

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ESTRUTURAL, MOLECULAR E GENÉTICA

STEPHANE CAROLENN QUADROS SCHOTT

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ANÁLISE CROMOSSÔMICA COMPARATIVA  
DE SNRNAS EM ESPÉCIES DE ANCISTRUS (SILURIFORMES:LORICARIIDAE)

PONTA GROSSA

2021

STEPHANE CAROLENN QUADROS SCHOTT

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ANÁLISE CROMOSSÔMICA COMPARATIVA  
DE SNRNAs EM TRÊS ESPÉCIES DE ANCISTRUS (SILURIFORMES:LORICARIIDAE)

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação com a Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestra em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Biologia Evolutiva).

Orientadora: Profa. Dra. Viviane Nogaroto Vicari

PONTA GROSSA

2021

S375 Schott, Stephane Carolenn Quadros  
Caracterização molecular e análise cromossômica comparativa de *sn*  
RNAs em espécies de *Ancistrus* (Siluriformes:Loricariidae) / Stephane Carolenn  
Quadros Schott. Ponta Grossa, 2021.  
63 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Área de Concentração:  
Biologia Evolutiva), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Viviane Nogaroto Vicari.

1. Citogenética. 2. DNAs repetitivos. 3. Evolução cariotípica. 4. FISH. I.  
Vicari, Viviane Nogaroto. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Biologia  
Evolutiva. III.T.

CDD: 576



**Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva**  
*Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa (Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética) e a Universidade Estadual do Centro Oeste (Departamento de Ciências Biológicas)*



**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 06/2021/UEPG**

Ata referente à Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, uma Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, pelo(a) candidato(a) **Stephane Caroleenn Quadros Schott**.


Aos trinta e um dias do mês de agosto de dois mil e vinte e um, sob a presidência do(a) Profa. Dra. Viviane Nogaroto Vicari em sessão pública por sessão remota, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do(a) aluno(a) **Stephane Caroleenn Quadros Schott**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Área de concentração em Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Profa. Dra. Kaline Ziemniczak (IFAM), Dra. Michelle Orane Schemberger (Fiocruz-PR), Prof. Dra. Viviane Demetrio do Nascimento (IF-Jaguariaíva) – Suplente. Atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e ao candidato das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir o(a) candidato(a) passou a defesa de sua dissertação intitulada: “Caracterização molecular e análise cromossômica comparativa de snRNAs em espécies de *Ancistrus* (Siluriformes:Loricariidae)”. Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou a candidata **APROVADA**. A Presidência ressaltou que a obtenção do título de Mestre está condicionada ao disposto da atual aprovação de outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, **com validade de sessenta dias**; assim como comprovante de envio de um artigo científico proveniente de seu trabalho de dissertação a revista com Qualis igual ou superior a B1 (Biodiversidade – Capes) **até o prazo máximo de 90 dias após a defesa**; o não depósito da versão definitiva da Dissertação, bem como as cópias em CD (PDF) com todas as correções feitas e atestadas pelo orientador, assim como o comprovante de envio do artigo nestes prazos, anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Observação (se necessário)


Alteração de Título: sim  não

Novo título: \_\_\_\_\_

Ponta Grossa, 31 de agosto de dois mil e vinte e um.

Profa. Dra. Viviane Nogaroto Vicari (UEPG) 

Profa. Dra. Kaline Ziemniczak (IFAM) 

Profa. Dra. Michelle Orane Schemberger (Fiocruz-PR) 

Dedico este trabalho aos meus pais, assim como eles dedicaram suas vidas a mim.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais Ester e José Carlos, que são o meu maior exemplo de amor que eu poderia ter na minha vida, eu devo tudo a vocês. Vocês sempre enxergaram em mim o que eu não fui capaz e não mediram esforços para me ajudarem a conquistar tudo o que quis. Sem o apoio de vocês para seguir com meus estudos eu não chegaria até aqui. Muito obrigada por tudo, amo vocês incondicionalmente!

Ao restante da minha família que sempre torceu por mim e esteve presente nos meus momentos de vitória, muito obrigada, eu amo vocês!

A minha orientadora Prof. Dra. Viviane Nogaroto e ao professor Prof. Dr. Marcelo Vicari que sempre me socorreram quando eu precisei. Muito obrigada pela oportunidade, por me acolherem tão bem no laboratório, por todo ensinamento, apoio e paciência!

Aos meus amigos e colegas de laboratório Caroline, Geize, Larissa e Matheus, muito obrigada por toda participação e ajuda necessária para a conclusão desse trabalho. Lari, muito obrigada pelo companheirismo e ensino que me deu, você foi essencial para o meu aprendizado e crescimento acadêmico. Carol, muito obrigada por todo apoio emocional que me proporcionou quando precisei durante a rotina do laboratório. Levarei para sempre em meu coração nossos momentos de choros e risadas, além de todas as nossas atrapalhadas singulares que só sua amizade poderia me proporcionar, amo você!

Aos meus melhores amigos Ana, Caroline, Cristine, Enaira, Evaldo, Paola e Sayane que, embora não tenham participado diretamente no meu mestrado, foram essenciais para a minha formação pessoal, além de me proporcionarem muita força e apoio para que caminhasse até ele. A amizade de vocês é tudo pra mim e com certeza grande parte do que eu sou hoje eu devo a ela. Amo todos vocês e obrigada por tudo!

Aos professores que disponibilizam seus laboratórios para a utilização de equipamentos necessários para a metodologia desse trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da UEPG e todo seu corpo docente.

A bolsa concedida e financiamento promovido pelas agências de fomento CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização e conclusão desse trabalho,  
meu muito obrigada!

## RESUMO

Conhecidos popularmente como “cascudos”, os peixes da família Loricariidae apresentam o corpo recoberto de placas ossificadas dispostas em séries, além de boca sugadora na posição ventral. Apresentando uma taxonomia ainda controversa e em constante revisão, esta família é subdividida em seis subfamílias (Lithogeneinae, Delturinae, Rhinelepinae, Loricariinae, Hypoptopomatinae e Hypostominae), onde estão presentes espécies com ampla plasticidade dos números diploides ( $2n$ ) e de fórmulas cariotípicas. Destoando do  $2n = 52$  cromossomos, considerado basal em Ancistrini, o gênero *Ancistrus* (Hypostominae) apresenta uma redução do  $2n$  na maioria das espécies, resultado principalmente de fusões cêntricas, ou Robertsonianas - Rb, além de inversões, transposições e translocações que contribuíram para a variação da morfologia dos cromossomos. Essas alterações geralmente ocorrem associadas às quebras do DNA em locais altamente repetitivos e instáveis, os “pontos de quebras evolutivas”, considerados *hotspots* para rearranjos cromossômicos. Essas sequências repetitivas podem estar organizadas em blocos (famílias multigênicas, DNAs satélite, minissatélite e microssatélites) ou se apresentarem dispersas pelo genoma (elementos transponíveis - TEs). A família multigênica dos *snRNAs* U (pequenos RNAs ricos em uridina) participam do processo de *splicing* do pré-RNA, e são considerados bons marcadores para a compreensão de rearranjos cromossômicos e das relações evolutivas entre espécies próximas. Objetivando-se conhecer quais os tipos de sequências repetitivas e seu envolvimento nos eventos de fissão/fusão cromossômica gerador de diversidade cariotípica no gênero, neste trabalho foi realizada a descrição e mapeamento cromossômico das sequências dos *snRNAs* *U1*, *U2*, *U4*, *U5* e *U6* nos genomas de três espécies de *Ancistrus* (*Ancistrus aguaboensis* -  $2n = 50$ , *Ancistrus* cf. *multispinis* -  $2n = 52$  e *Ancistrus* sp. -  $2n = 50$ ). As sequências nucleotídicas obtidas dos *snRNAs*, bem como as suas estruturas secundárias preditas, mostraram similaridade com as suas correspondentes em peixes. Nos cariótipos das espécies analisadas, os *snRNAs* *U2* e *U5* apresentaram sequências clusterizadas e colocalizadas em um único sítio cromossômico, já o *snRNA* *U1* apresentou marcação em par único. A localização *in situ* para o *snRNA* *U4* evidenciou marcações dispersas em diversos pares de cromossomos, porém não foram visualizadas marcações com a sonda do *snRNA* *U6*. Descritos previamente como “pontos de quebra evolutiva” em Loricariidae, devido a verificação do seu reuso em eventos de quebras e rearranjos cromossômicos, os rDNAs mostraram-se não sintênicos às sondas de *snRNAs* analisadas. Este é o primeiro estudo de caracterização de sequências e localização *in situ* de *snRNAs* em espécies de *Ancistrus*, porém os dados moleculares e cromossômicos avaliados para estas sequências repetitivas, nas três espécies analisadas, não evidenciaram o envolvimento desta família multigênica nos rearranjos cromossômicos que ocasionaram a diversificação cariotípica das espécies de *Ancistrus*.

**Palavras-chave:** DNAs repetitivos; evolução cariotípica; FISH.



## ABSTRACT

Popularly known as “armored catfishes”, the fishes belonging to Loricariidae have their bodies covered by ossified dermal plates organized in series, in addition to a sucking mouth in the ventral position. Loricariidae presents a controversial taxonomy with a lot of undescribed species in the scientific literature. This family is divided in six subfamilies (Lithogeneinae, Delturinae, Rhinelepinae, Loricariinae, Hypoptopomatinae and Hypostominae), presenting species with extensive chromosome variation, due to a high variation in the diploid number ( $2n$ ) and karyotype formulas. Diverging from the  $2n = 52$  chromosomes, considered basal for Ancistrini, the *Ancistrus* genus (Hypostominae) shows a  $2n$  reduction in most species via centric fusions events (Robertsonian – Rb), in addition to inversions, transpositions and translocations events, which have contributed to the chromosome morphology variation. These rearrangements usually are associated to DNA double-strand breaks in highly repetitive unstable regions, considered “evolutionary breaking points”, which are considered hotspots for chromosomal rearrangements. These repetitive sequences can be organized in blocks (multigenic families, satellite, mini-satellites and micro-satellites DNAs) or are dispersed throughout the genome (transposable elements - TEs). The *U snRNA* multigenic family participates in pre-mRNA splicing process. Considering cytogenetic analyzes, *U snRNAs* are considered good markers for the understanding of chromosomal rearrangements and are useful to understand the evolutionary relationships among closely related species. Aiming to understand what types of repetitive DNA sequences are involved in chromosomal fission/fusion events, which probably generated the karyotype diversity present in the genus, it was performed the description and chromosomal mapping of *U1*, *U2*, *U4*, *U5* and *U6 snRNAs* sequences on the genome of three species of *Ancistrus* (*Ancistrus aguaboensis* -  $2n = 50$ , *Ancistrus* cf. *multispinis* -  $2n = 52$  e *Ancistrus* sp. -  $2n = 50$ ). The obtained nucleotide sequences and the predicted secondary structures showed similarities with its correspondents in fish genomes. The *U2* and *U5 snRNAs* probes showed clustered and co-localized sequences in a single chromosome pair, whereas the *U1 snRNA* sites were present in a single pair. The *in situ* location of *U4 snRNA* probes showed sites dispersed along the chromosome pairs, however *U6 snRNA* markers were not detected by FISH. Due to their reuse in chromosomal rearrangements, the rDNAs sites, previously described as “evolutionary breaking points” in Loricariidae, were not co-located to the *snRNAs* sites. This is the first report describing the characterization and chromosome mapping of *U snRNAs* sequences in *Ancistrus*. According to the obtained cytogenetic data, probably this multigenic family is not involved to the chromosomal rearrangements that caused the karyotype diversification in species of *Ancistrus*.

