro espécies pertencentes a subfamília Hypostominae, afim de comparar o padrão de organização dessas sequências em espécies de gêneros diferentes. *Hypostomus* sp. ($2n=64$, $10m + 28sm + 14st + 12a$), *Hypancistrus* sp. “pão” ($2n=52$, $22m + 18sm + 12st$), *H. zebra* ($2n=52$, $16m + 20sm + 16st$), *Peckoltia vittata* ($2n=52$, $18m + 16sm + 18st$). Observou-se presença de sinais dispersos de ERV1, GATA e Histona H3 e H1 no cariótipo das quatro espécies, exceto em *P. vittata* que apresentou um *cluster* de Histona H1 na região heterocromática intersticial do par 18. Somente *Hypancistrus* sp. “pão”, apresentou 5 *clusters* de sinais DNAr 18S; as demais espécies apresentaram sítios DNAr 18S em um par cromossômico, característica esta conservada em Loricariidae. A colocação de sítios DNAr 18S-ERV1 foi observada em todas as espécies evidenciando forte interação entre esta família multigênica e elementos transponíveis (TEs); o mapeamento de snRNA U2 em *H. zebra* mostrou *clusters* terminais nos pares 1,10 e 19; essas marcações em múltiplos pares cromossômicos também foram relatadas em outros grupos de peixes e atribuídas a ação de eventos de transposição. Os dados obtidos indicam que rearranjos cromossômicos e interferência de TEs são alguns dos principais fatores que atuam na evolução cariotípica dessas espécies.

Palavras-chave: DNAs repetitivos, elementos transponíveis, ERV1, famílias multigênicas, DNAr 18S, Histonas, snRNA U2, Loricariidae, peixes neotropicais.

INTRODUÇÃO

Loricariidae é uma família de peixes neotropicais que apresenta elevada diversidade, possuindo 1020 espécies válidas (ISBRUCKER, 1980; BURGESS, 1989; REIS et al., 2003; ARMBRUSTER, 2004; NELSON et al., 2016; REIS et al., 2016; ROXO et al., 2019; FRICKE, 2019; ESCHMEYER; FONG, 2021). Loricariidae apresenta uma filogenia bastante complexa, constantemente reformulada, e atualmente, é organizada em seis subfamílias, sendo Hypostominae, a mais estudada e onde se concentra uma maior diversidade em espécies e gêneros (MARTINEZ et al., 2011).

Nesta família, diferentes tendências evolutivas do número diploide têm sido observadas. O gênero *Hypostomus*, apresenta 128 espécies válidas (CARVALHO et al., ZAWADZKI et al., 2010; MARTINS et al., 2012), com grande variação no número diploide, de $2n=52$ para *Hypostomus emarginatus* (ARTONI E BERTOLLO, 2001) a $2n=84$ para *Hypostomus sp.* (CEREALI et al., 2008). Em contrapartida, *Hypancistrus* reúne 8 espécies válidas (TAN, M. & ARMBRUSTER, 2016), e apresenta $2n=52$, indicando um cariótipo bastante conservado neste gênero, com fórmulas cariotípicas diferentes e ausência de cromossomos sexuais (DA SILVA et al., 2014; CARDOSO et al., 2016). Semelhantemente, o gênero *Peckoltia*, é constituído por 18 espécies válidas, com um número diploide $2n=52$, também apresentando um cariótipo bastante conservado (SOUZA et al., 2009; PETY et al., 2018). De acordo com ARTONI E BERTOLLO (2001) a evolução cariotípica a partir de fissões/fusões cêntricas é um fator comum em Loricariidae, sendo observado em Hypostominae, especialmente no gênero *Hypostomus*. Eventos de inversões pericentricas e fusões Robertsonianas também são consideradas como os principais fatores para a evolução cromossômica em grupos como Ancistrini, o qual pertencem *Hypancistrus* e *Peckoltia* (ALVES, 2000; MARIOTTO et al., 2011; FAVARATO et al., 2016).

As sequências de DNA repetitivos constituem grande parte do genoma dos seres vivos eucariotos, estando organizadas em repetições *in tandem* como os DNAs satélites, minissatélites, microssatélites e famílias multigênicas, ou dispersas ao longo do genoma como os elementos transponíveis (CHARLESWORTH et al., 1994). Devido a sua natureza repetitiva, e inerente dinamismo, o mapeamento dessas sequências permite observar a sua organização e distribuição no genoma, contribuindo para a detecção de rearranjos cromossômicos e outros processos evolutivos no organismo (CIOFFI E BERTOLLO, 2012).

O mapeamento de sequências repetitivas em loricariidae ainda é bastante limitado; o uso de sondas de genes ribossômicos comparado a outros DNAs repetitivos foram os mais estudados em espécies desta família, em que observado a presença de um ou mais pares cromossômicos apresentando sinais de DNAr 18S no cariótipo (PANSONATO-ALVES et al., 2013b; SILVA et al., 2014; PETY et al., 2018). Quanto a localização cromossômica de outras famílias multigênicas como Histonas, Pansonato-Alves (2013b) mapeou o gene Histona H3 em três espécies de *Hypostomus* e observou a presença de *clusters* em certos pares cromossômicos. O elemento (GATA)_n foi anteriormente mapeado em quatro espécies de *Hypostomus* por Traldi et al. (2013b) e foi observado a dispersão deste repetitivo no cariótipo. O mapeamento de snRNA U2 ainda não foi realizado em representantes de Loricariidae, sendo limitado a espécies de *Characidium* e *Gymnotus* até o presente estudo. E quanto ao retroelemento ERV1, o mapeamento cromossômico dessa sequência de DNA não foi realizado em peixes.

O objetivo deste estudo é realizar o mapeamento físico de sequências repetitivas ERV 1, Histona H1 e H3, snRNA U2, GATA e DNAr 18S em quatro espécies de loricarídeos *Hypancistrus zebra*, *Hypancistrus sp.*, *Hypostomus sp.* e *Peckoltia vitatta*, a fim de observar o padrão de organização cromossômica dessas sequências, e comparar os resultados obtidos com outros integrantes desta família, para compreender a dinâmica dessas sequências no genoma de espécies pertencentes a subfamília Hypostominae.

MATERIAIS E METODOS

2.1. Análise cariotípica

As amostras utilizadas neste estudo foram compostas de: 6 espécimes de *Hypancistrus zebra* (6 machos), provenientes do município de Altamira, Pará, Brasil; 6 espécimes de *Hypancistrus sp.* ‘pão’ (6 machos) provenientes do município de Altamira, Pará, Brasil; 10 espécimes de *Hypostomus sp.* (3 machos 5 fêmeas e 2 juvenis) provenientes do município de Abaetetuba, Pará, Brasil; e 4 espécimes de *Peckoltia cavatica* (3 machos e 1 fêmea) provenientes do município de Portel, Pará, Brasil. As amostras foram coletadas sob licença (SISBIO Nº 21078); o trabalho foi realizado de acordo com a aprovação da Comissão de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal do Pará (CEUA 68-2015). O material cromossômico foi obtido de células do rim encefálico dos peixes, segundo o protocolo de Bertollo et al. (1978). A morfologia cromossômica foi determinada de acordo com Levan et al. (1964). Bandeamento C foi realizado de acordo com o protocolo de Sumner (1972).

2.2. PCR

Para realização de PCRs, reações foram constituídas de 100 ng/μl de DNA genômico, 2,5 μl da Buffer 10x, 1,25 μl MgCl₂, 2,5 μl de DNTP mix (2mM), 1 μl de cada Primer (10mM), 0,3 μl de *Taq* polimerase (Invitrogen) e 16,5 μl de água pura. Os genes para a produção de sondas foram amplificadas por PCR com o seguinte conjunto de primers: H3 (ScaH3F 5' - GGC NMG NAC NAA RCA RAC e ScaH3R 5' - TGD ATR TCY TTN GGC ATD AT) e H1 (ScaH1F 5' - GCN ATH AAR AAR TAY AT e ScaH1R 5' - GGY TTN GGN GCY TTN GG) desenhados por Cabral-de-Mello et al. (2010); ERV1 (F- AAG AAG CAG ACC GAA ACC AA e R- GGG AGA CTT GGC GAC TTT C) baseados a partir de sequências de Parodontidae do estudo de Traldi et al (2019a); DNAr 18S (18SF 5' - TCT AAG TAC RCR CGG CCG GTA e 18SR 5' - CAA GAA CGA AAG TCG GAG GTT) desenhados por Gross et al. (2010); GATA (GATA)₇ e (TATC)₇ desenhados por Blanco et al. (2014); e snRNA U2 (5'-TCT CGG CCT (AT) (AT)T GGC TAA-3' e 5'-G(AC)G GTA (GC) TG CAA TAC CGG-3') desenhado por Colgan et al. (1998). As configurações termais das PCRs foram realizadas de tal forma: um ciclo de 95°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 56°C – 60°C por 50 segundos, 72°C por 2 minutos, um ciclo de 72°C por 10 minutos e depois um hold a 4°C.

2.3. Sondas

As sondas foram marcadas por *nick-translation* com biotina-14-dATP ou digoxigenina- 11-dUTP (Kit Dig-Nick, Roche, EUA). Em um tubo de volume 0,25 μL foram adicionados 1 μL de DNA (concentração de 1000ng/μL), 4 μL de mix de reação e 15 μL de água. A reação correu a 15°C por 90 minutos. Após isso, a solução foi submetida a uma temperatura de 65°C por 10 minutos, e foi adicionado 1 μL de stop buffer para parar a reação.

2.4. Hibridização *in situ* fluorescente

A hibridização *in situ* fluorescente foi realizada seguindo o protocolo de Pinkel et al. (1996) com as seguintes alterações: cromossomos foram tratados com solução de Pepsina, PBS e desidratados em bateria de álcool (70%, 90% e 100%). Para a desnaturação cromossômica, as lâminas foram mergulhadas em solução de formamida 70% a 65 °C e as sondas foram desnaturadas no termociclador a 70°C por 15 minutos. As lâminas foram mantidas a 37°C, *overnight*, para a hibridização. Posteriormente, lâminas

foram lavadas com formamida 50%, 2xSSC e 4xSSC-Tween para remoção de hibridizações inespecíficas. Sondas de ERV1, snRNA U2, (GATA)_n, Histona H1 e H3 foram detectadas com Avidina-CY3 e sondas de DNAr 18S foram detectadas com Anti-digoxigenina-FITC.

RESULTADOS

Foi feita análise citogenética e mapeamento de sequências de DNAs repetitivos (ERV1, DNAr 18S, histona H3 e microssatélite (GATAn) no cariótipo de quatro espécies de Loricariidae, pertencentes a subfamília Hypostominae. *Hypostomus* sp. apresentou 2n=64, NF=80 e fórmula cariotípica de 10m + 28sm 14st + 12a (figura 1a); *Hypancistrus* sp. “pão” apresentou 2n=52, NF =94 e fórmula cariotípica de 22m + 18sm + 12st (figura 1b); *Hypancistrus zebra* apresentou 2n=52, NF = 102 e fórmula cariotípica de 16m + 20sm + 16st (figura 1c) e *Peckoltia vittata* mostrou 2n=52, NF =102 e fórmula cariotípica 18m + 16sm + 18st (figura 1d). Não foram observados a presença de cromossomos sexuais nestas espécies.