**Key-words:** FISH; karyotype evolution; repetitive DNAs.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Fotos de exemplares de *Ancistrus* sp. coletados no rio Ivaí (Ivaí-PR). Em (A) e (B), podem ser visualizados uma fêmea e um macho, respectivamente, em posição dorsal. Em (C), a seta indica a boca na posição ventral do corpo, na forma de disco. Em (E), a seta indica a presença de barbilhões, os quais são mais desenvolvidos nos machos (B e E), do que nas fêmeas (A e D). (Fonte: acervo do CBSF lab)..... 14
- Figura 2-** Mapa hidrográfico parcial do Brasil representando os pontos de coleta das espécies analisadas no presente estudo: *A. aguaboensis* (rio Ribeirão Bandeirinha, bacia do rio Tocantins), *A. cf. multispinis* (rio Ribeirão Grande, bacia do rio Paraíba do Sul) e *Ancistrus* sp (rio Ivaí, bacia do rio Ivaí). ..... 22
- Figura 3-** Sequência de 1131 pb, contendo o cluster *snRNA U2-U5*, obtida a partir do genoma de *A. aguaboensis*. Sequências *snRNA U2* em azul e *snRNA U5* em rosa. As regiões 186-553 pb e 669-972 pb compreendem as sequências espaçadoras NTS. .... 39
- Figura 4-** Sequência de 267 pb contendo duas cópias adjacentes de *snRNA U4*, obtida a partir do genoma de *A. aguaboensis*. Sequências *snRNA U4* em vermelho (1-132 pb e 137-267 pb). A região 133-136 pb compreende a sequência espaçadora NTS. .... 40
- Figura 5-** Alinhamentos das sequências completas dos *snRNAs U1* 164 pb (a), *U2* 191 pb (b), *U4* 141 pb (c), *U5* 116 pb (d) e *U6* 107 pb (e), obtidas a partir de *A. aguaboensis*., *Apareiodon* sp, *Colossoma macropomum* e *Pygocentrus nattereri*. .... 41
- Figura 6-** Predição das estruturas secundárias dos *snRNAs U1, U2, U4, U5* e *U6*. Em (A) estruturas com escala de cor para probabilidade do pareamento dos pares de bases (em destaque), onde o vermelho representa a máxima e azul a mínima, tamanho de cada sequência e energia livre. Em (B) pareamento do complexo *U4/U6*, participantes da estrutura do spliceossomo. .... 42
- Figura 7-** Cariótipos de *Ancistrus* sp. (A), *A. aguaboensis* (B) e *A. cf. multispinis* (C) submetidos a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) empregando-se a sonda da sequência *snRNAs U1* (em verde) e a *double FISH* com as sondas de *U2* (em vermelho) e *U5* (em verde). Em destaque (caixas), estão evidenciados os pares cromossomos portadores das marcações individualizadas. Barra = 10 µm. .... 43

**Figura 8-** Metáfases cromossômicas de *Ancistrus* sp. (A), *A. aguaboensis* (B) e *A. cf. multispinis* (C) submetidos a localização fluorescente *in situ*, empregando-se sonda de *snRNA U4* (em vermelho). Barra = 10  $\mu\text{m}$ . ..... 44

## LISTA DE ABREVIATURAS

2n- Número diploide

a- Acrocêntrico

DNA- Ácido desoxirribonucleico

dNTP- Desoxirribonucleotídeo trifosfato

DSBs- Quebras da dupla fita (do inglês, *Double Strand Breaks*)

EBRs- Regiões de rupturas evolutivas (do inglês, *Evolutionary Breakpoint Regions*)

FISH- Hibridação *in situ* fluorescente (do inglês, *Fluorescence in situ Hybridization*)

ITS- Sítios teloméricos intersticiais (do inglês, *Interstitial Telomeric Sites*)

m- Metacêntrico

mRNA- RNA mensageiro

NORs- Regiões organizadoras de nucléolo (do inglês, *Nucleolar Organizer Regions*)

NTS- Sequência espaçadora não transcrita (do inglês, *non-transcribed spacer sequence*)

Pb- Pares de base

PCR- Reação em cadeia da polimerase (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*)

Rb- Robertsonianas

rDNA- DNA ribossômico

RNA- Ácido ribonucleico

rRNA- RNA ribossômico

RTEs- Elementos retrotransponíveis

sm- Submetacêntrico

snRNAs- Pequenos RNAs nucleares (do inglês, *Small nuclear RNAs*)

snRNPs- Pequenas ribonucleoproteínas nucleares (do inglês, *Small Nuclear Ribonucleoproteins*)

st- Subtelocêntrico

TEs- Elementos transponíveis (do inglês, *Transposable Elements*)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1 Família Loricariidae: Aspectos gerais .....	13
1.1.1 Gênero <i>Ancistrus</i> .....	14
1.2 Estudos citogenéticos em Loricariidae .....	15
1.3 DNAs repetitivos .....	16
<b>2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS</b> .....	21
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	22
3.1 Material biológico e locais de coleta .....	22
3.2 Preparações cromossômicas e extração do DNA .....	23
3.3 Obtenção de sequências repetitivas .....	23
3.4 Marcação de sondas .....	24
3.5 Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH) .....	24
<b>4 RESULTADOS</b> .....	26
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	45
<b>ANEXOS</b> .....	56

# 1 INTRODUÇÃO

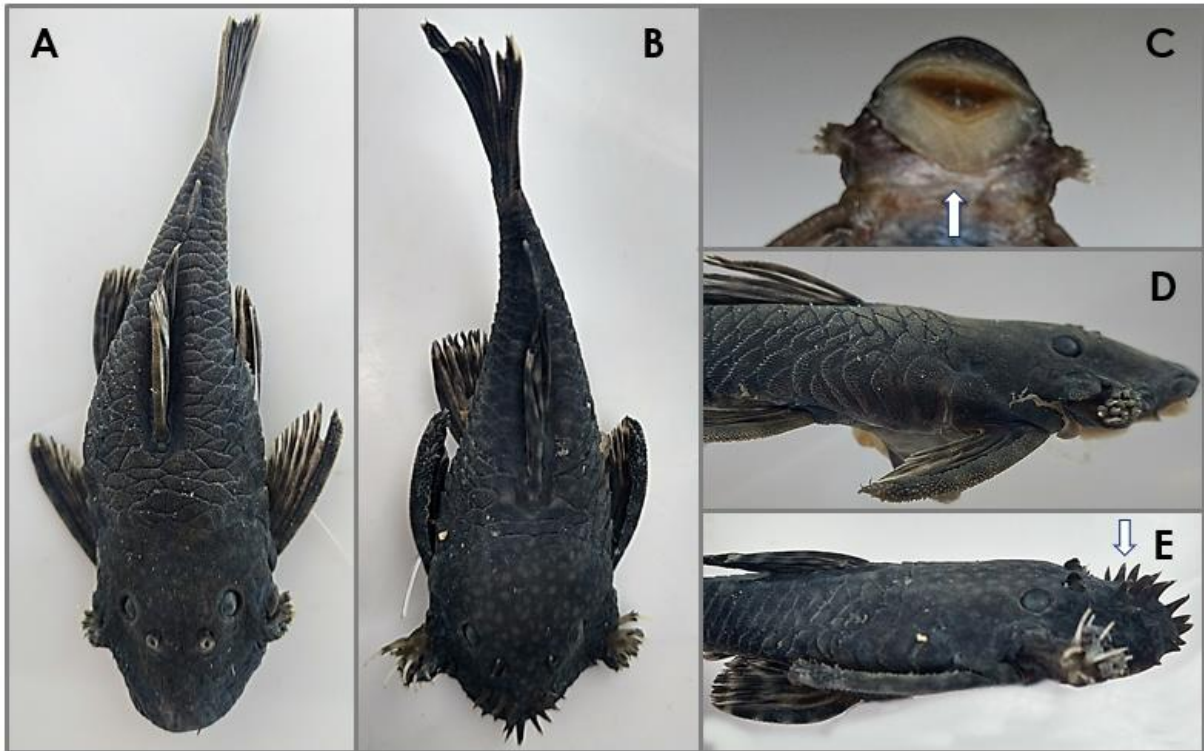
## 1.1 Família Loricariidae: Aspectos gerais

A ordem Siluriformes pertence a classe Actinopterygii e à superordem Ostariophysi. Está incluída no grande grupo de peixes primários de água doce neotropicais, o Otophysa, e representa a maior parcela da composição da ictiofauna Neotropical (Américas do Sul e Central) (MALABARBA; MALABARBA, 2020). Possui 39 famílias reconhecidas e mais de 4000 espécies válidas (FRICKE *et al.*, 2021). Embora seja um grupo predominantemente de peixes de água doce, algumas famílias apresentam espécies estuarinas, como Auchenipteridae, Aspredinidae e Pangasiidae (de PINNA, 1998), e as famílias Ariidae e Plotosidae são principalmente marinhas, com distribuição mundial (BERRA, 2001).