O bandeamento C possibilitou observar os seguintes padrões: *Hypostomus* sp. apresentou blocos conspícuos de heterocromatina constitutiva (HC) nas regiões dos braços longos no par 17 e em mais três cromossomos submetacêntricos distintos (pares 9, 13 e 15) (figura 1a). *Hypancistrus* sp. “pão” apresentou bandas C na região dos braços longos nos pares 3 e 18, e um sinal na região intersticial do braço longo de dois cromossomos distintos pertencentes aos pares 2 e 12 (figura 1b). *Hypancistrus zebra* apresentou HC na região dos braços longos de cromossomos submetacêntricos (pares 10 e 12) (figura 1c). Em *Peckoltia vittata* a presença de heterocromatina foi observada em dois pares submetacêntricos, um apresentando sinais de HC nos braços curtos (par 13) e o outro par nos braços longos (par 14) (figura 1d).

FISH de sequências DNAr 18S nas espécies estudadas mostrou que esses genes apresentaram *clusters* em pelo menos um par de cromossomos com certo grau de variação entre elas. O DNAr 18S foi registrado em um único par cromossômico em *Hypostomus* sp. (par 22, região terminal do braço curto), *P. vittata* (par 9, região terminal do braço longo) e *Hypancistrus zebra* (par 17, região terminal do braço curto) (figura 2a, c, d). Quanto a *Hypancistrus* sp. ‘pão’ foi observado a presença de sinais DNAr 18S na região terminal do braço longo do par 22, na região terminal dos braços longos de dois cromossomos submetacêntricos de pares distintos (par 9 e par 20), e no braço curto de um cromossomo do par 17 (figura 2b).

Quanto ao mapeamento do retrotransposon ERV1, foi observado que esta sequência apresenta um padrão disperso no cariótipo das espécies estudadas. Entretanto, foram encontradas regiões de acumulações dessas sequências na porção terminal do braço curto do par 22 em *Hypostomus* sp. (figura 2a). Em *Hypancistrus* sp. “pão” foi observado *clusters* ERVs no par 22 e na região terminal do braço longo de três cromossomos distintos pertencentes aos pares 9, 17 e 20 (figura 2b). *Peckoltia vittata* e *H. zebra* não apresentaram regiões específicas nos cromossomos com acúmulo de ERVs, sendo observado pequenos sinais distribuídos ao longo dos cromossomos (figura 2c,d). Foi também observada a existência de colocalização dessas sequências com sinais DNAr 18S (figura 2).

O mapeamento de histona H3 apresentou um padrão de distribuição disperso no cariótipo, com variado grau de acumulação ao longo dos cromossomos de cada espécie. *Hypostomus* sp. apresentou sinais de H3 dispersos no cariótipo, com pequenos *clusters* na região pericentromérica em apenas um homólogo dos pares 1, 2, 3, 4, 5, 6 (figura 3a). *Hypancistrus* sp. “pão” apresentou sinais de Histona H3 dispersos sem a presença de *clusters* em regiões específicas dos cromossomos (figura 3b). *Peckoltia vittata* também apresentou marcações dispersas, porém, com acúmulo de H3 na região dos braços longos em apenas um homólogo dos pares 10, 12, 15 e 20, e na região pericentromérica de um homólogo do par 18 (figura 3c). *Hypancistrus zebra* também apresentou certas acumulações de sinais de Histona H3 nos centrômeros de um homólogo dos pares 9, 13, 19 e 20, porém eles não são tão perceptíveis quanto os observados em *Hypostomus* sp. (figura 3d).

O mapeamento de Histona H1 apresentou sinais dispersos no cariótipo de *Hypancistrus* sp. “pão”, *Hypancistrus zebra* e *Hypostomus* sp. (figura 4a, b, d). *Peckoltia vittata*, em contrapartida, apresentou *clusters* de Histona H1 na heterocromatina intersticial no braço longo do par 18 (figura 4c).

Os resultados obtidos a partir do mapeamento de (GATA)_n mostraram que este microsatélite se encontra disperso no cariótipo das quatro espécies analisadas, com certa compartimentalização em regiões pericentroméricas ou terminais dos cromossomos. *Hypostomus* sp. apresentou o maior número de *clusters* dessa sequência localizados na região pericentromérica de apenas um homólogo dos pares 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7, e um sinal adicional encontrado na região terminal do braço curto do par 20 (figura 5a). Em *Hypancistrus* sp. “pão”, sinais dispersos de (GATA)_n foram visualizados no cariótipo (figura 5b). *Peckoltia vittata*, apresentou sinais dispersos de (GATA)_n com *clusters*

adicionais encontrados nas regiões terminais e pericentroméricas de apenas um homólogo dos pares 1, 2, 3, 4, 5 e 6 (figura 5c). *Hypancistrus zebra* apresentou sinais dispersos de (GATA)_n ao longo dos cromossomos (figura 5d).

O mapeamento de snRNA U2 em *Hypancistrus zebra* mostrou *clusters* na região terminal em três pares cromossômicos localizados nas regiões terminais do par 1 (metacêntrico), no braço curto do par 10 (submetacêntrico) e no braço longo do par 19 (subtelocêntrico) (figura 6).

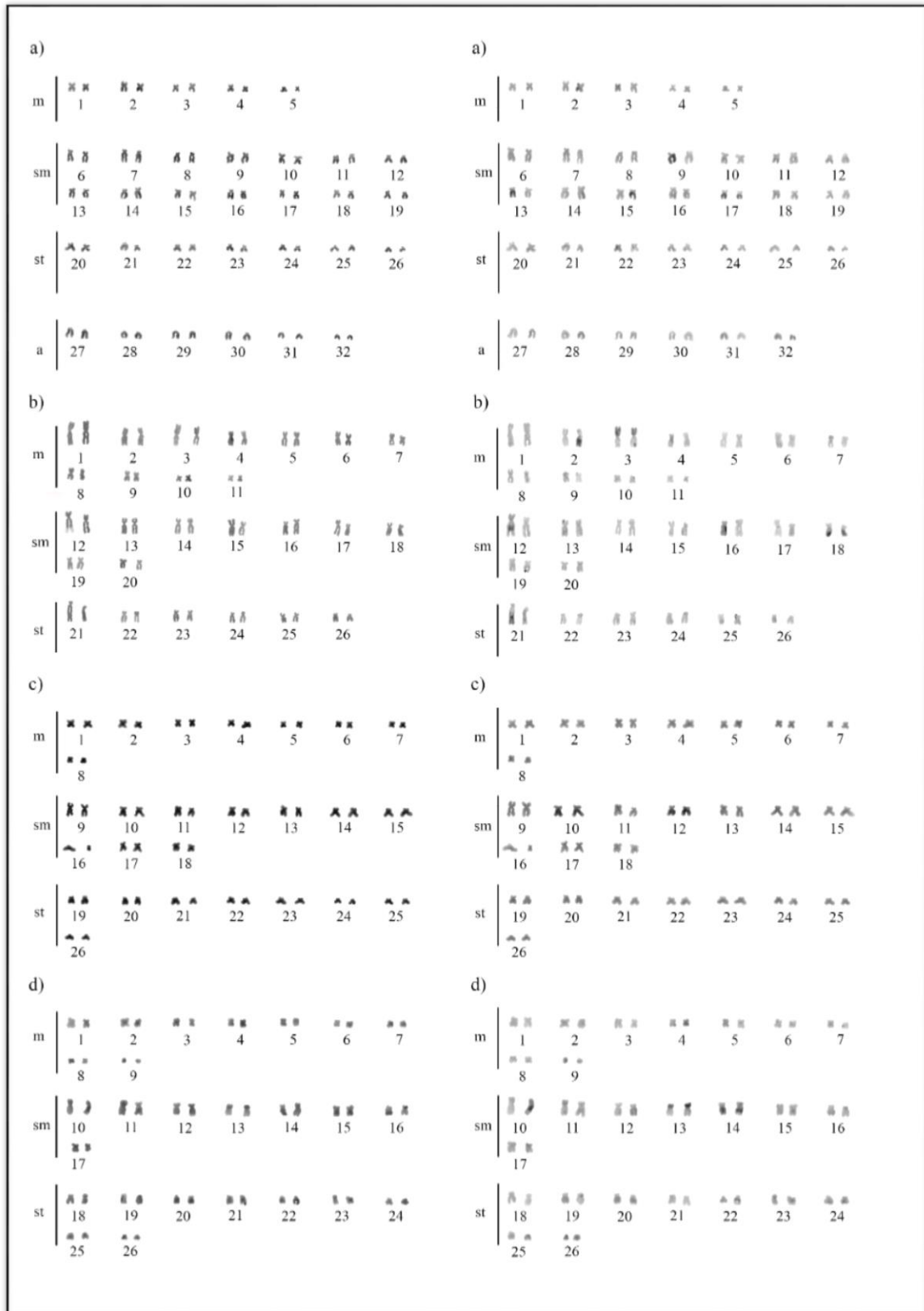


Figura 1: Cariótipo (coloração convencional e Banda C) de a) *Hypostomus* sp., b) *Hypancistrus* sp. "pão", c) *Hypancistrus zebra* e d) *Peckoltia vittata*.