Loricariidae é a família mais numerosa da ordem, abrigando mais de 1000 espécies válidas (FRICKE *et al.*, 2021). A taxonomia desta família ainda é controversa e está em constante revisão, o que resulta em problemas na divisão de suas subfamílias. Atualmente, ela se encontra subdividida em seis subfamílias: Lithogeneinae, Delturinae, Rhinelepininae, Loricariinae, Hypoptopomatinae e Hypostominae (ARMBRUSTER, 2004; LUJAN *et al.*, 2015). São geograficamente distribuídos da Costa Rica e Panamá até a Argentina (LÓPEZ; MIQUELARENA, 1991) e possuem grande diversidade em sua morfologia e padrões de coloração (ARMBRUSTER, 2004).

Os peixes dessa família são popularmente conhecidos como “cascudos” por apresentarem um corpo coberto de placas ossificadas, dispostas em várias séries, e dentes dérmicos denominados odontódeos (SILVANO *et al.*, 2001) (Fig. 1A e B). Apresentam ainda a boca na posição ventral, com lábios formando um disco oral usado para aderir a substratos sólidos e forrageamento (GEERINCKX *et al.*, 2011) (Fig. 1C). Suas bocas sugadoras e dentes raspadores ajudam na dieta principalmente detritívora-iliófaga, alimentando-se principalmente de algas e detritos (BUCK; SAZIMA, 1995; de PINNA, 1998; GEERINCKX *et al.*, 2011).

**Figura 1-** Fotos de exemplares de *Ancistrus* sp. coletados no rio Ivaí (Ivaí-PR). Em (A) e (B), podem ser visualizados uma fêmea e um macho, respectivamente, em posição dorsal. Em (C), a seta indica a boca na posição ventral do corpo, na forma de disco. Em (E), a seta indica a presença de barbilhões, os quais são mais desenvolvidos nos machos (B e E), do que nas fêmeas (A e D). (Fonte: acervo do CBSF lab).



### 1.1.1 Gênero *Ancistrus*

Dentro da divisão das subfamílias de Loricariidae, a antiga subfamília Ancistrinae foi considerada sinônimo de Hypostominae por Armbruster (2004). Nesta nova organização, Hypostominae reúne 494 espécies válidas (FRICKE *et al.*, 2021), agrupadas nas tribos: Corymbophanini, Rhineleporini, Hypostomini, Pterygoplichthyini e Ancistrini (ARMBRUSTER, 2004; LUJAN *et al.*, 2015). Ancistrini também é alvo de estudos acerca dos gêneros que compõem a tribo (LUJAN *et al.*, 2015). Em uma última atualização sistemática, Lujan *et al.* (2015) alocaram 10 gêneros pertencentes à tribo, onde *Ancistrus* é o mais rico em espécies, distribuídas ao longo da América do Sul (FERRARIS, 2007; ARMBRUSTER, 2008; LUJAN *et al.*, 2013). Contudo, a tribo ainda agrupa representantes que detêm alta diversidade morfológica e um conjunto grande de espécies aguardando por validação científica e descrição nominal (LUJAN *et al.*, 2015).



Os peixes do gênero *Ancistrus* apresentam cuidado parental de ovos e larvas, ocorrendo principalmente entre os indivíduos machos que protegem o ninho de predadores e machos rivais (SABAJ *et al.*, 1999). Possuem hábitos noturnos e, durante o dia, são encontrados escondidos em troncos e pedras submersos (ZUANON, 1999). A maioria das espécies de *Ancistrus* apresenta dimorfismo sexual em relação ao tamanho do barbilhão, sendo esses maiores nos machos e mais curtos nas fêmeas (ISBRUCKER; NIJSSEN, 1992) (Fig. 1D e E). A coloração das espécies é bastante variável, do preto ao marrom esverdeado, podendo apresentar pintas ou manchas pelo corpo (FERRARIS, 2007).

## 1.2 Estudos citogenéticos em Loricariidae

A família Loricariidae apresenta alta diversidade de números diploides ( $2n$ ), que pode variar de  $2n = 34$  cromossomos em *Ancistrus cuiabae* (MARIOTTO *et al.*, 2011) até  $2n = 96$  cromossomos em *Hemipsilichthys* sp., citado como *Upsilonodus* sp. (KAVALCO *et al.*, 2005). Observado em subfamílias consideradas basais (como Neoplecostominae) e no grupo irmão Trichomycteridae (ZIEMNICZAK *et al.*, 2012), o  $2n$  de 54 cromossomos seria um caráter plesiomórfico na família Loricariidae (ARTONI; BERTOLLO, 2001).

Poucas espécies pertencentes a subfamília Hypostominae mantêm esse número diploide de 54 cromossomos. Em Ancistrini, estudos citogenéticos evidenciaram  $2n = 52$  cromossomos em muitas espécies, com predominância de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos (ARTONI; BERTOLLO, 2001; de OLIVEIRA *et al.*, 2006; GLUGOSKI *et al.*, 2020). Pterygoplichthyini, considerado grupo irmão de Ancistrini (ARMBRUSTER, 2004), demonstrou predominância de  $2n = 52$  cromossomos (ALVES *et al.*, 2006), sugerindo então que a condição ancestral para Ancistrini seria de  $2n = 52$  cromossomos (BUENO *et al.*, 2018).

Em Ancistrini, somente as espécies de *Ancistrus* apresentam uma condição que difere do  $2n = 52$  cromossomos, com alta frequência de cromossomos acrocêntricos e fórmulas cariotípicas distintas (de OLIVEIRA *et al.*, 2007, 2008, 2009; MARIOTTO *et al.*, 2009, 2011; KONERAT *et al.*, 2015; FAVARATO *et al.*, 2016; BARROS *et al.*, 2017; BUENO *et al.*, 2018; GLUGOSKI *et al.*, 2020). O número diploide encontrado dentro do gênero varia entre  $2n = 34$  até 54 cromossomos, onde é possível observar na maioria das espécies a redução do  $2n$  (de OLIVEIRA *et al.*, 2009; MARIOTTO *et al.*, 2011; RIBEIRO *et al.*, 2015; GLUGOSKI *et al.*, 2020). Além da grande diversidade de  $2n$  e fórmulas cariotípicas presentes no gênero (revisado em GLUGOSKI *et al.*, 2020), algumas de suas espécies podem apresentar diferentes sistemas

de cromossomos sexuais, como os sistemas XX/X0, XX/XY, XX/XY<sub>1</sub>Y<sub>2</sub>, ZZ/ZW e Z<sub>1</sub>Z<sub>1</sub>Z<sub>2</sub>Z<sub>2</sub>/Z<sub>1</sub>Z<sub>2</sub>W<sub>1</sub>W<sub>2</sub> (MARIOTTO *et al.*, 2004; ALVES *et al.*, 2006; MARIOTTO; MIYAZAWA, 2006; PRIZON *et al.*, 2017; de OLIVEIRA *et al.*, 2008, 2018).

Devido a essa alta plasticidade cariotípica na família, Loricariidae é um alvo constante de estudos citogenéticos. Eles auxiliam na compreensão dos acontecimentos genéticos que levaram a evolução do grupo, auxiliando também no entendimento a respeito da citotaxonomia de grupos crípticos e na compreensão da biogeografia das espécies (ARTONI *et al.*, 2009).

Sabe-se que rearranjos cromossômicos, tais como inversões paracêntricas e pericêntricas, translocações, deleções, duplicações e fusões cêntricas ou rearranjos Robertsonianos (Rb) estão envolvidos na evolução cariotípica da tribo Ancistrini (CARDOSO *et al.*, 2013; GLUGOSKI *et al.*, 2020). Com exceção de espécies com  $2n = 52$  e  $54$  cromossomos, as fusões cêntricas são as principais responsáveis pela redução do  $2n$  encontrada no gênero *Ancistrus* (ALVES *et al.*, 2003; SOUZA, 2003; de OLIVEIRA *et al.*, 2009; MARIOTTO *et al.*, 2011). Já os mecanismos de inversões, transposições e translocações contribuíram para a variação da morfologia dos cromossomos com a manutenção do número de cromossomos no cariótipo (MARIOTTO *et al.*, 2011; PRIZON *et al.*, 2016).

Esses rearranjos geralmente possuem ocorrência associada às quebras do DNA em locais altamente repetitivos (BRUSCHI *et al.*, 2014). A instabilidade de tais regiões é descrita como “ponto de quebras evolutivas”, os quais são considerados *hotspots* para rearranjos cromossômicos (PEVZNER; TESLER, 2003).

### 1.3 DNAs repetitivos

As sequências repetitivas têm se mostrado fundamentais em estudos de evolução cromossômica (MAXON *et al.*, 1983; CHARLESWORTH *et al.*, 1994; VICARI *et al.*, 2010). DNAs repetitivos são fragmentos de DNA curtos ou longos presentes em múltiplas cópias no genoma (PATHAK; ALI, 2012), representando uma grande parte do DNA total em eucariotos (SUMNER, 2003). O tamanho do genoma desses seres independe da complexidade do organismo e as diferenças encontradas entre eles são decorrentes de diferentes quantidades de DNAs repetitivos (KIDWELL, 2002; GREGORY, 2005; GREGORY *et al.*, 2007).

Essas sequências podem estar organizadas em blocos, como as famílias multigênicas (DNAs ribossômicos - rDNAs, genes para histonas e pequenas ribonucleoproteínas nucleares - snRNPs), DNAs satélite, minissatélite e microsatélites; ou, podem se apresentar dispersas pelo

genoma, como os elementos transponíveis (TEs) (WICKER *et al.*, 2007). À exceção das famílias multigênicas, os DNAs repetitivos foram considerados como sequências inertes nos genomas devido à sua aparente falta de função (OHNO, 1972). No entanto, com o avanço da era genômica inúmeros estudos propõem que as sequências repetitivas estão envolvidas em uma grande variedade de funções e novidades genômicas, as quais abrangem desde mecanismos de estabilidade e segregação dos cromossomos até aqueles envolvidos na regulação da expressão ou surgimento de novos genes (DÍAZ-CASTILLO, 2017; GE, 2017; LOWER *et al.*, 2019).