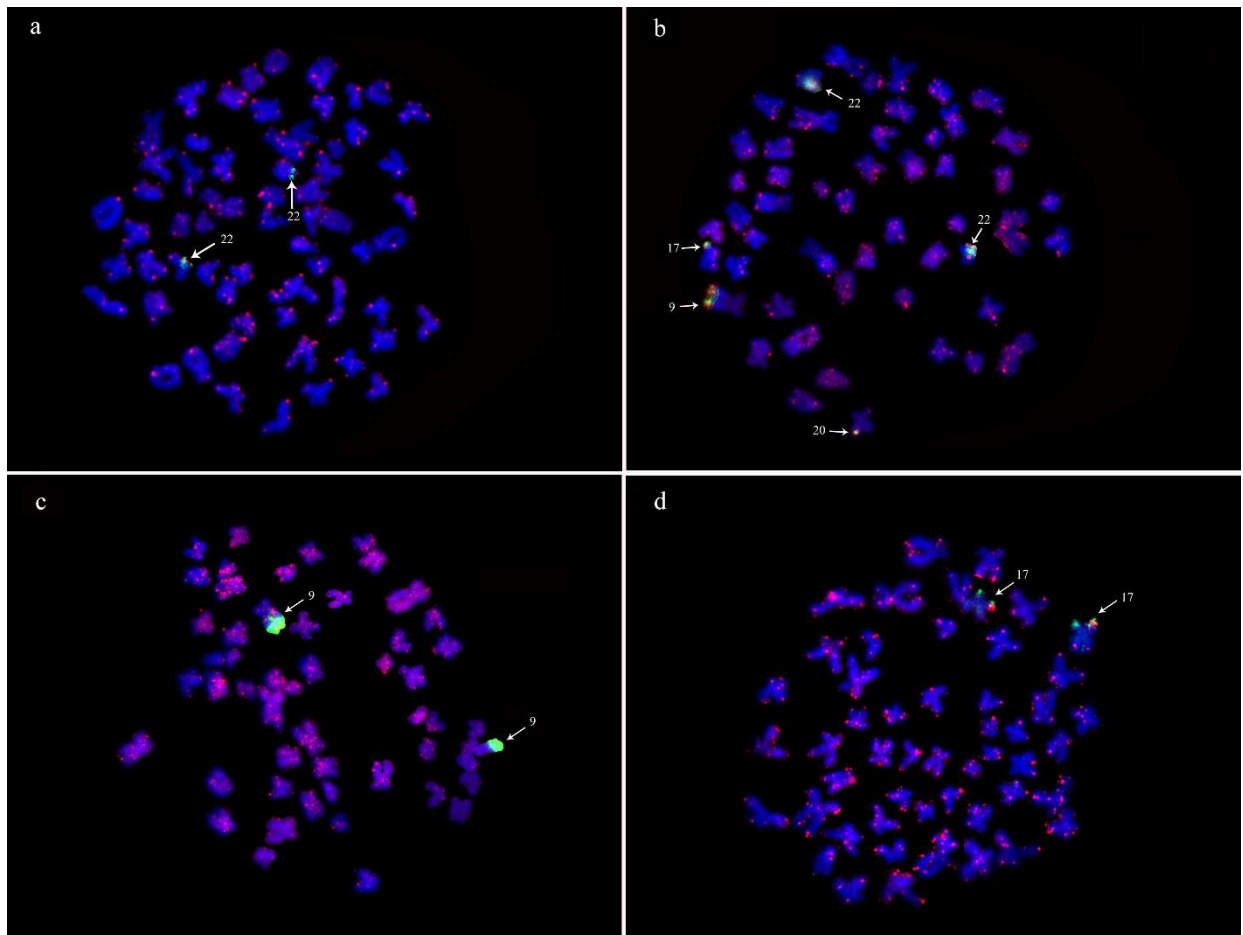


Figura 2: FISH com sondas de DNAr 18S (verde) e ERV1 (vermelho) em a) *Hypostomus* sp., b) *Hypancistrus* sp. “pão”, c) *P. vittata* e d) *H. zebra*. Setas representam sinais de DNAr 18S colocalizado ao ERV1.

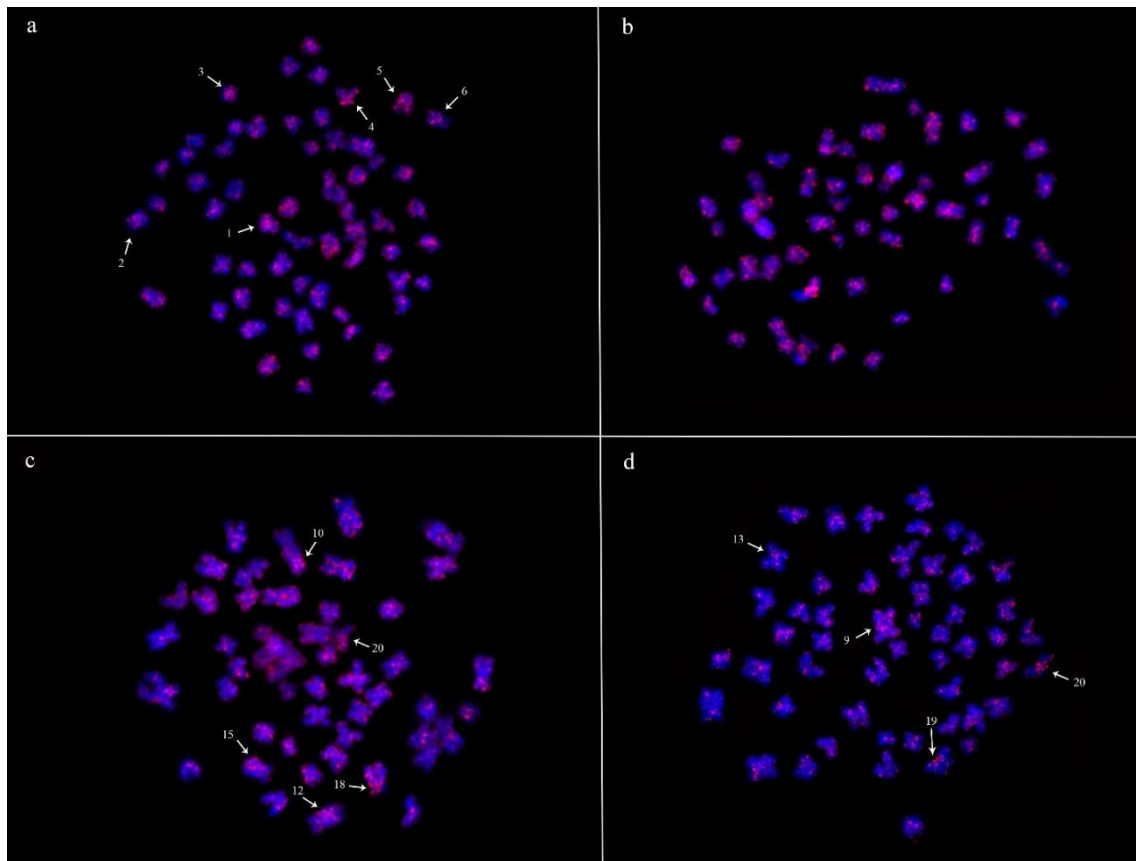


Figura 3: FISH com sondas de histona H3 em a) *Hypostomus* sp. (cariótipo incompleto), b) *Hypancistrus* sp. “pão”, c) *P. vittata* e d) *H. zebra*. Setas representam sinais de acúmulo de DNA repetitivo

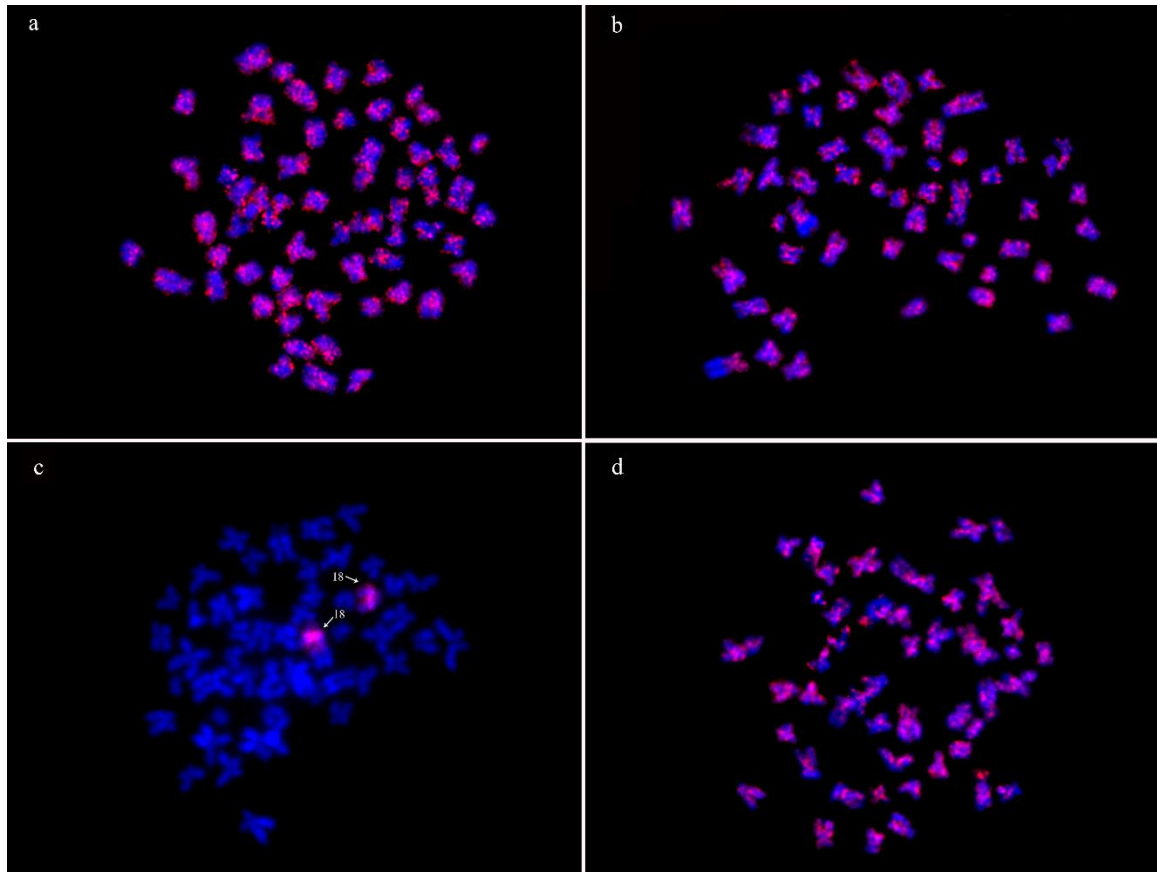


Figura 4: FISH com sondas de histona H1 em a) *Hypostomus* sp. (cariótipo completo), b) *Hypancistrus* sp. “pão”, c) *P. vittata* e d) *H. zebra*. Setas representam sinais de acúmulo de DNA repetitivo

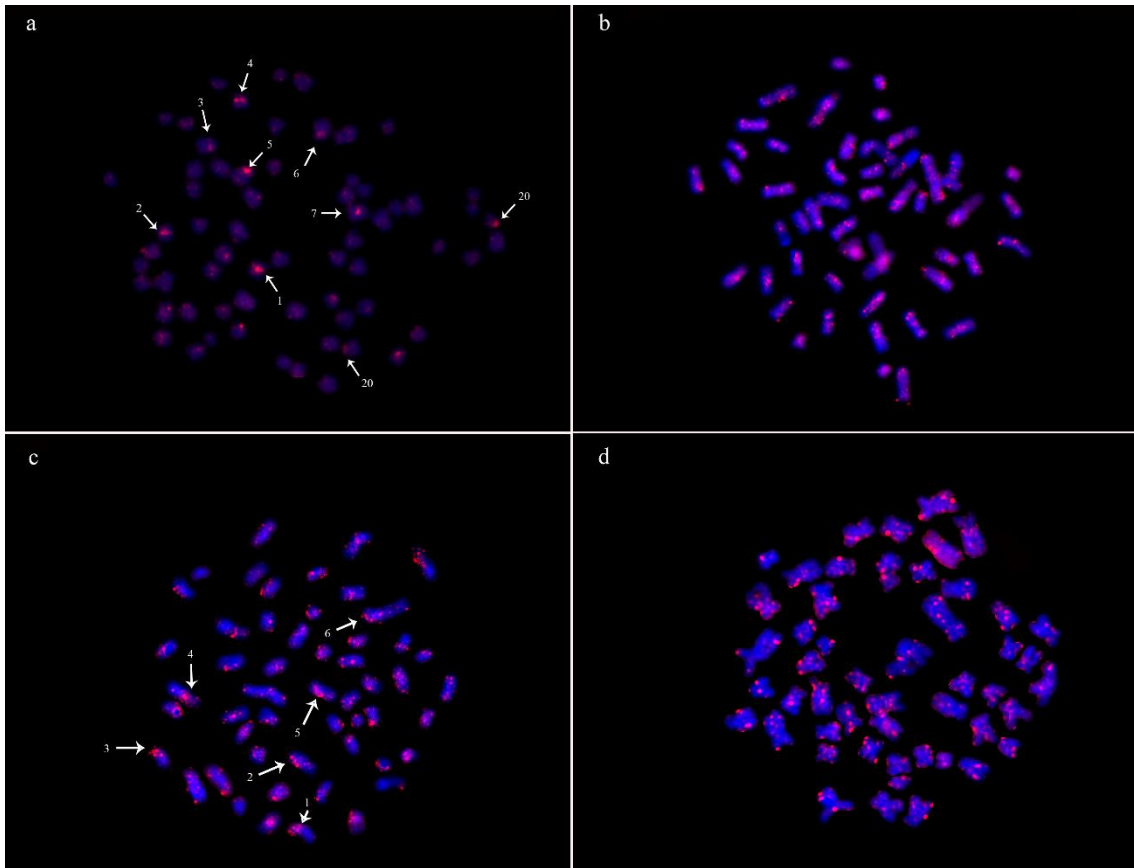


Figura 5: FISH de sondas de (GATA)n em a) *Hypostomus* sp., b) *Hypancistrus* sp. "pão", c) *P. vittata* e d) *H. zebra*. Setas representam sinais de acúmulo de DNA repetitivo

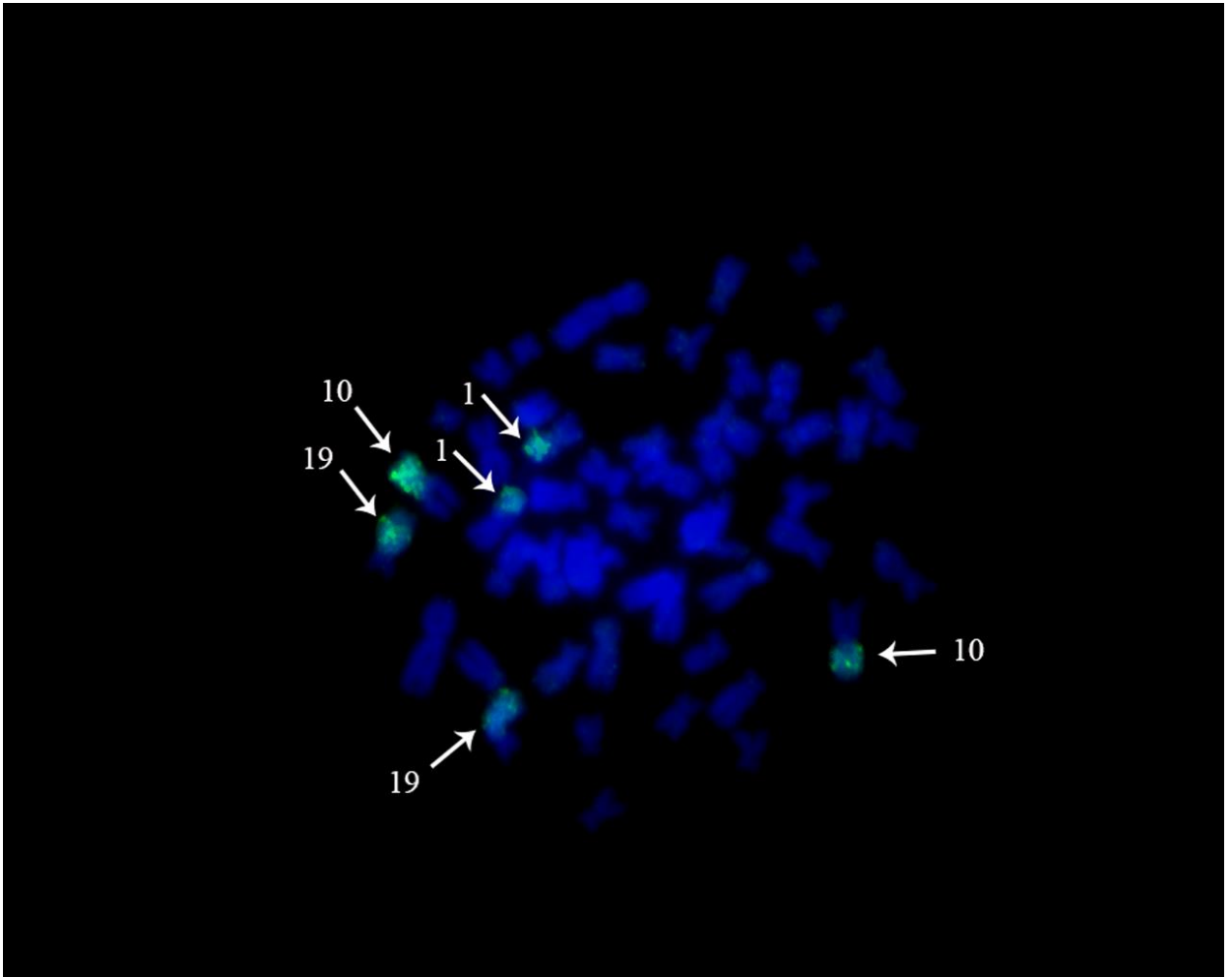


Figura 6: FISH com sonda de snRNA U2 em *Hypancistrus zebra*. Setas representam sinais do DNA repetitivo.

DISCUSSÃO

Hypancistrus zebra, *Hypancistrus* sp. “pão” e *Peckoltia vittata* compartilham o mesmo número diploide $2n=52$, uma característica conservada para os peixes pertencentes a tribo Ancistrini (ALVES et al., 2003; CARDOSO et al., 2013; DA SILVA et al., 2014). Apesar disso as três espécies apresentam fórmulas cariotípicas diferentes, indicando que embora possuam uma macroestrutura cariotípica conservada, pequenas alterações na sua morfologia cromossômica estão presentes e provenientes de rearranjos cromossômicos como inversões (ALVES et al., 2003; CARDOSO et al., 2013; DA SILVA et al., 2014). *Hypostomus* sp., no entanto apresentou um número diploide $2n=64$, uma característica cromossômica mais diversificada entre os Loricarideos (ARTONI & BERTOLLO, 2001; BUENO et al., 2012).

O mapeamento de genes ribossomais foi anteriormente realizado em diversas espécies de loricarideos pertencentes a gêneros como *Hypostomus*, *Hypancistrus*, *Ancistrus*, *Scobinancistrus*, *Harttia* e *Peckoltia*, nos quais foi observado a presença de um ou múltiplos pares marcados, ou pequenos sinais dispersos (CENTOFANTE et al., 2006; MARIOTTO et al., 2011; CARDOSO et al., 2013; TRALDI et al., 2013; PANSONATO-ALVES et al., 2013; BLANCO et al., 2014; DA SILVA et al., 2014; RUBERT et al., 2016; CARDOSO et al., 2016; PETY et al., 2018; BUENO et al., 2018). No presente trabalho foi registrada a presença de um único par apresentando DNAr 18S no cariótipo de *Hypancistrus zebra*, *Peckoltia vittata* e *Hypostomus* sp, enquanto, *Hypancistrus* sp “pão” mostrou dois pares cromossômicos portadores de DNAr 18S e um sinal adicional observado em um cromossomo distinto. Em relação a *Hypancistrus zebra* e *P. vittata*, nossos achados assemelham-se com o padrão de distribuição deste gene ribossomal descrito anteriormente (SILVA et al., 2014; PETY et al., 2018). Presença de apenas um par cromossômico com sinais de DNAr 18S também é comum a outras espécies do gênero *Hypostomus* sp. semelhante aos resultados observados neste trabalho (BUENO et al., 2014). O mapeamento de DNAr 18S em *Hypancistrus* sp “pão” no presente estudo se assemelha aos resultados já observados por Cardoso et al. (2016), que registraram *clusters* de DNAr 18S na região terminal do par cromossômico 2 e um sinal adicional no cromossomo heteromórfico do par 21; variabilidade de sítios ribossomais semelhante foi observado em *Hypancistrus cf. debilittera* (SILVA et al., 2014). É possível que eventos de transposição tenham ocasionado a presença desses sinais adicionais de DNAr 18S observados em *Hypancistrus* sp. “pão”, com posterior ocorrência de *crossing over* desigual, gerando sítios heteromórficos. PETY et al. (2018) observaram a presença de

múltiplos *clusters* de genes ribossomais no cariótipo de espécies de *Peckoltia*, e propuseram esta dispersão à interferência de eventos de transposição. A interferência de elementos transponíveis na dispersão de genes ribossomais também foi evidenciada no genoma de *Rineloricaria latirostres* (GLUGOSKI et al., 2018), e em espécies de Gymnotiformes (DA SILVA et al., 2011)

Os resultados obtidos do mapeamento de ERV1 realizado neste trabalho mostram que este retroelemento apresenta um padrão disperso no cariótipo das espécies estudadas. Adicionalmente foi observada a presença de *clusters* ERV1 colocalizados aos sinais de DNAr 18S. Semelhantes a outros grupos de TEs, ERVs foram originalmente considerados como DNA lixo (Junk DNA) e acreditava-se que eles desempenhassem nenhum impacto no genoma hospedeiro (GRANDI e TRAMONTANO, 2018). No entanto, posteriormente estudos mostraram que as sequências de ERVs podem proporcionar atividades biológicas vantajosas para a fisiologia do organismo hospedeiro (GREENWOOD et al., 2018; GRANDI e TRAMONTANO, 2018). Temos como exemplo a produção de proteínas que atuam no desenvolvimento placentário chamadas de sincitinas (sincitinas 1 e 2), que são codificadas por ERVs (DUPRESSOIR et al., 2005, 2009, 2011; LARSSON et al., 2008; EVANS, 2012). Ainda não existem informações suficientes sobre o papel de ERVs no genoma de peixes e o seu impacto para a evolução deste grupo, mas considerando os efeitos já mencionados que a presença e expressão de ERVs no genoma de mamíferos desencadeia, acredita-se que as sequências de ERVs devem possuir alguma interferência no funcionamento genômico de peixes (CHALOPIN et al., 2015). Um resultado notável neste trabalho foi a colocalização de sinais de ERV1 com os *clusters* de DNAr 18S. Considerando que DNAs repetitivos são *hotspots* de mutação, é possível que estas regiões marcadas possam ser áreas mais suscetíveis a processos de rearranjos cromossômicos. DA SILVA et al. (2014) observaram a associação de DNAr 5S com o elemento REX 3, e relacionou esta interação com o processo de inversão cromossômica observado nas espécies de *Hypancistrus*.

A família multigênica de histonas são consideradas como excelentes marcadores citogenéticos e apesar disso, o mapeamento de genes de histonas foi realizado em poucos organismos. Em peixes, a maioria dos trabalhos realizados foram direcionados para ordem Characiformes, com poucos estudos a respeito da organização dessas sequências em Loricariidae (HASHIMOTO et al., 2011; PANSONATO-ALVES et al., 2013a, 2013b; TRALDI et al., 2019). O mapeamento de sequências de histona H1 e H3 nas espécies deste trabalho apresentaram um padrão de distribuição disperso ao longo dos

cromossomos, com exceção de *P. vittata* que apresentou um par cromossômico com grandes *clusters* de H1. Vários estudos sobre mapeamento físico de histonas em peixes mostram que estes genes são organizados em *clusters* no cariótipo, similar ao observado em *P. vittata* (PENDÁS et al., 1994; HASHIMOTO et al., 2011, 2013; LIMA-FILHO et al., 2012; PANSONATO-ALVES et al., 2013a, 2013b; SILVA et al., 2013). Porém a dispersão de sinais de Histonas foi anteriormente descrita em outros trabalhos; Utsunomia et al. (2014), observaram a dispersão dos genes de Histona H3 e H4 no cariótipo de *Synbranchus marmoratus*. Resultados semelhantes foram registrados em *Characidium* e *Paradontinae*, em que genes de Histona H1 e H3, apresentaram inserção de elementos transponíveis em suas sequências (PUCCI et al., 2018; TRALDI et al., 2019). Considerando o comportamento dos elementos transponíveis e a sua influência nas atividades funcionais de outras famílias de genes, é possível atribuir a dispersão de Histona H3 mapeadas nas espécies deste trabalho como consequência do processo de “*hitchhiking*” dos genes de Histona, causado por eventos de transposição dos elementos móveis, como já observado em estudos prévios (PUCCI et al., 2018; TRALDI et al., 2019a).