As famílias multigênicas são formadas por conjuntos de genes com similaridade estrutural e funcional, decorrentes do processo de acúmulo de genes duplicados (NEI; ROONEY, 2005). Nos eucariotos, os genes codificadores de rDNAs compreendem duas famílias gênicas distintas compostas por repetições organizadas *in tandem*. O rDNA maior (rDNA 45S) é composto pelos genes que codificam os rRNAs 18S, 5.8S e 28S, que são responsáveis pela organização do nucléolo, e o rDNA menor que codifica o rRNA 5S (LONG; DAWID, 1980). O rDNA menor é uma sequência altamente conservada codificante para o rDNA 5S, o qual participa da montagem da subunidade ribossomal maior (LONG; DAWID, 1980). O mapeamento cromossômico por hibridação *in situ* fluorescente indicou que essas famílias multigênicas apresentam alta variação no número e localização dos sítios de rDNAs 5S e 18S em cromossomos de *Ancistrus* (MARIOTTO *et al.*, 2011; FAVARATO *et al.*, 2015; BARROS *et al.*, 2017; PRIZON *et al.*, 2017; PETY *et al.*, 2018; GLUGOSKI *et al.*, 2020).

Os genes da família das histonas H1, H2A, H2B, H3 e H4, e suas sequências derivadas, são responsáveis pela codificação das histonas, proteínas estruturais que fazem parte do nucleossomo, essenciais para o acondicionamento do DNA (EIRIN-LÓPEZ *et al.*, 2004). O nucleossomo é uma subunidade fundamental da cromatina e é composto por uma fita de DNA enrolado às histonas. Os genes para as histonas H2A, H2B, H3 e H4 codificam proteínas que constituem uma estrutura octamérica, enquanto o gene para H1 codifica a proteína denominado histona ligante, pois ela interage com o DNA ligante e está situada na parte externa do nucleossomo (HAYES; WOLFFE, 1993). Até o momento, poucos trabalhos mapearam esta classe de DNAs repetitivos em cromossomos de peixes neotropicais (HASHIMOTO *et al.*, 2011; PANSONATO-ALVES *et al.*, 2013a, b; SILVA *et al.*, 2013, 2014; PISCOR; PARISE-MALTEMPI, 2016; MALIMPENSA *et al.*, 2018, 2020; PUCCI *et al.*, 2018; TRALDI *et al.*, 2019).

A família multigênica das *snRNPs* (pequenas ribonucleoproteínas nucleares) incluem os genes codificantes para *snRNAs U* (pequenos RNAs ricos em uridina) e suas proteínas associadas na formação do spliceossomo. Esse complexo é responsável pelo *splicing*, um processo que promove a retirada dos íntrons (sequências não codificantes) na maturação do mRNA (NILSEN, 2003; VALADKHAN, 2005; WILL; LÜHRMANN, 2011). São encontrados dois tipos de spliceossomo em eucariotos, cada um formado por cinco *snRNAs*: o *major* spliceossomo (*U1*, *U2*, *U4*, *U5* e *U6*) que remove íntrons do tipo U2 e *minor* spliceossomo (*U11*, *U12*, *U4atac*, *U5* e *Uatac*) que remove os íntrons dependentes de U12, sendo o *snRNA U5* compartilhado em ambos os complexos (PATEL; STEITZ, 2003). Os dois spliceossomos operam de maneira semelhante e o *major* spliceossomo é a forma dominante mais encontrada em eucariotos em relação ao *minor*, o mais difícil de ser encontrado (PATEL; STEITZ, 2003; MARZ *et al.*, 2008).

O mapeamento cromossômico dos *snRNAs* participantes do *major* spliceossomo tem sido pouco explorado em peixes, sendo os genes *U1* e *U2* os mais relatados. Muitos trabalhos em peixes indicaram que eles apresentam-se conservados em apenas um ou poucos cromossomos (ÚBEDA-MANZANARO *et al.*, 2010; MERLO *et al.*, 2012; SUPIWONG *et al.*, 2013; UTSUNOMIA *et al.*, 2014; GARCÍA-SOUTO *et al.*, 2015; SCACCHETTI *et al.*, 2015b; SILVA *et al.*, 2015; PUCCI *et al.*, 2018; DULZ *et al.*, 2020; MALIMPENSA *et al.*, 2020). Ainda, já foi observado a presença de TEs nas regiões de flancos em alguns genomas, os quais contribuíram para a dispersão desses genes (CABRAL-DE-MELLO *et al.*, 2012; PUCCI *et al.*, 2018; YANO *et al.*, 2020), a co-localização entre *snRNAs* e sítios ribossômicos (MANCHADO *et al.*, 2006; ÚBEDA-MANZANARO *et al.*, 2010; YANO *et al.*, 2017, 2020; CROSS; REBORDINOS, 2005; PISCOR *et al.*, 2018; MALIMPENSA *et al.*, 2020), e também a presença de *snRNAs* em cromossomos sexuais (UTSUNOMIA *et al.*, 2014; YANO *et al.*, 2017; DULZ *et al.*, 2020).

As sequências satélites de repetições *in tandem* são geralmente organizadas em clusters e estão localizadas frequentemente em regiões centroméricas, pericentroméricas, teloméricas e subteloméricas, presentes em um ou em vários pares cromossômicos (SUMNER; 2003; THAKUR *et al.*, 2021). As sequências satélites usualmente apresentam segmentos entre 100 a 300 pb, variando entre 1.000 a 100.000 cópias no genoma (SUMNER, 2003). Os minissatélites correspondem a sequências mais curtas de aproximadamente 10 a 80 pb, ricos em GC (SNUSTAD; SIMMONS, 2013). Os microssatélites, por sua vez, são formados por repetições de 1 a 5 pb, onde a maioria apresenta repetições dinucleotídicas, sendo a AC a mais frequente

(CHISTIAKOV *et al.*, 2006). No genoma dos peixes, os microssatélites estão essencialmente localizados nas regiões heterocromáticas (telômeros, centrômeros e cromossomos sexuais), onde acredita-se que uma fração significativa dos DNAs repetitivos esteja localizada (MARTINS, 2007).

As sequências teloméricas (TTAGGG)<sub>n</sub> são localizadas nas extremidades ou regiões terminais dos cromossomos. Algumas espécies de peixes têm apresentado vestígios de sequências teloméricas localizadas longe das regiões terminais, geralmente presentes em regiões pericentroméricas ou centroméricas (OCALEWICZ, 2013), sendo chamadas de sequências teloméricas intersticiais (*Interstitial Telomeric Sites* - ITSs). Presume-se que a presença de ITS seja o resultado de fusões cromossômicas telômero-telômero, durante a evolução ou, à inserção de DNA telomérico em locais instáveis, durante o mecanismo de reparo de quebras de fita dupla de DNA (BOLZÁN, 2017). O mapeamento físico de ITS permite a detecção de rearranjos cromossômicos, muito estudado em peixes neotropicais (ROSA *et al.*, 2012; FAVARATO *et al.*, 2015; BARROS *et al.*, 2017; GLUGOSKI *et al.*, 2018).

Os TEs são sequências repetitivas capazes de se mover ou de se transpor entre sítios não homólogos ao longo do genoma (WICKER *et al.*, 2007). Os elementos de classe I ou retrotransposons (RTE) se transpõem pelo uso da enzima transcriptase reversa, promovendo a síntese de um DNA complementar a partir de uma cópia de RNA transcrita do TE, o qual se insere em um novo sítio, produzindo cópias destes RTEs (WICKER *et al.* 2007). Devido a manutenção da cópia no lugar de origem, além das cópias inseridas em novas regiões, os TEs de classe I são considerados um dos agentes responsáveis pelo aumento do tamanho do genoma de diversos organismos (FESCHOTTE; PRITHMAN, 2007). Na classe II (transposons), os elementos se inserem no genoma por meio de um intermediário de DNA (WIKER *et al.*, 2007). Podem ser elementos autônomos, os quais codificam todas as enzimas necessárias para sua transposição e não autônomos, que dependem das enzimas produzidas pelos elementos autônomos (WIKER *et al.*, 2007). A capacidade de transposição pode levar a alterações estruturais dos cromossomos e alterações na expressão gênica (CAPY *et al.*, 1998). Esses elementos levam a transições evolutivas e aumento da biodiversidade por meio de mutações gênicas, alteração no processo de regulação e geração de novos genes (BLASS *et al.*, 2012). Sabe-se que elementos transponíveis estão envolvidos na formação de rearranjos cromossômicos, formação de cromossomos sexuais, cromossomos supranumerários e associações com regiões organizadoras de nucléolo (RONs) (FERREIRA *et al.*, 2011; da

SILVA *et al.*, 2011; PORTO *et al.*, 2014; FAVARATO *et al.*, 2016; SCHEMBERGER *et al.*, 2016, 2019; GLUGOSKI *et al.*, 2018; PRIMO *et al.*, 2018; PUCCI *et al.*, 2018).

A dinâmica dos DNAs repetitivos dentro dos genomas pode levar a diferenciação cromossômica (LORSCHIEDER *et al.*, 2018; do NASCIMENTO *et al.*, 2018; DULZ *et al.*, 2019), tornando-os importantes marcadores citogenéticos que auxiliam na caracterização e evolução da ictiofauna (VICARI *et al.*, 2010). Sabe-se que os DNAs repetitivos estão envolvidos em rearranjos cromossômicos geradores de diversidade cariotípica em espécies de Loricariidae (GIULIANO-CAETANO, 1998; ROSA *et al.*, 2012; BARROS *et al.*, 2017; PRIMO *et al.*, 2017; GLUGOSKI *et al.*, 2018, 2020). Estudos evidenciaram a associação de ITSs e cópias de rDNA 5S colocalizadas em pontos de fusão Rb em espécies dos gêneros *Rineloricaria* (ROSA *et al.*, 2012; PRIMO *et al.*, 2017; GLUGOSKI *et al.*, 2018) e *Ancistrus* (FAVARATO *et al.*, 2016; BARROS *et al.*, 2017). Em *Rineloricaria*, Glugoski *et al.* (2018) caracterizaram uma sequência de rDNA 5S (denominado “rDNA 5S degenerado”), a qual apresentou um segmento parcial do TE *hAT* interno à sequência do rDNA 5S, colocalizado a um ITS, o que poderia ter contribuído para eventos de fusão Rb e diminuição do 2n na espécie estudada. Em *Ancistrus*, Barros *et al.* (2017) caracterizaram uma cópia de pseudogene do rDNA 5S (denominado “rDNA 5S.2”), em um provável sítio propenso a quebras cromossômicas. Contudo, pouco se sabe quais os tipos de DNAs repetitivos e como são originados os eventos de fissão e fusão cromossômica neste grupo de peixes. A caracterização cariotípica e mapeamento cromossômico de DNAs repetitivos em peixes do gênero *Ancistrus* podem auxiliar na compreensão dos mecanismos que levaram a diversificação cariotípica no grupo.