Quanto ao mapeamento de sequências (GATA)_n, embora tenha sido observado sinais dispersos deste microssatélite no cariótipo das quatro espécies, também foi evidenciado um variado nível de acumulação. Este padrão de organização genômica de (GATA)_n, também foi constatada em outros trabalhos de mapeamento cromossômico em peixes, com ou sem um padrão de acumulação nos cromossomos (CROSS et al., 2006; ÚBEDA-MANZANARO et al. 2010; TRALDI et al., 2013b). Em Loricariidae, o mapeamento de (GATA)_n foi realizado em quatro espécies de *Hypostomus*, todas elas apresentando um padrão de distribuição disperso pelo cariótipo, com acumulações aleatórias nas regiões terminais e intersticiais dos cromossomos (TRALDI et al., 2013b). De acordo com Traldi et al. (2013b), esta dispersão do elemento (GATA)_n pode ser resultado da ação de diversos rearranjos cromossômicos, como deleções, duplicações, e inversões pericêntricas ou paracêntricas, que vêm a interferir na concentração e dispersão deste microssatélite pelo cariótipo. Em seres humanos, foi observado que maioria das repetições (GATA)_n são intergênicas, indicando que esses microssatélites quando associados a uma região associada à matriz (RAM) em genes próximos, possuem a função de regular todo o domínio definido por estas sequências (SUBRAMANIAN et al., 2003). É possível que repetições (GATA)_n possuam um papel funcional no genoma de Loricariidae, sendo mantida por forças seletivas, e por isso, este microssatélite participe

na evolução desses organismos, introduzindo novas alternativas genômicas e evolutivas que venham a influenciar a diferenciação destes organismos (TRALDI et al., 2013b). Outra característica notável do elemento (GATA)_n é a sua associação com cromossomos sexuais, possuindo um importante papel para o desenvolvimento desses sistemas em diversos organismos eucariontes (EPPLEN et al., 1982; JONES & SINGH et al., 1985); porém não foi observado a presença de cromossomos sexuais nas quatro espécies deste trabalho. O mapeamento na espécie de mariposa *Ephestia kuehniella* mostrou que apesar de possuir um sistema cromossômico sexual ZZ/ZW, sinais (GATA)_n foram localizados apenas nos autossomos (TRAUT, 1987), similar ao anteriormente citado por TRALDI et al. (2013b) que visualizou sinais dispersos de GATA no cariótipo de quatro espécies de *Hypostomus* sem um padrão de acumulação sexo-específico.

A localização *in situ* de genes snRNA U2 em *Hypancistrus zebra* revelou *clusters* em três pares cromossômicos. O mapeamento de snRNA U2 não foi detectável nas outras espécies deste trabalho. Estes genes apresentam uma forte conservação quanto ao número de sinais detectados no genoma em outras famílias de teleósteos, a exemplo de Characidae e Gymnotidae, sendo observado a presença de um ou poucos pares cromossômicos portadores deste multigene (ÚBEDA-MANZANARO et al., 2010; UTSUNOMIA et al., 2014b; PISCOR et al., 2018, PUCCI et al., 2018); apesar disso, a presença de múltiplos pares apresentando snRNA U2 foram visualizados em alguns peixes, como em *Gymnotus pantanal*, que apresentou este multigene em vários cromossomos acrocêntricos, sendo considerado uma característica a parte desta espécie, em contrapartida a outras espécies de *Gymnotus* mapeadas (UTSUNOMIA et al., 2014b). A variação de localização de outros genes snRNAs foi previamente observada, em cinco espécies de *Astyanax*, (SILVA et al., 2015), em *M. merluccius* (GARCÍA-SOUTO et al., 2015) e em espécies de gafanhotos (ANJOS et al., 2014). Estes estudos descrevem esta variação dos sinais de gene snRNAs, como consequência da ação de eventos de transposição entre cromossomos não homólogos, que podem ter ocorrido durante a evolução dessas espécies.

Devido a capacidade de inserção em diversas partes do genoma, TEs acabam desencadeando alterações na expressão de famílias multigênicas ou genes de cópia única, proporcionando alterações para a evolução dos organismos. Estudos relatam a interferência de TEs para a dispersão de outras sequências repetitivas. Como já mencionado, mapeamento de genes de histonas em espécies de *Characidium* e *Paradontinae* realizados por PUCCI et al., (2018) e TRALDI et al., (2019a), respectivamente, demonstrou, a partir da análise de sequências, a inserção de

retroelementos ERVs nas sequências de genes histona H1. O padrão de dispersão observado pelas sequências mapeadas também podem ser consequência de rearranjos cromossômicos que vem a interferir na concentração e distribuição dessas sequências pelo cariótipo (CROSS et al., 2006; ÚBEDA-MANZANARO et al. 2010; TRALDI et al., 2013b).

5. CONCLUSÃO

O conjunto de dados obtidos sobre a estrutura cromossômica das quatro espécies estudadas, mostra que as espécies *Hypancistrus* sp. “pão”, *Hypancistrus zebra* e *Peckoltia vittata* apresentam um conservado número diploide igual a 52, e a espécie *Hypostomus* sp. diverge destas por apresentar $2n = 64$.

Este trabalho caracteriza-se por ser pioneiro no mapeamento de sequências repetitivas de retrotransposon ERV1 e snRNA U2 em espécies Loricariidae, bem como, genes de Histona H3 e microssatélite (GATA)n em espécies do gênero *Hypancistrus* e *Peckoltia*. O *Double FISH* de DNAr 18S e retrotransposon ERV1 revelou que estas quatro espécies apresentam colocalização destas sequências em seu genoma.

Os resultados obtidos levantam a hipótese da ação de elementos transponíveis interferindo na dispersão de famílias multigênicas no cariótipo das espécies estudadas neste trabalho, como observado pela dispersão de genes de Histona H3 e H1, uma característica já observada em outros grupos de vertebrados, e com *H. zebra* também apresentando sinais adicionais de snRNA U2 em 3 pares cromossômicos.

6. REFERÊNCIAS

ALVES, A. L. Análise da evolução dos gêneros da subfamília Hemipsilichthiinae (Ostariophysi, Siluriformes, Loricariidae) com base em caracteres cromossômicos e de DNA mitocondrial. MSc Thesis, **Universidade Estadual Paulista**. 129pp, 2000.

ALVES, A. L.; OLIVEIRA, C. & FORESTI, F. Karyotype variability in eight species of the subfamilies Loricariinae and Ancistrinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). **Caryologia**. v. 56, p. 57-63, 2003.

ALVES, A. L.; OLIVEIRA, C.; NIRCHIO, M.; GRANADO, Á. & FORESTI, F. Karyotypic relationships among the tribes of Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae) with description of X0 sex chromosome system in a Neotropical fish species. **Genetica**. v. 128, p. 1-9, 2006.

ANJOS, A., RUIZ-RUANO, F. J., CAMACHO, J. P. M., LORETO, V., CABRERO, J., DE SOUZA, M. J., & CABRAL-DE-MELLO, D. C. U1 snDNA clusters in grasshoppers: chromosomal dynamics and genomic organization. **Heredity**, v. 114(2), p. 207–219, 2014.

ARAÚJO, J. G. Economia e pesca de espécies ornamentais do Rio Xingu, Pará, Brasil. **Universidade Federal do Pará**, Belém, Pará, Brasil, 2016.

ARAÚJO, J. G., SANTOS, M. A. S., REBELLO, F. K., & ISAAC, V. J. Cadeia comercial de peixes ornamentais do Rio Xingu, Pará, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v43(2), p. 297-307, 2017

ARMBRUSTER, J. W. *Hypancistrus inspector*: A New Species of Suckermouth Armored Catfish (Loricariidae: Ancistrinae). **Copeia**. v. 2002(1), p. 86–92, 2002.

ARMBRUSTER, J. W. *Peckoltia sabaji*, a new species from the Guyana Shield (Siluriformes: Loricariidae). **Zootaxa**, v. 344, n. 1, p. 1-12, 2003.

ARMBRUSTER, J. W. Phylogenetic relationships of the suckermouth armoured catfishes Loricariidae with emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 141, n. 1, p. 1-80, 2004.

ARMBRUSTER, J. W.; LUJAN, N. K; TAPHORN, D. C. Four new *Hypancistrus* (Siluriformes: Loricariidae) from Amazonas, Venezuela. **Copeia**. v. 2007(1), p. 62-79, 2007.

ARMBRUSTER, J. W. The genus *Peckoltia* with the description of two new species and a reanalysis of the phylogeny of the genera of the Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae). **Zootaxa**, v. 1822, n. 1, p. 1-76, 2008.

ARMBRUSTER, J. W.; WERNEKE, D. C.; TAN, M. Three new species of saddled loricariid catfishes, and a review of *Hemiancistrus*, *Peckoltia*, and allied genera (Siluriformes). **Zool J Linn Soc**. v. 480, p. 97–123, 2015.

ARMBRUSTER, J. W. et al. Three new species of saddled loricariid catfishes, and a review of *Hemiancistrus*, *Peckoltia*, and allied genera (Siluriformes). **Zookeys**, n. 480, p. 97-123, 2016.

ARTONI, R. F.; VENERE, P. C.; BERTOLLO, L. A. C. A heteromorphic ZZ/ZW sex chromosome system in fish, genus *Hypostomus* (Loricariidae). **Cytologia**. v. 63, p. 421–425, 1998.

ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A. C. Nature and distribution of constitutive heterochromatin in fishes, genus *Hypostomus* (Loricariidae). **Genetica (The Hague Netherlands)**. v. 106, p. 209–214, 1999.

ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A. C. Trends in the karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). **Hereditas**, v. 134, p. 201-210, 2001.

BIET, E.; SUN, J. S.; DUTREIX, M. Conserved sequence preference in DNA binding among recombination proteins: an effect of ssDNA secondary structure. **Nucleic Acids Research**, v. 27, p. 596-600, 1999.

BIÉMONTÉ, C., VIEIRA, C. Junk DNA as an evolutionary force. **Nature**. p. 443:521–524, 2006.

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

BOURQUE, G., LEONG, B., VEGA, V. B., CHEN, X., LEE, Y. L., SRINIVASAN, K. G., Liu, E. T. Evolution of the mammalian transcription factor binding repertoire via transposable elements. **Genome Research**, v18(11), p. 1752–1762, 2008.

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

BUCKUP, P. A., & SANTOS, G. M. Ictiofauna da Ecorregião Xingu-Tapajós: fatos e perspectivas. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ictiologia**, v98, p. 3-9, 2010.

BUENO, V.; ZAWADZKI, C. H. & MARGARIDO, V. P. Trends in chromosome evolution in the genus *Hypostomus* Lacépède 1803 (Osteichthyes, Loricariidae): a new perspective about the correlation between diploid number and chromosome types. **Rev Fish Biol Fisheries**. v. 22, p. 242-250, 2012.

BUENO, V.; VENERE, P. C.; ZAWADZKI, C. H.; KONERAT, J. T.; VICARI, M. R. & MARGARIDO, V. P. Physical Mapping of the 5S and DNAr 18S in Ten Species of *Hypostomus* Lacépède 1803 (Siluriformes: Loricariidae): evolutionary Tendencies in the Genus. **Sci World J**. p. 1–8, 2014.

BUENO, V.; KONERAT, J. T.; ZAWADZKI, C. H.; VENERE, P. C.; BLANCO, D. R. & MARGARIDO, V. P. Divergent Chromosome Evolution in Hypostominae Tribes (Siluriformes: Loricariidae): Correlation of Chromosomal Data with Morphological and Molecular Phylogenies. **Zebrafish**. 2018.

BURGESS, W. E. An atlas of freshwater and marine catfishes: a preliminary survey of the Siluriformes. **New Jersey, NJ, USA: TFH**, 1989.

BRINGMANN, P. & LUHRMANN, R. Purification of the individual snRNPs U1, U2, U5 and U4/U6 from HeLa cells and characterization of their protein constituents. **The EMBO Journal**. v. 5(13), p. 3509–3516, 1986.

CABRAL-DE-MELLO, D. C.; VALENTE, G. T.; NAKAJIMA, R. T.; MARTINS, C. Genomic organization and comparative chromosome mapping of the U1 snRNA gene in cichlid fish, with an emphasis in *Oreochromis niloticus*. **Chromosome Res**. v. 20, p. 279-292, 2012.

CAPY P, Bazin C, Higuete D, Langin T. Dynamics and evolution of transposable elements. **Austin: Landes Bioscience**; 1998.

CARDOSO, A. L.; SALES, K. A. H.; NAGAMACHI, C. Y.; PIECZARKA, J. C.; NORONHA, R. C. R. Comparative cytogenetics of two species of genus *Scobinancistrus* (Siluriformes, Loricariidae, Ancistrini) from the Xingu River, Brazil. **Comparative Cytogenetics**, v. 7, p. 43–41, 2013.

CARDOSO, A. L.; CARVALHO, H. L.; BENATHAR, T. C. M.; SERRÃO, S. M. G.; NAGAMACHI, C. Y.; PIECZARKA, J. C.; DE SOUZA, L. M.; READY, J. S.; NORONHA, R. C. R. Integrated cytogenetic and mitochondrial DNA analyses indicate that two different phenotypes of *Hypancistrus* (L066 and L333) belong to the same species. **Zebrafish**, v. 0, n. 0, p. 209-216, 2016.

CARVALHO P. H., LIMA F. C. T., ZAWASDZSKI, C. H. Two new species of the *Hypostomus cochliodon* group (Siluriformes: Loricariidae) from the rio Negro basin in Brazil. **Neotrop Ichthyol.** v8(1), p. 39–48, 2010.

CENTOFANTE, L.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetic characterization and description of an XX/XY1 Y2 sex chromosome system in catfish *Harttia carvalhoi* (Siluriformes, Loricariidae). **Cytogen Genome Res.** v. 112(3-4), p. 320-24, 2006.

CEREALI, S. S.; POMINI, E.; ROSA, R.; ZAWADZKI, C. H.; FROEHLICH, O. & GIULIANO-CAETANO, L. Karyotype description of two species of *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) of the Planalto da Bodoquena, Brazil. **Genet Mol Res.** v. 7, p. 583-591, 2008.

CHALOPIN, D.; NAVILLE, M.; PLARD, F.; GALIANA, D.; VOLFF, J. N. Comparative analysis of transposable elements highlights mobilome diversity and evolution in vertebrates. **Genome Biol. Evol.** v. 7, p. 567–580, 2015.

CHARLESWORTH, B.; SNIEGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, v. 371, p. 215-220, 1994.

CHILDS, G.; MAXSON, R.; COHN, R. H.; KEDES, L. Orphans: Dispersed genetic elements derived from tandem repetitive genes of eukaryotes. **Cell**, v. 23, n. 3, p. 651-663, 1981.

CIOFFI, M. B.; MARTINS, C. & BERTOLLO, L. A. C. Chromosome spreading of associated transposable elements and ribosomal DNA in the fish *Erythrinus erythrinus*. Implications for genome change and karyoevolution in fish. **BMC Evol Biol.** v. 10, p. 271-280, 2010.

CIOFFI, M. B., & BERTOLLO, L. A. C. Chromosomal Distribution and Evolution of Repetitive DNAs in Fish. **Repetitive DNA**, p. 197–221, 2012.

CRUZ, A. L.; PEDRETTI, A. C. E.; FERNANDES, M. N. Stereological estimation of the surface area and oxygen diffusing capacity of the respiratory stomach of the air-breathing

armored catfish *Pterygoplichthys anisitsi* (Teleostei: Loricariidae). **Journal of Morphology**, v. 270, n. 5, p. 601–614, 2009.

DA SILVA, M.; MATOSO, D. A.; VICARI, M. R.; ALMEIDA, M. C.; MARGARIDO, V. P.; ARTONI, R. F. Physical mapping of 5S in two Species of Knifefishes: *Gymnotus pantanal* and *Gymnotus paraguensis* (Gymnotiformes). **Cytogenet Genome Res**, v. 134, p. 303-307, 2011.

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

DE LA HERRÁN, R.; FONTANA, F.; LANFREDI, M.; CONGIU, L.; LEIS, M.; ROSSI, R.; RUIZ REJÓN, C.; RUIZ REJÓN, M.; GARRIDO-RAMOS, M. A. Slow rates of evolution and sequence homogenization in an ancient satellite DNA family of sturgeons. **Molecular biology and evolution**, v. 18, n. 3, p. 432–436, 2001.

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

DE OLIVEIRA, R. R.; FELDBERG, E.; ANJOS, M. B.; ZUANON, J. Occurrence of multiple sexual chromosomes (XX/XY₁Y₂ and Z₁Z₁Z₂Z₂/Z₁Z₂W₁W₂) in catfishes of the genus *Ancistrus* (Siluriformes, Loricariidae) from the Amazon Basin. **Genetica**. v. 134(2), p. 243–249, 2008.

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

DOOLITTLE, W.F. & SAPIENZA, C. Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. **Nature**, v284, p. 601-603, 1980.

DUPRESSOIR, A.; MARCEAU, G.; VERNOCHET, C.; BÉNIT, L.; KANELLOPOULOS, C.; SAPIN, V.; et al. Syncytin-A and syncytin-B, two fusogenic placenta-specific murine envelope genes of retroviral origin conserved in Muridae. **PNAS**, v. 102, p. 725–730, 2005.

DUPRESSOIR A.; VERNOCHET, C.; BAWA, O.; HARPER, F.; PIERRON, G.; OPOLON, P.; & HEIDMANN, T. Syncytin-A knockout mice demonstrate the critical role in placentation of a fusogenic, endogenous retrovirus-derived, envelope gene. **PNAS**, v. 106, p. 12127–12132, 2009.

DUPRESSOIR A.; VERNOCHET, C.; HARPER, F.; GUEGAN, J.; DESSEN, P.; PIERRON, G. & HEIDMANN, T. A pair of co-opted retroviral envelope syncytin genes is required for formation of the two-layered murine placental syncytiotrophoblast. **PNAS**, v. 108, p. E1164–E1173, 2011.

EPPLEN, J.T.; MC CARREY, JR.; SUTOU, S.; OHNO, S.; Base sequence of a cloned snake W chromosome DNA fragment and identification of a male-specific putative mRNA in the mouse. **Proc Natl Acad Sci**, v. 79, p. 3798-3802, 1982.

EPPLEN, J.F.; EPPLEN-HAUPT, A. Aspects of tandemly organized, repetitive sequences in chromosomal DNA. In: SOBTI, R.C.; OBE, G.; ATHWAL, R.S. (Eds.) Some aspects of chromosome structure and functions. Índia: **Narosab Publishing House**, 2002. 238 p. 1-10.

ESCHMEYER, W. N.; FONG, J. D. Species by family/subfamily. 2021. Disponível em: (<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesBy-Family.asp>). Acessado em: 5 de Junho. 2021.

EVANS, J. P. Sperm-egg interaction. **Annual Review of Physiology**, v. 74, p. 477–502, 2012.

FAVARATO, R. M.; SILVA, M.; OLIVEIRA, R. R.; ARTONI, R. F.; FELDBERG, E. & MATOSO, D. A. Cytogenetic diversity and the evolutionary dynamics of rDNA genes and telomeric sequences in the *Ancistrus* genus (Loricariidae: Ancistrini). **Zebrafish**. v. 13, p. 103-111, 2016.

FAVARATO, R. M.; RIBEIRO, L. B.; FELDBERG, E. & MATOSO, D. A. Chromosomal mapping of transposable elements of the rex family in the bristlenose catfish, *ancistrus* (Siluriformes, Loricariidae), from the amazonian region. **J. Hered.** v. 108, p. 254–261, 2017.

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

FESCHOTTE, C. Transposable elements and the evolution of regulatory networks. **Nature Rev. Genet**, v9, p. 397–405, 2008.

FESCHOTTE, C. & GILBERT, C. Endogenous viruses: insights into viral evolution and impact on host biology. **Nat. Rev. Genet**, v13, 283–296, 2012.

FINNEGAN, D. J. Eukaryotic transposable elements and genome evolution. **Trends in Genetics**, vol. 5, n. 4, p. 103-107, 1989.

FISCH-MULLER, S. Subfamily Ancistrinae (Armored catfishes). p. 373-400. In: **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. REIS, S. O. et al. (eds.). EDIPUCRS, Porto Alegre, Brazil. 2003.

FRICKE, R., ESCHMEYER, W. N. & R. VAN DER LAAN (EDS) 2019. **Eschmeyer's catalog of fishes: genera, species, references**. Disponível em: (<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>). Acessado em: 20 Nov. 2019.

GALETTI JUNIOR, P. M.; AGUILAR, C. T.; MOLINA, W. F. An overview of marine fish cytogenetics. **Hydrobiologia**. v. 420, p. 55-62, 2000.

GARCÍA-SOUTO, D.; TRONCOSO, T.; PEREZ, M. & PASANTES, J. J. 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**, e0146150 (2015).

GARG, T. K.; DOMINGOS F. X. V.; ALMEIDA-VAL, V. M. F.; VAL, A. L. Histochemistry and functional organization of the dorsal skin of *Ancistrus dolichopterus* (Siluriformes: Loricariidae). ***Neotropical Ichthyology***. v. 8, n. 4, p. 877-884, 2010.

GEERINCKX, T.; HERREL, A.; ADRIAENS, D. Suckermouth armored catfish resolve the paradox of simultaneous respiration and suction attachment: a kinematic study of *Pterygoplichthys disjunctivus*. ***Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology***, v. 315, n. 3, p. 121-131, 2011.