## 2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Sabe-se que sequências de DNA repetitivos podem compor *hotspots* para quebras cromossômicas e que os rearranjos resultantes destas quebras são responsáveis pela enorme plasticidade cromossômica presente em Loricariidae. Visto que espécies de *Ancistrus* apresentam mecanismos de redução do  $2n$ , além de inúmeros rearranjos cromossômicos estruturais, a caracterização e o mapeamento de DNAs repetitivos auxiliam no entendimento da evolução genômica desse grupo.

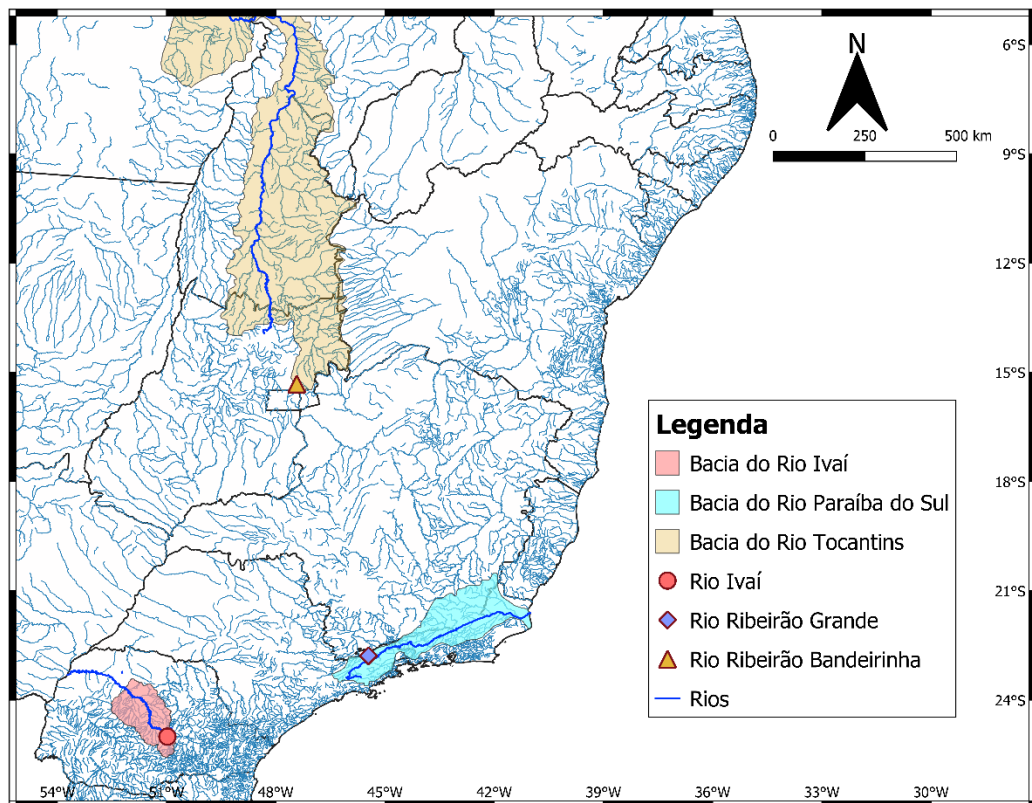
Assim, este estudo teve por objetivo a caracterização e o mapeamento da distribuição de sequências de DNAs repetitivos da família multigênica dos *snRNAs U* de maneira comparativa entre três espécies do gênero *Ancistrus* (*Ancistrus sp.*, *Ancistrus aguaboensis* e *Ancistrus cf. multispinis*), visando a compreensão da diversificação cromossômica e redução do número diploide presente nas espécies do grupo.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material biológico e locais de coleta

Foram analisados citogeneticamente 20 exemplares (10 machos e 10 fêmeas) de *Ancistrus aguaboensis* Fisch-Muller, Mazzoni, Weber, 2001 do rio Ribeirão Bandeirinha, bacia do rio Tocantins (Formosa-GO, 15°19'25" S e 47°25'26" O); 25 exemplares (13 machos e 12 fêmeas) de *Ancistrus* cf. *multispinis* Regan, 1912 do rio Ribeirão Grande, bacia do rio Paraíba do Sul (Pindamonhangaba-SP, 22°47'8" S e 45°27'19" O); e, 26 exemplares (12 machos e 14 fêmeas) de *Ancistrus* sp. do rio Ivaí, bacia do rio Ivaí (Ivaí-PR, 50°58'41.60" S e 25°0'17.9" O) (Fig. 2).

**Figura 2-** Mapa hidrográfico parcial do Brasil representando os pontos de coleta das espécies analisadas no presente estudo: *A. aguaboensis* (rio Ribeirão Bandeirinha, bacia do rio Tocantins), *A. cf. multispinis* (rio Ribeirão Grande, bacia do rio Paraíba do Sul) e *Ancistrus* sp. (rio Ivaí, bacia do rio Ivaí).



Os exemplares foram capturados com auxílio de redes de arrasto, tarrafas, peneiras e transportados vivos para o Laboratório de “Biologia Cromossômica: Estrutura & Função” da Universidade Estadual de Ponta Grossa, onde foram triados e mantidos em aquários para os



procedimentos de identificação morfológica e citogenética. A captura e transporte dos peixes na natureza está de acordo com a licença do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (licença permanente ICMBio/SISBIO: 15117-1) (Anexo 1). A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética do Uso de Animais (Processo CEUA 028/2016) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Anexo 2).

Espécimes foram depositados na Coleção Ictiológica do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupélia) da Universidade Estadual de Maringá (PR, Brasil). Números de depósito: *A. aguaboensis*, NUP 22305; *A. cf. multispinis*, NUP 22308; *Ancistrus* sp., NUP 15537.

### 3.2 Preparações cromossômicas e extração do DNA

Os cromossomos mitóticos foram obtidos de células do rim anterior por meio do método convencional *air drying*, descrito por Bertollo *et al.* (2015) (Anexo 3). Também foram retiradas amostras de fígado, as quais foram preservadas em etanol absoluto e mantidas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para posterior extração do DNA genômico total, utilizando-se o método Fenol-Clorofórmio (SAMBROOK *et al.*, 2001) (Anexo 4). Após a extração do DNA genômico, foi realizada sua quantificação com o auxílio do Espectrofotômetro *NanoVue Plus* (GE Healthcare). Em seguida, verificou-se a integridade do DNA por meio da eletroforese em gel de agarose 1%.

### 3.3 Obtenção de sequências repetitivas

O DNA genômico total de *A. aguaboensis* foi utilizado como molde em amplificações por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para obtenção dos genes *snRNAs*, utilizando-se primers específicos de *U1*, *U2*, *U4*, *U5* e *U6* sintetizados a partir do genoma de Parodontidae (AZAMBUJA *et al.*, em preparação). A reação de amplificação consistiu de 40 ng de DNA genômico; 0,2  $\mu\text{M}$  de primers *forward* e *reverse* específicos para cada *snRNA*; 0,16 mM dNTPs; 1U de *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen, Carlsbad, CA USA); 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 1x tampão de reação (200 mM Tris, pH 8.4, 500 mM KCl). O programa de amplificação consistiu nos seguintes parâmetros: 5 min –  $95^{\circ}\text{C}$  / (1 min -  $95^{\circ}\text{C}$  / 45 s –  $61^{\circ}\text{C}$  / 1 min e 30 s –  $72^{\circ}\text{C}$ ) 35 ciclos / 5 min –  $72^{\circ}\text{C}$ .

Os produtos de PCR obtidos foram isolados, purificados (kit “*PCR DNA and Gel Band Purification Kit*” - GE Healthcare) e ligados em vetor plasmidial, utilizando-se o kit *pGEM*<sup>®</sup>-

T *Easy Vector System* (Promega), de acordo com as especificações do fabricante. As ligações foram transformadas em bactérias *Escherichia coli* DH5- $\alpha$  CaCl<sub>2</sub> competentes e o DNA plasmidial das colônias recombinantes foi purificado e submetido ao sequenciamento nucleotídico na plataforma ABI-prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

As sequências foram analisadas e editadas com o auxílio do *software* Geneious 7.1.3 (KEARSE *et al.*, 2012) e, posteriormente submetidas a uma análise de identidade, utilizando-se o banco de dados *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (ALTSCHUL *et al.*, 1990), *RepeatMasker* (<http://www.repeatmasker.org>) e Rfam (KALVARI *et al.*, 2020) (<https://rfam.xfam.org>). A ferramenta RNAalifold WebServer (BERNHART *et al.*, 2008) (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAalifold.cgi>) foi utilizada para a obtenção das estruturas secundárias e a RNAcofold (BERNHART *et al.*, 2006) para estruturar a formação do heterodímero de *snRNAs U4/U6*.

### 3.4 Marcação de sondas

Os fragmentos obtidos de *snRNAs U1* (156 pb), *U2* (165 pb), *U4* (132 pb), *U5* (106 pb) e *U6* (103 pb) foram utilizados como sondas para o mapeamento físico de sequências repetitivas sobre os cromossomos, utilizando-se a técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH-*fluorescence in situ hybridization*). As sondas foram marcadas por PCR com concentrações adequadas de dNTPs e um dNTP acoplado a uma molécula repórter, a biotina 16 dUTP (Jena Bioscience) para *U1* e *U5*, e a digoxigenin 11-dUTP (Jena Bioscience) para *U2*, *U4* e *U6*, utilizando-se primers específicos de acordo com Azambuja *et al.* (em preparação) (Anexo 5).

### 3.5 Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

Lâminas contendo preparações cromossômicas foram submetidas a técnica de FISH, sob uma estringência de 70% (2,5 ng/ $\mu$ L sonda, 50% formamida, 2xSSC, 10% sulfato dextrano, 37 °C por 16 h), de acordo com o procedimento geral descrito por Pinkel *et al.* (1986) (Anexo 6). Para a detecção das sondas foram utilizados os anticorpos Streptavidina conjugada com Alexa Fluor 488 (Invitrogen) e Anti-digoxigenina conjugada com rodamina (Roche Applied Science). Os cromossomos foram contracolorados com 4',6-diamidino-2-fenil-indol (DAPI 0,2  $\mu$ g/mL), em meio de montagem Vectashield (Vector) e analisados no microscópio de epifluorescência. As imagens foram capturadas em microscópio de epifluorescência Leica (DM 2000) equipado com câmera CCD Leica DFC3000 G.

Aproximadamente 30 células com cromossomos em metáfase foram analisadas quanto às marcações por FISH, as quais foram utilizadas para a organização dos cariótipos. Os cromossomos foram recortados com o auxílio do *software* Adobe Photoshop e os cromossomos homólogos foram pareados e organizados em ordem decrescente de tamanho e, dispostos em grupos metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a), de acordo com Levan *et al.* (1964).

## 4 RESULTADOS

Os resultados da dissertação estão organizados em um capítulo correspondente ao artigo científico:

### **Caracterização molecular e análise cromossômica comparativa de *snRNAs* em espécies de *Ancistrus* (Siluriformes:Loricariidae)**

#### **Resumo**

*Ancistrus* é considerado um gênero com grande diversidade cromossômica e que apresenta uma redução do  $2n$  na maioria das espécies, quando comparadas ao  $2n = 52$  cromossomos, tido como plesiomórfico na tribo Ancistrini. Os eventos de fusão Robertsoniana (Rb), desencadeados em regiões enriquecidas com sequências repetitivas, as quais contêm sítios propensos às quebras de DNA, são considerados como prováveis causadores desta redução do  $2n$ . Além disso, outros tipos de rearranjos estruturais são responsáveis pelas mudanças morfológicas nos cromossomos, sem necessariamente alterar o  $2n$ . Entre as sequências repetitivas, a família multigênica codificante para *snRNAs* inclui genes com repetições em tandem, os quais são considerados bons marcadores para a compreensão de rearranjos cromossômicos e das relações evolutivas entre espécies próximas. Considerando-se que pouco se sabe em relação aos tipos de sequências e a origem dos eventos que geraram as alterações cromossômicas numéricas/estruturais que contribuíram para a plasticidade cariotípica encontrada em *Ancistrus*, este trabalho objetivou a caracterização nucleotídica e análise comparativa por hibridação *in situ* fluorescente de sequências repetitivas dos *snRNAs* *U* (*U1*, *U2*, *U4*, *U5* e *U6*) nos genomas de três espécies de *Ancistrus* (*Ancistrus aguaboensis*, *Ancistrus* cf. *multispinis* e *Ancistrus* sp.). Este é o primeiro relato sobre a descrição e mapeamento cromossômico de *snRNAs* em *Ancistrus*. As sequências nucleotídicas de *snRNAs* obtidas mostraram similaridade às suas cópias ortólogas em peixes, bem como as suas estruturas secundárias preditas. Nos cariótipos das três espécies analisadas, os *snRNAs* *U2* e *U5* apresentaram sequências clusterizadas e colocalizadas em um único sítio cromossômico, o *snRNA* *U1* apresentou marcação em um único par, o *snRNA* *U4* evidenciou marcações dispersas nos cromossomos, porém não foram encontradas evidências visíveis de marcações utilizando-se a sonda de *snRNA* *U6*. A não sintonia entre as marcações cromossômicas de *snRNAs* e os rDNAs, os quais já foram descritos anteriormente quanto ao envolvimento em rearranjos para as espécies, e os dados moleculares aliados aos padrões das marcações cromossômicas obtidas,

evidenciam o não envolvimento desta família multigênica nos rearranjos cromossômicos para as três espécies de *Ancistrus* analisadas.

**Palavras-chave:** DNA repetitivo; FISH; sintenia.

## Introdução

Conhecidos popularmente como “cascudos”, a família de peixes Loricariidae pertence à Ordem Siluriformes e agrupa 6 subfamílias: Delturinae, Hypoptopomatinae, Hypostominae, Lithogeninae, Loricariinae e Rhinelepininae (ARMBRUSTER, 2004; REIS *et al.*, 2006). *Ancistrus* (subfamília Hypostominae, tribo Ancistrini) é considerado um gênero de resolução taxonômica complexa devido à alta diversidade morfológica dos seus membros, além de incontáveis espécies ainda não descritas nominalmente na literatura científica (LUJAN *et al.*, 2015). Sugere-se que a condição ancestral para o 2n em Ancistrini seja de 52 cromossomos (BUENO *et al.*, 2018), condição compartilhada com seu grupo irmão Pterygoplichthyini (ARMBRUSTER, 2004). Além disso, à exceção de *Ancistrus*, estudos citogenéticos prévios evidenciaram 2n = 52 cromossomos conservado em todos os demais gêneros de Ancistrini (BUENO *et al.*, 2018).

É proposto que a partir deste 2n basal em Ancistrini ocorreram inúmeros rearranjos cromossômicos, principalmente em espécies de *Ancistrus*, as quais refletem na extensa plasticidade cariotípica presente no grupo (MARIOTTO *et al.*, 2011; FAVARATO *et al.*, 2016; BARROS *et al.*, 2017; GLUGOSKI *et al.*, 2020). Espécies de *Ancistrus* apresentam variação quanto ao número diploide (34 a 54 cromossomos) e uma notável redução do 2n via eventos de fusões cêntricas ou rearranjos Robertsonianos (Rb) na maioria das espécies (ALVES *et al.*, 2003; SOUZA, 2003; de OLIVEIRA, 2009; MARIOTTO *et al.*, 2011; RIBEIRO *et al.*, 2015; BARROS *et al.*, 2017; GLUGOSKI *et al.*, 2020). Ainda em *Ancistrus*, rearranjos cromossômicos estruturais do tipo inversão, transposição e translocação foram propostos a gerar variação da cariotípica com a manutenção do 2n em inúmeras espécies (MARIOTTO *et al.*, 2011; PRIZON *et al.*, 2016).

Estudos indicam que a alta diversidade de 2n, bem como os extensivos rearranjos cromossômicos estruturais descritos em Loricariidae podem ser desencadeados em regiões enriquecidas com sequências repetitivas contendo sítios propensos a quebras de DNA (ROSA *et al.*, 2012; BARROS *et al.*, 2017; PRIMO *et al.*, 2017; GLUGOSKI *et al.*, 2018, 2020; DEON

*et al.*, 2020). A localização *in situ* de sítios teloméricos intersticiais (*Interstitial Telomeric Sites* – ITS), por exemplo, evidenciou a associação de ITS e cópias de rDNA 5S colocalizadas em pontos de fusão Rb em espécies dos gêneros *Rineloricaria* (ROSA *et al.*, 2012; PRIMO *et al.*, 2017; GLUGOSKI *et al.*, 2018) e *Ancistrus* (FAVARATO *et al.*, 2016; BARROS *et al.*, 2017). Com esses dados, regiões internas ou adjacentes ao rDNA 5S foram propostas a atuar como *evolutionary breakpoint regions* (EBRs) nos genomas de *Rineloricaria* devido a verificação do seu reuso em eventos de quebras e rearranjos cromossômicos ocorridos no grupo (GLUGOSKI *et al.*, 2018).

As sequências repetitivas podem estar organizadas em blocos, como as famílias multigênicas, DNAs satélite, minissatélite e microssatélites; ou, podem se apresentar dispersas pelo genoma, como os elementos transponíveis – TEs (SUMNER, 2003). Nos genomas de alta plasticidade cromossômica, regiões ricas em elementos repetitivos foram descritas a apresentar EBRs e, devido à instabilidade dessas regiões, elas são consideradas *hotspots* para rearranjos cromossômicos (PEVZNER; TESLER, 2003). Essa característica essencial dos EBRs leva ao seu extenso reuso evolutivo, ou seja, quando um mesmo sítio genômico está envolvido em uma série de *double strand breaks* (DSBs) e rearranjos cromossômicos em um grupo de espécies próximas (RUIZ-HERRERA *et al.*, 2006).

A família multigênica codificante para *snRNAs* incluem os genes *U1*, *U2*, *U4*, *U5* e *U6* em seu componente ribonucleoproteico principal, denominado *major spliceossomo* (PATEL; STEITZ, 2003). O complexo ribonucleoproteico spliceossomo participa do processo de *splicing* do pré-mRNA, essencial para a maturação dos mRNAs (NILSEN, 2003; VALADKHAN, 2005; WILL; LÜHRMANN, 2011). Além de sua função celular, os *snRNAs* são considerados bons marcadores para a compreensão de rearranjos cromossômicos e das relações evolutivas entre espécies próximas (MERLO *et al.*, 2010; ÚBEDA-MANZANARO *et al.*, 2010; CABRAL-DE-MELLO *et al.*, 2012; UTSUNOMIA *et al.*, 2014).

Estudos de localização *in situ* dos *snRNAs* têm sido pouco explorados em peixes, mas os dados presentes para os *snRNAs* *U1* e *U2* demonstraram apenas um ou poucos loci cromossômicos (SUPIWONG *et al.*, 2013; UTSUNOMIA *et al.*, 2014; GARCÍA-SOUTO *et al.*, 2015; SCACCHETTI *et al.*, 2015b; SILVA *et al.*, 2015; PISCOR *et al.*, 2018; PONZIO *et al.*, 2018). Ainda, é proposto que a presença de TEs flanqueando as sequências *snRNAs* contribuiu com sua dispersão em alguns genomas (CABRAL-DE-MELLO *et al.*, 2012; PUCCI *et al.*, 2018; YANO *et al.*, 2020). A co-localização entre genes *snRNAs* e sítios ribossômicos

também já foi relatada em cariótipos de peixes (MANCHADO *et al.*, 2006; ÚBEDA-MANZANARO *et al.*, 2010; YANO *et al.*, 2017, 2020; CROSS; REBORDINOS, 2005; PISCOR *et al.*, 2018; MALIMPENSA *et al.*, 2020), bem como a presença de *snRNAs* em cromossomos sexuais (UTSUNOMIA *et al.*, 2014; YANO *et al.*, 2017; DULZ *et al.*, 2020).

Embora regiões enriquecidas por DNAs repetitivos sejam propensas a desencadear quebras cromossômicas, pouco se sabe em relação aos tipos de sequências e a origem dos eventos de alterações cromossômicas numéricas e estruturais que levaram a plasticidade cariotípica encontrada em *Ancistrus*. Nesse sentido, o objetivo principal deste estudo foi de caracterizar sequências pertencentes às famílias *snRNAs* de *Ancistrus* e utilizá-las no mapeamento cariotípico, buscando compreender mecanismos que possam estar associados aos eventos de evolução cromossômica no gênero.