GIULIANO-CAETANO, L. Polimorfismo cromossômico Robertsoniano em populações de *Rineloricaria latirostris* (Pisces, Loricariidae). [Ph.D. Dissertation]. São Carlos, SP. **Universidade Federal de São Carlos**, 1998.

GLUGOSKI, L.; GIULIANO-CAETANO, L.; MOREIRA-FILHO, O.; VICARI, M. R.; NOGAROTO, V. Co-located hAT transposable element and 5S rDNA in an interstitial telomeric sequence suggest the formation of Robertsonian fusion in armored catfish. ***Gene***, v. 650, p. 49-54, 2018.

GRANDI, N. & TRAMONTANO, E. Human Endogenous Retroviruses Are Ancient Acquired Elements Still Shaping Innate Immune Responses. ***Frontiers in Immunology***. v. 9, 2018.

GROSS, M. C.; SCHNEIDER, C. H.; VALENTE, G. T.; MARTINS, C. & FELDBERG, E. Variability of DNAr 18S locus among *Symphysodon* fishes: Chromosomal rearrangements. ***J Fish Biol.*** v. 76, p. 1117-1127, 2010.

HARLT DL, Lozovsaya ER, Lawrence JG. Nonautonomous transposable elements in prokaryotes and eukaryotes. ***Genetica***. v. 86(1-3), p. 47-53, 1992.

HASHIMOTO, D.T.; FERGUSON-SMITH, M. A.; RENS, W.; FORESTI, F. Chromosome mapping of H1 histone and 5S rRNA genes *clusters* in three species of *Astyanax* (Teleostei, Characiformes). ***Cytogenetic and Genome Research***, v. 134, n. 1, p. 64-71, 2011.

HASHIMOTO, D. T.; FERGUSON-SMITH, M. A.; RENS, W.; DO PRADO, F. D. Cytogenetic mapping of H1 histone and ribosomal RNA genes in hybrids between catfish species *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum*. ***Cytogenetic and Genome Research***, v. 139, n. 2, p. 102-106, 2013.

ISBRUCKER, I. J. H. Classification and Catalogue of the Mailed Loricariidae (Pisces, Siluriformes). ***Verslagen en technische Gegevens***, v. 22, n. 1, p. 1-181, 1980.

JONES, K.W.; SINGH, L. Snakes and the evolution of sex chromosomes. ***Trends Genet.*** v. 1, p. 55-61, 1985.

JURKA, J.; KAPITONOV, V. V.; KOHANY O.; JURKA, M. V. Repetitive sequences in complex genomes: structure and evolution. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 8, p. 241-259, 2007.

KAVALCO, K. F.; PAZZA, R.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Heterochromatin characterization of four fish species of the family Loricariidae (Siluriformes). **Hereditas**, 141(3), 237–242, 2004.

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

KAZAZIAN, H. H. Mobile elements: drivers of genome evolution. **Science**, v303, p. 1626–1632, 2004.

KEDES, L. H. Histone genes and histone messengers. **Annu Rev Biochem**, v48, p. 837-870, 1979.

KIDWELL, M. G. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. **Genetica**, v115, p. 49-63, 2002.

LARSSON, L. I.; BJERREGAARD, B.; & TALTS, J. F. Cell fusions in mammals. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 129, p. 551–561, 2008.

LIMA-FILHO, P. A.; CIOFFI, M. B.; BERTOLLO, L. A. C.; MOLINA, W. Chromosomal and morphological divergences in Atlantic populations of the frillfin *Bathygobius soporator* (Gobiidae, Perciformes). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 434, p. 63-70, 2012.

LI, Y.-C.; KOROL, A. B.; FAHIMA, T.; BEILES, A.; NEVO, E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, v. 11, n. 12, p. 2453-2465, 2002.

LIU, Z.; LI, P.; KOCABAS, A.; KARSI, A.; JU, Z. 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**, v. 289, n. 2, p. 317-324, 2001.

LUJAN, N. K.; HIDALGO, M. H.; STEWART, D. J. Revision of Panaque (Panaque), with descriptions of three new species from the Amazon Basin (Siluriformes, Loricariidae). **Copeia**, v. 2010, n. 4, p. 676–704, 2010.

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

LUJAN, N. K.; LOVEJOY, N. R.; LOPEZ-FERNANDEZ, H. Multilocus molecular phylogeny of the suckermouth armored catfishes (Siluriformes: Loricariidae) with a focus

on subfamily Hypostominae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 82, p. 269-288, 2015.

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

MANTOVANI, M.; ABEL, L. D. S; MESTRINER, C. A. & MOREIRA-FILHO, O. Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. **Genetica**. v. 109, p. 161-168, 2000.

MARIOTTO, S.; CENTOFANTE, L.; MIYAZAWA, C. S.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosome polymorphism in *Ancistrus cuiabae* Knaack, 1999 (Siluriformes: Loricariidae: Ancistrini). **Neotropical Ichthyology**, v. 7, p. 595-600, 2009.

MARIOTTO S, CENTOFANTE L, VICARI MR, ARTONI RF, MOREIRA-FILHO O. Chromosomal diversification in ribosomal DNA sites in *Ancistrus* Kner, 1854 (Loricariidae, Ancistrini) from three hydrographic basins of Mato Grosso, Brazil. **Comp Cytogenet.** v. 5, p. 289–300, 2011.

MARTINEZ, E. R. M.; Zawadzki, C. H.; FORESTI, F.; & Oliveira, C. Cytogenetic analysis of five *Hypostomus* species (Siluriformes, Loricariidae). **Genetics and Molecular Biology**. v. 34(4), p. 562–568, 2011.

MATTIAS, A. T., RANTIN, F. T., FERNANDES, M. N. Gill respiratory parameters during progressive hypoxia in the facultative air-breathing fish, *Hypostomus regani* (Loricariidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**. v. 120, n. 2, p. 311–315, 1998.

MARTINS, C. Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In: Fish Cytogenetics. New York: **Science Publisher**. p. 421-432, 2007.

MARTINS, F. O.; M. M. F. MARINHO, M. M. F.; LANGEANI, F. & SERRA, J. P. A New Species of *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae) from the Upper Rio Paraguay Basin, Brazil. **Copeia**. p. 494-500, 2012.

MENDES-NETO, E. O.; VICARI, M. R.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O. Description of karyotype in *Hypostomus regani* (Ihering, 1905) (Teleostei, Loricariidae) from the Piumhi River in Brazil with comments on karyotype variation found in *Hypostomus*. **Comparative Cytogenetics**, v. 5, p. 133-142, 2011.

MERLO, M. A.; CROSS, I.; CHAIRI, H.; MANCHADO, M.; REBORDINOS, L. Analysis of three multigene families as useful tools in species characterization of two closely-related species, *Dicentrarchus labrax*, *Dicentrarchus punctatus* and their hybrids. **Genes Genet Syst.** v. 85, p. 341–349, 2010.

MERLO, M. A.; CROSS, I.; PALAZÓN, J. L.; ÚBEDA-MANZANARO, M.; SARASQUETE, C.; REBORDINOS, L. Evidence for 5S rDNA horizontal transfer in the toadfish *Halobatrachus didactylus* (Schneider, 1801) based on the analysis of three multigene families. **BMC Evol Biol.** v. 12, p. 201, 2012.

MONTOYA-BURGOS, J. I.; MARINHO, M. M. F.; LANGEANI, F. & SERRA, J. P. Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. **Molecular Ecology**. v. 12, p. 1855-1867, 2003.

NELSON, J. S.; GRANDE, T. C.; WILSON, M. V. H. Fishes of the world. **5th edition, John Wiley & Sons**. p. 752, 2016.

NEI, M. & ROONEY, A. P. Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. **Ann Rev Genetics**. v. 39, p. 121-152, 2005.

OLIVEIRA, R. R.; RAPP PY-DANIEL, L. H.; ZUANON, J.; ROCHA, M. S. A new species of the ornamental catfish genus *Peckoltia* (Siluriformes: Loricariidae) from Xingu Basin, Brazilian Amazon. **Copeia**., v. 2012, n. 3, p. 547-553, 2012.

OLIVEIRA, L. C.; RIBEIRO, M. O.; DUTRA, E. S.; ZAWADZKI, C. H.; PORTELA-CASTRO, A. L. B.; MARTINS-SANTOS, I. C. Karyotype structure of *Hypostomus* cf. *plecostomus* (Linnaeus, 1758) from Tapajós River basin, Southern Amazon: occurrence of sex chromosomes (ZZ/ZW) and their evolutionary implications. **Genetics and Molecular Research**. v. 14, p. 6625–6634, 2015.

OJIMA, Y. & UEDA, T. New C-banded marker chromosomes found in carp-funa hybrids. **Proceedings of the Japan Academy**. v. 54, p. 15-20, 1979.

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

PAIM, F. G.; NOBILE, M. L. M. O.; FORESTI, F.; OLIVERIA, C. Cytogenetic tools to study the biodiversity of neotropical fish: from the classic to the advent of cell culture. *In: Cytogenetics-Past, Present and Further Perspectives*. IntechOpen, 2018.

PANSONATO-ALVES, J. C.; SERRANO, E.; UTSUNOMIA, R.; SPACCHETTI, P. Mapping five repetitive DNA classes in sympatric species of *Hypostomus* (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae): Analysis of chromosomal variability. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 23, n. 4, p. 477-489, 2013a.

PANSONATO-ALVES, J. C.; HILSDORF, A. W. S.; UTSUNOMIA, R.; SILVA, D. Chromosomal mapping of repetitive DNA and cytochrome C oxidase I sequence analysis reveal differentiation among sympatric samples of *Astyanax fasciatus* (Characiformes, Characidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 141, n. 2-3, p. 133-142, 2013b.

PENDÁS, A. M.; MORAN, P.; GARCIA-VASQUEZ, E. Organization and chromosomal location of the major histone cluster in brown trout, Atlantic salmon and rainbow trout. **Chromosoma**, v. 103, n. 2, p. 147-152, 1994.

PEREIRA, E. H. L., REIS, R. E. Morphology-based phylogeny of the suckermouth armored 1262 catfishes, with emphasis on the Neoplecostominae (Teleostei: Siluriformes: 1263 Loricariidae). **Zootaxa**, v. 4264, p. 1–104, 2017.

PETY, M. A.; ADALTO, L. C.; NAGAMACHI, C. Y.; PIECZARKA, J. C.; DE SOUSA, L. M.; NORONHA, R. C. R. *In situ* Localization of Ribosomal Sites in Peckoltia and Ancistomus (Loricariidae: Hypostominae) from the Amazon Basin. **Zebrafish**, v. 15, p. 1-7, 2018.

PINKEL, D., STRAUME, T., GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, p. 2934-2938, 1986.

PISCOR, D.; FERNANDES, C. A. & PARISE-MALTEMPI, P. P. Conserved number of U2 snDNA sites in Piabina argentea, Piabarchus stramineus and two Bryconamericus species (Characidae, Stevardiinae). **Neotropical Ichthyology**. v. 16(1), 2018.