## Material e Métodos

### *Material biológico e locais de coleta*

Foram analisados citogeneticamente 71 exemplares pertencentes à três espécies de *Ancistrus*, sendo: 20 exemplares (10 machos e 10 fêmeas) de *Ancistrus aguaboensis* Fisch-Muller, Mazzoni, Weber, 2001 do rio Ribeirão Bandeirinha, bacia do rio Tocantins (Formosa-GO, 15°19'25" S e 47°25'26" O); 25 exemplares (13 machos e 12 fêmeas) de *Ancistrus* cf. *multispinis* Regan, 1912 do rio Ribeirão Grande, bacia do rio Paraíba do Sul (Pindamonhangaba-SP, 22°47'8" S e 45°27'19" O); e, 26 exemplares (12 machos e 14 fêmeas) de *Ancistrus* sp. do rio Ivaí, bacia do rio Ivaí (Ivaí-PR, 50°58'41.60" S e 25°0'17.9" O). A captura e transporte dos peixes na natureza está de acordo com a licença do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (licença permanente ICMBio/SISBIO: 15117-1). A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética do Uso de Animais (Processo CEUA 028/2016) da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Espécimes foram depositados na Coleção Ictiológica do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupélia) da Universidade Estadual de Maringá (PR, Brasil) (números de depósito: *A. aguaboensis*, NUP 22305; *A. cf. multispinis*, NUP 22308; *Ancistrus* sp., NUP 15537).

### *Preparação cromossômica e obtenção de sequências repetitivas*

Os cromossomos mitóticos foram obtidos de acordo com Bertollo *et al.* (2015). O DNA genômico total de *A. aguaboensis* foi extraído a partir do fígado, pelo método Fenol-Clorofórmio (SAMBROOK *et al.*, 2001), e utilizado como molde em amplificações por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para obtenção dos *snRNAs*, utilizando-se *primers* específicos para os genes *U1*, *U2*, *U4*, *U5* e *U6* sintetizados a partir do genoma de Parodontidae (AZAMBUJA *et al.*, em preparação). A reação de amplificação consistiu de 40 ng de DNA genômico; 0,2 µM de *primers forward* e *reverse* específicos para cada *snRNA*; 0,16 mM dNTPs; 1U de *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen, Carlsbad, CA USA); 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1x tampão de reação (200 mM Tris, pH 8,4, 500 mM KCl). O programa de amplificação utilizou os parâmetros: 5 min – 95 °C / (1 min - 95 °C / 45 s – 61 °C / 1 min e 30 s – 72 °C) 35 ciclos / 5 min – 72 °C.

Os produtos de PCR obtidos foram isolados, purificados (kit “*PCR DNA and Gel Band Purification Kit*” - GE Healthcare) e clonados em vetor plasmidial pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector System Kit (Promega), de acordo com as especificações dos fabricantes. As ligações foram transformadas em bactérias *Escherichia coli* DH5-α competentes e o DNA plasmidial das colônias recombinantes foi purificado e submetido ao sequenciamento nucleotídico na plataforma ABI-prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As sequências foram analisadas e editadas com o auxílio do *software* Geneious 7.1.3 (KEARSE *et al.*, 2012) e, posteriormente submetidas a análises de identidade nos bancos de dados *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (ALTSCHUL *et al.*, 1990), Rfam (KALVARI *et al.*, 2020) e *RepeatMasker* (<http://www.repeatmasker.org>). A ferramenta RNAalifold WebServer (BERNHART *et al.*, 2008) (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAalifold.cgi>) foi utilizada para a obtenção das estruturas secundárias e a RNACofold (BERNHART *et al.*, 2006) para estruturar a formação do heterodímero de *snRNAs U4/U6*.

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

Os fragmentos obtidos de *snRNAs U1* (156 pb), *U2* (165 pb), *U4* (132 pb), *U5* (106 pb) e *U6* (103 pb) foram utilizados como sondas para o mapeamento físico de sequências repetitivas sobre os cromossomos, utilizando-se a técnica de FISH. As sondas foram marcadas por PCR com concentrações adequadas de dNTPs e um dNTP acoplado a uma molécula repórter, a biotina 16 dUTP (Jena Bioscience) para *U1* e *U5*, e a digoxigenin 11-dUTP (Jena Bioscience)



para *U2*, *U4* e *U6*, utilizando-se primers específicos de acordo com Azambuja *et al.* (em preparação).

Lâminas contendo as preparações cromossômicas foram submetidas a técnica de FISH, sob uma estringência de 70% (2,5 ng/μL sonda, 50% formamida, 2xSSC, 10% sulfato dextrano, 37 °C por 16 h), de acordo com o procedimento geral descrito por Pinkel *et al.* (1986). Para a detecção das sondas foram utilizados os anticorpos Streptavidina conjugada com Alexa Fluor 488 (Invitrogen) e Anti-digoxigenina conjugada com rodamina (Roche *Applied Science*). Os cromossomos foram contracorados com 4',6-diamidino-2-fenil-indol (DAPI 0,2 μg/mL), em meio de montagem Vectashield (Vector) e analisados no microscópio de epifluorescência. As melhores metáfases foram fotografadas em microscópio de epifluorescência Leica (DM 2000) equipado com câmera CCD Leica DFC3000 G.

Aproximadamente 30 células com cromossomos em metáfase foram analisadas quanto às marcações por FISH para cada sonda e espécime utilizado neste estudo. As melhores imagens foram selecionadas e os cromossomos homólogos foram pareados e organizados em ordem decrescente de tamanho e, dispostos em grupos metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelo-cêntricos (st) e acrocêntricos (a), de acordo com Levan *et al.* (1964).

## Resultados

### *Caracterização cariotípica*

Como descrito anteriormente por Glugoski *et al.* (2020), o cariótipo de *A. aguaboensis* apresentou  $2n = 50$  cromossomos e fórmula cariotípica de  $16m + 10sm + 4st + 20a$ , enquanto *A. cf. multispinis* apresentou  $2n = 52$  cromossomos e fórmula cariotípica  $16m + 10sm + 6st + 20a$ . Já *Ancistrus* sp. apresentou  $2n = 50$  cromossomos e fórmula cariotípica de  $20m + 12sm + 6st + 12a$ , como descrito previamente por Barros *et al.* (2017). As três espécies não apresentam heteromorfismo de cromossomos sexuais.

### *Caracterização das sequências*

A sequência obtida de *snRNA U1* (*GenBank accession* no. MZ613969) de 156 pb apresentou 87,90% de identidade ao *snRNA U1* de *Maylandia zebra* (Perciformes, Cichlidae)

(*GenBank accession* no. XR\_003024848.1), além de um *e-value* 1.2e-25 ao *U1 spliceosomal RNA* (Rfam Id: RF00003; Tabela 1)

**Tabela 1.** Dados obtidos para as sequências dos *snRNAs U1, U2, U4, U5 e U6*, utilizando-se o programa Rfam.

Amplicon	Família	Acesso	Início	Fim	Bit score	E-value
U1 156 pb	U1 spliceosomal RNA	RF00003	1	156	95.6	1.2e-25
U2 165 pb	U2 spliceosomal RNA	RF00004	1	165	140.6	2.4e-31
U2 1,131 pb	U2 spliceosomal RNA	RF00004	1	185	169.8	1.8e-37
	U5 spliceosomal RNA	RF00020	554	668	76.3	1.8e-12
	U2 spliceosomal RNA	RF00004	973	1,131	143.2	4.6e-31
U4 132 pb	U4 spliceosomal RNA	RF00015	1	132	101.3	6.5e-24
U4 267 pb	U4 spliceosomal RNA	RF00015	1	132	101.3	6.5e-24
	U4 spliceosomal RNA	RF00015	137	267	94.9	2.9e-22
U5 106 pb	U5 spliceosomal RNA	RF00020	1	106	72.9	9e-13
U6 103 pb	U6 spliceosomal RNA	RF00026	1	103	85.9	3.9e-22

A partir da PCR, utilizando-se *primers* para o *snRNA U2*, foram obtidos 2 amplicons de tamanhos diferentes (165 e 1131 pb). A sequência de *U2* de 165 pb (*GenBank accession* no. MZ613970) apresentou 92,68% de identidade com o *snRNA U2* de *Anguilla anguilla* (Anguilliformes, Anguillidae) (*GenBank accession* no. XR\_004763517.1), além de um *e-value* de 2.4e-31 ao *U2 spliceosomal RNA* (Rfam Id: RF00004; Tabela 1). Já a sequência de 1131 pb (Fig. 3) apresentou dois fragmentos de *snRNA U2* (intervalos 1 – 185 pb e 973 – 1131 pb) com 92,18% e 93,12% de identidade, respectivamente, com o *snRNA U2* de *Anguilla anguilla* (*GenBank accession* no. XR\_004763517.1), além de *e-values* de 1.8e-37 e 4.6e-31 ao *U2 spliceosomal RNA* (Rfam Id: RF00004; Tabela 1). No intervalo (554 – 668 pb) dessa sequência, e entre os segmentos *U2*, foi detectada a ocorrência do *snRNA U5* (Fig. 3). Essa sequência apresentou 91,35% de identidade ao *snRNA U5* de *Astyanax paranae* (Characiformes, Characidae) (*GenBank accession* no. MG963291.1) e um *e-value* de 1.8e-12 ao *U5 spliceosomal RNA* (Rfam Id: RF00020; Tabela 1).

A sequência de *snRNA U4* (*GenBank accession* no. MZ613971) de 132 pb apresentou 98,48% de identidade ao *snRNA U4* de *Etheostoma cragini* (Perciformes, Percidae) (*GenBank accession* no. XR\_004657755.1), além de um *e-value* 6.3e-24 ao *U4 spliceosomal RNA* (Rfam

Id: RF00015; Tabela 1). Uma segunda sequência de 267 pb, obtida com os *primers* de *U4*, apresentou duas cópias do *snRNA U4* (1-132 pb e 137-267 pb) com poucos pares de bases relativos ao NTS (Fig. 4). Os fragmentos apresentaram 98,48% e 96,95% de identidade ao *snRNA U4* de *Etheostoma cragini* (Perciformes, Percidae) (*GenBank accession* no. XR\_004657755.1) e um *e-value* 6.5e-24 e 2.9e-22 ao *U4 spliceosomal RNA* (Rfam Id: RF00015; Tabela 1), respectivamente.