PRANG, G. An industry analysis of the freshwater ornamental fishery with particular reference to the supply of Brazilian freshwater ornamentals to the UK market. **Scientific Magazine UAKARI**, v3(1), p. 7-52, 2007

PRIMO, C. C.; GLUGOSKI, L.; VICARI, M. R.; NOGAROTO, V. Chromosome mapping and molecular characterization of the Tc1/Mariner element in Rineloricaria (Siluriformes: Loricariidae). **Braz Arch Biol Technol**. 61: e18170623. 2018.

PUCCI, M.B.; BARBOSA, P.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M.C.; ARTONI, R.F.; et al: Chromosomal spreading of microsatellites and (TTAGGG)_n sequences in the Characidium zebra and C. gomesi genomes (Characiformes: Crenuchidae). **Cytogenet Genome Res**, v. 149, n. 3, p. 182-190, 2016.

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

REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. Check list of the freshwater fish of South and Central America. Porto Alegre. **EDIPUCRS**, p. 729, 2003.

REIS, R. E.; PEREIRA, E. H. L.; ARMBRUSTER, J. W. Delturinae, a new loricariid catfish subfamily (Teleostei, Siluriformes), with revisions of Delturus and Hemipsilichthys. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 147, n. 2, p. 277-299, 2006.

REIS, R. E.; ALBERT, J. S.; DI DARIO, F.; MINCARONE, M. M.; PETRY, P.; ROCHA, L. A. Fish biodiversity and conservation in South America. **Journal of Fish Biology**, v. 89, n. 1, p. 12-47, 2016.

ROCHA-REIS, D. A.; BRANDÃO, K. O.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; PAZZA, R.; KAVALCO, K. F. The persevering cytotaxonomy: discovery of a unique XX/XY sex chromosome system in catfishes suggests the existence of a new, endemic and rare species. **Cytogenetic and Genome Research**. v. 45(1), p. 45–55, 2018.

ROXO, F. F.; OCHOA, L. E.; SABAJ, M. H.; LUJAN, N. K.; COVAIN, R.; SILVA, G. S. C.; OLIVEIRA, C. (2019). Phylogenomic reappraisal of the Neotropical catfish family

Loricariidae (Teleostei: Siluriformes) using ultraconserved elements. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 135, p.148-165, 2019.

RUBERT, M.; ZAWADZKI, C. H.; GIULIANO-CAETANO, L. Cytogenetic characterization of *Hypostomus nigromaculatus* (Siluriformes, Loricariidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 6, p. 93-100, 2008.

RUBERT, M.; DA ROSA, R.; ZAWADZKI, C. H.; MARIOTTO, S.; MOREIRA-FILHO, O. et al. Chromosome mapping of 18S ribosomal RNA genes in eleven *Hypostomus* species (Siluriformes, Loricariidae): diversity analysis of the sites. **Zebrafish**. v. 13, p. 360-8, 2016.

SAITO, Y.; EDPALINA, R. R.; ABE, S. Isolation and characterization of salmonid telomeric and centromeric satellite DNA sequences. **Genetica**, v. 131, n. 2, p. 157-166, 2007.

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

SINGH, L.; PHILLIPS, C.; JONES, K.W. The conserved nucleotide sequences of Bkm, which define Sxr in the mouse, are transcribed. **Cell**, v. 36, p. 111-120, 1984

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

SCHWARZACHER, T. DNA, chromosomes, and in situ hybridization. **Genome**, v46, p. 953-962, 2003.

SCHNEIDER, C. H.; GROSS, M. C.; TERCENCIO, M. L.; ARTONI, R. F.; VICARI, M. R. & FELDBERG, E. Chromosomal evolution of Neotropical cichlids: The role of repetitive DNA sequences in the organization and structure of karyotype. **Rev Fish Biol Fisher**. v. 23, p. 201-214, 2012.

SCHNEIDER, C. H., GROSS, M. C., TERCENCIO, M. L., CARMO, E. J., MARTINS, C., FELDBERG, E. Evolutionary dynamics of retrotransposable elements *Rex1*, *Rex3* and *Rex6* in neotropical cichid genomes. **BMC Evol Biol**. v13(152), p. 1-15, 2013.

SCHMIDT, T., HESLOP-HARRISON, J.S. Genomes, genes, and junk: The large-scale organization of plant chromosomes. **Trends Plant Sci**, v. 3, p. 195-199, 1998.

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

SRIVASTAVA, J.; PREMI, S.; KUMAR, S.; ALI, S. Organization and differential expression of the GACA/GATA tagged somatic and spermatozoa transcriptomes in Buffalo *Bubalus bubalis*. **BMC Genomics**, v. 9, n. 132, p. 1-17, 2008.

SUPIWONG, W.; LIEHR, T.; CIOFFI, M. B.; CHAVEERACH, A.; KOSYAKOVA, N.; et al: Karyotype and cytogenetic mapping of 9 classes of repetitive DNAs in the genome of the naked catfish *Mystus bocourti* (Siluriformes, Bagridae). **Mol Cytogenet.** v. 6, p. 51, 2013.

DE SOUSA, A.; MACIEL, L.; RODRIGUES, L. R. Estudo da comercialização de peixes ornamentais da família Loricariidae (Siluriformes) em Santarém/PA. **Pubvet: Medicina veterinária e Zootecnia.** v. 12, p. 1–7, 2018.

SOUZA, A. C. P., NAGAMACHI, C. Y., MILHOMEM, S. S. R., FELDBERG, E., PIECZARKA, J. C. Cytogenetics analysis in catfish species of the genus *Peckoltia* Miranda Ribeiro, 1912 (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae). **Comparative Cytogenetics**, v. 3, p. 103-109, 2009.

SUBRAMANIAN, S., MISHRA, R. K. and SINGH, L. Genome-wide analysis of Bkm sequences (GATA repeats): predominant association with sex chromosomes and potential role in higher order chromatin organization and function. **Bioinformatics**, v. 19, p. 681-685, 2003.

TAN, M. & J. W. ARMBRUSTER. Two new species of spotted *Hypancistrus* from the Rio Negro drainage (Loricariidae, Hypostominae). **ZooKeys**, v552, p. 123-135, 2016.

TRALDI, J. B.; BLANCO, D. R.; VICARI, M. R.; MARTINEZ, J.F.; LUI, R.L.; BARROS, A. V.; ARTONI, R. F. & MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal diversity in *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae) with emphasis on physical mapping of 18S and 5S rDNA sites. **Gen Mol Res.** v. 12(1), p. 463-71, 2013a.

TRALDI, J. B.; BLANCO, D. R.; VICARI, M. R.; MARTINEZ, J.F.; LUI, R.L.; BARROS, A. V.; ARTONI, R. F. & MOREIRA-FILHO, O. Physical mapping of (GATA)_n and (TTAGGG)_n sequences in species of *Hypostomus* (Siluriformes, Loricariidae). **J Genet.** v. 92(1), p. 127-30, 2013b.

TRALDI, J. B.; ZIEMNICZAK, K.; DE FÁTIMA MARTINEZ, J.; BLANCO, D. R.; LUI, R. L.; SCHEMBERGER, M. O.; NOGAROTO, V.; MOREIRA-FILHO, O. & VICARI, M. R. Chromosome Mapping of H1 and H4 Histones in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes): Dispersed and/or Co-Opted Transposable Elements? **Cytogenetic and Genome Research.** 2019a.

TRALDI, J. B.; LUI, R. L.; MARTINEZ, J. F.; VICARI, M. R.; NOGAROTO, V.; MOREIRA-FILHO, O. & BLANCO, D. R. Chromosomal distribution of the retroelements Rex 1, Rex 3 and Rex 6 in species of the genus *Harttia* and *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae). **Neotropical Ichthyology.** v. 17(2), 2019b.

TRAUT, W. Hypervariable Bkm DNA loci in a moth, *Ephestia kuehniella*: does transposition cause restriction fragment length polymorphism? **Genetics.** v. 115, p. 493–498, 1987.

TERENCIO, M. L.; SCHNEIDER, C. H.; GROSS, M. C.; VICARI, M. R. & FELDBERG, E. Stable karyotypes: A general rule for the fish of the family Prochilodontidae? **Hydrobiologia**. v. 686, p. 147-156, 2012.

ÚBEDA-MANZANARO, M.; MERLO, M. A.; PALAZÓN, J. L.; CROSS, I.; SARASQUETE, C.; REBORDINOS, L. Chromosomal mapping of the major and minor ribosomal genes, (GATA)_n and U2 snRNA gene by double-colour FISH in species of the Batrachoididae family. **Genetica**. v. 138, p. 787–794, 2010.

UTSUNOMIA, R., PANSONATO-ALVES, J. C., SCACCHETTI, P. C., OLIVEIRA, C., FORESTI, F. Scattered organization of the histone multigene family and transposable elements in *Synbranchus*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 37, p. 30-36, 2014a

UTSUNOMIA, R., SCACCHETTI, P. C., PANSONATO-ALVES, J. C., OLIVEIRA, C., FORESTI, F. Comparative chromosome mapping of U2 snRNA and 5S rRNA genes in *Gymnotus* species (Gymnotiformes, Gymnotidae): evolutionary dynamics and sex chromosome linkage in *G. pantanal*. **Cytogenet Genome Res [serial on internet]**, v142(4), p. 286-92, 2014b.

VALENTE, G. T.; MAZZUCHELLI, J.; FERREIRA, I. A.; POLETTO, A. B.; FANTINATTI, B. E. A. & MARTINS, C. Cytogenetic Mapping of the retroelements Rex1, Rex3 and Rex6 among cichlid fish: New insights on the chromosomal distribution of transposable elements. **Cytogenet Genome Res**. v. 133, p. 34-42, 2011.

VALADKHAN, S. snRNAs as the catalysts of pre-mRNA splicing. **Current Opinion in Chemical Biology**. v. 9(6), p. 603-608, 2005.

VICARI, M. R.; NOGAROTO, V.; NOLETO, R. B.; CESTARI, M. M.; CIOFFI, M. B.; ALMEIDA, M. C.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C.; ARTONI, R. F. Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: methods, applications and perspectives. **Journal of Fish Biology**, v. 76, p. 1094-1116, 2010.

WICKER, T., SABOT, F., HUA-VAN, A., BENNETZEN, J. L., CAPY, P., CHALHOUB, B., et al. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. **Nat Rev Genet**, v8(12), p. 973- 982, 2007.

YANO, C. F., BERTOLLO, L. A., REBORDINOS, L., MERLO, M. A., LIEHR, T., PORTELA-BENS, S., CIOFFI, M. B. Evolutionary Dynamics of rDNAs and U2 Small Nuclear DNAs in *Triporthus* (Characiformes, Triporthidae): High Variability and Particular Syntenic Organization. **Zebrafish [serial on internet]**, v14(2), p. 146-54, 2017.

ZAWADZKI, C. H., C. WEBER, C. S., & PAVANELLI. A new dark-saddled species of *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae) from the upper rio Paraguay basin. **Neotropical Ichthyology**, v8, p. 719-725, 2010.

ZIEMNICZAK, K., BARROS, A. V., ROSA, K. O., NOGAROTO, V., ALMEIDA, M. C., CESTARI, M. M., MOREIRA-FILHO, O., ARTONI, R. F., VICARI, M. R. Comparative cytogenetics of Loricariidae (Actinopterygii: Siluriformes): emphasis in

Neoplecostominae and Hypoptopomatinae. **Ital J Zool** [serial on the Internet], v79(4), p. 492-501, 2012.