O *snRNA U5* (*GenBank accession* no. MZ613972) (106 pb) apresentou 98,11% de identidade com o gene de *Electrophorus electricus* (Gymnotiformes, Gymnotidae) (*GenBank accession* no. XR\_003411487.2) e tem *e-value* 9e-13 ao *U5 spliceosomal RNA* (Rfam Id: RF00020; Tabela 1). Já *snRNA U6* (*GenBank accession* no. MZ613973) de 103 pb mostrou 97,09% de identidade ao *snRNA U6* de *Pygocentrus nattereri* (Characiformes, Characidae) (*GenBank accession* no. XR\_005129150.1) e mostrou um *e-value* 3.9e-22 ao *U6 spliceosomal RNA* (Rfam Id: RF00026; Tabela 1). Na base de dados *RepeatMasker*, os fragmentos de DNA analisados foram similares aos respectivos *snRNAs* e não evidenciaram a presença de TEs em suas sequências.

As sequências dos *snRNAs U* obtidas de *A. aguaboensis* se apresentaram incompletas, sendo que as sequências completas dos genes de *Ancistrus* foram obtidas a partir do alinhamento dos *snRNAs* de *A. aguaboensis* com as sequências das espécies neotropicais *Apareindon* sp, *Colossoma macropomum* e *Pygocentrus nattereri* (Fig. 5), as quais foram utilizadas na obtenção das estruturas secundárias preditas e putativamente funcionais destes *snRNAs* (Fig. 6). As estruturas secundárias obtidas a partir desses alinhamentos demonstraram estruturas com formações de quatro stem-loops para os *snRNAs U1* (164 pb) e *U2* (191 pb) (Fig. 6A). Para o *snRNA U4* (141 pb), a estrutura obtida demonstrou um longo stem-loop, já para o *snRNA U5* (116 pb) houve a formação de três stem-loops e para o *snRNA U6* (107 pb) um stem-loop, um stem e alguns loops (Fig. 6A). Foi possível observar também o emparelhamento correto entre os *snRNAs U4/U6* (Fig. 6B).

#### *Localização in situ das sondas de snRNAs*

A localização *in situ* do *snRNA U1* em cromossomos de *Ancistrus* sp. revelou um sítio na região subterminal do braço longo no par sm 14 (Fig. 7A). Em *A. aguaboensis*, foi detectado um sítio cromossômico marcado na região subterminal do braço longo no par sm 10 (Fig. 7B), mesmo padrão de marcação observado em *A. cf. multispinis* (Fig. 7C).

As sondas de *snRNA U2* e *U5* mostraram marcações co-localizadas nos cromossomos das três espécies analisadas: blocos na região pericentromérica do braço curto do par sm 11 em *Ancistrus* sp. (Fig. 7A); na região pericentromérica do braço curto do par st 15 em *A. aguaboensis* (Fig. 7B); e, sítio na região subterminal do braço curto do par st 14 em *A. cf. multispinis* (Fig. 7C).

As marcações para a sonda de *snRNA U4* foram encontradas dispersas em vários pares de cromossomos nas três espécies de *Ancistrus*, bem como foi possível identificar acúmulos de sinais em alguns pares nas regiões terminais, subterminais, pericentroméricas e regiões intersticiais dos braços longos em cromossomos metacêntricos, submetacêntricos, subtelo-cêntricos e acrocêntricos (Fig. 8).

Por meio da técnica de FISH, não foi possível detectar marcações nos cromossomos das três espécies analisadas ao se utilizar a sonda para *snRNA U6*.

## Discussão

As sequências *non-coding* RNAs podem apresentar baixa conservação entre cópias ortólogas, o que inúmeras vezes dificulta seu reconhecimento baseado apenas em similaridade de bases (KALVARI *et al.*, 2018). No entanto, as análises de sequências nucleotídicas dos *snRNAs U* pertencentes ao complexo *major* spliceossomo em *Ancistrus* mostraram identidade destes genes acima de 87% e baixos valores de *e-value* com seus ortólogos de outros genomas de peixes, o que as credenciam como putativamente funcionais. As estruturas secundárias preditas, obtidas a partir dos alinhamentos nucleotídicos entre as sequências de *snRNAs* de *A. aguaboensis* com as das espécies de *Apareindon* sp (AZAMBUJA *et al.*, em preparação), *Colossoma macropomum* e *Pygocentrus nattereri*, se mostraram conservadas em relação àquelas esperadas para peixes (MARZ *et al.*, 2008). A conservação da organização das estruturas, com presença de stem-loops e loops, além do correto pareamento de *U4/U6*, necessário no momento de *splicing*, corroboram com a putativa funcionalidade desses *snRNAs*.

Poucos são os estudos que relataram a organização dos clusters *snRNA U* nos genomas de peixes, mas os dados obtidos até o momento indicam prevalência de clusters individualizados para cada família gênica (AZAMBUJA *et al.*, em preparação), além de alguns relatos da formação de clusters com duas famílias, como *U1* e *U2* (MARZ *et al.*, 2008; GARCÍA-SOUTO *et al.*, 2015) e *U2* e *U5* (MERLO *et al.*, 2010, 2012), ou até mesmo com as

três famílias *U1*, *U2* e *U5* (MANCHADO *et al.*, 2006), embora nenhuma vantagem evolutiva para a formação desses clusters tenha sido descrita até o momento. Em *Ancistrus*, as sequências *snRNA U2* e *U5* apresentaram-se clusterizadas, assim como observado nos genomas de *Pygocentrus nattereri* (Assembly accession GCF\_015220715.1) e *Astyanax mexicanus* (Assembly accession GCF\_000372685.2), entre outros. Os dados de localização *in situ* demonstraram a ocorrência do cluster *snRNA U2-U5* colocalizados nos cromossomos, além de sítio individualizado para o *snRNA U1* nos cariótipos de *Ancistrus* sp., *A. aguaboensis* e *A. cf. multispinis*.

As espécies de *Ancistrus* analisadas neste trabalho possuem  $2n = 50$  (*A. aguaboensis* e *Ancistrus* sp.) e  $2n = 52$  cromossomos (*A. cf. multispinis*) (BARROS *et al.*, 2017; GLUGOSKI *et al.*, 2020). Em *Ancistrus* sp., a diminuição do  $2n$  foi atribuída a um evento de fusão Rb, evidenciado por um ITS colocalizado a um pseudogene do rDNA 5S no par 1 metacêntrico (BARROS *et al.*, 2017). De modo similar, acredita-se que em *A. aguaboensis* a diminuição do  $2n$  também seja resultante de uma fusão Rb mediada pela ocorrência de um sítio de rDNA 5S em região proximal do par 2 metacêntrico, porém sem vestígios de ITS (GLUGOSKI *et al.*, 2020). Em outra via, *A. cf. multispinis* é proposto ter o  $2n = 52$  cromossomos conservado, porém com alguns eventos de rearranjos cromossômicos estruturais em seu cariótipo (GLUGOSKI *et al.*, 2020).

Apesar da maior prevalência de clusters individualizados, alguns genes *snRNA U* já foram detectados em arranjos sintênicos à família gênica do rRNA 5S em alguns genomas de peixes. Experimentos de localização *in situ* detectaram a sintenia do *snRNA U2* ao rDNA 5S nos cromossomos de espécies de peixes, os quais apresentaram-se em sítios cromossômicos adjacentes (SCACHETTI *et al.*, 2015; YANO *et al.*, 2017; MALIMPENSA *et al.*, 2018, 2020). Já em um estudo com a caracterização de sequências, a família gênica *snRNA U1* foi visualizada sintênica e intercalada a cópias do rDNA 5S nos genomas de espécies de *Triportheus*, evento considerado específico para a linhagem, decorrente de transposição *snRNA U1* mediada por TEs (YANO *et al.*, 2020). Porém, os sítios de *snRNAs U* localizados nos cariótipos aqui analisados não são sintênicos aos sítios rDNAs 5S e 45S mapeados previamente por Glugoski *et al.* (2020) nos cromossomos de *A. aguaboensis* e *A. cf. multispinis*, e por Barros *et al.* (2017) nos cromossomos de *Ancistrus* sp. Dessa forma, ao menos nestas três espécies avaliadas, as famílias *snRNAs U1*, *U2*, *U4*, *U5* e *U6* não estão envolvidas nos eventos de quebras e rearranjos cromossômicos, já relatados anteriormente, que ocorreram na diversificação cariotípica das espécies de *Ancistrus*.

A proposição do não envolvimento das famílias *snRNAs U1, U2 e U5* nos rearranjos cromossômicos propostos para *Ancistrus* sp., *A. aguaboensis* e *A. cf. multispinis* também é corroborada pela localização em prováveis cromossomos homeólogos. Nas três espécies analisadas, os sítios de *snRNA U1* ficaram restritos a posição subterminal de um único par sm aparentemente homeólogo. De modo similar, o cluster de *snRNAs U2-U5* foi localizado em único sítio cromossômico no braço curto de um par subtelocêntrico/submetacêntrico, provavelmente homeólogos entre as três espécies. Esses dados corroboram diversos trabalhos em peixes e indicam que genes *snRNA*, em sua maioria, encontram-se concentrados em um ou poucos pares cromossômicos em diferentes grupos, como Characidae (SILVA *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2017; PISCOR *et al.*, 2018), Gymnotidae (UTSONOMIA *et al.*, 2014), Moronidae (MERLO *et al.*, 2010), Bagridae (SUPIWONG *et al.*, 2013), Crenuchidae (PUCCI *et al.*, 2018), Merlucciidae (GARCÍA-SOUTO *et al.*, 2015), Cyprinodontidae (ARAYA-JAIME *et al.*, 2017), Cichlidae (CABRAL-DE-MELLO *et al.*, 2012), Anostomidae (DULZ *et al.*, 2020) e Pimelodidae (MALIMPENSA *et al.*, 2018, 2020).

Porém, múltiplos lócos para os *snRNAs U1 e U2* já foram relatados nos genomas de algumas espécies de peixes (ÚBEDA-MANZANARO *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2015; DULZ *et al.*, 2020). Usualmente, a localização em múltiplos sítios ou sítios dispersos de famílias multigênicas é atribuída por mecanismos de transposição mediada por TEs, presentes em suas regiões *non-transcribed sequences* (NTS) (REBORDINOS *et al.*, 2013; GLUGOSKI *et al.*, 2018; MALIMPENSA *et al.*, 2020; YANO *et al.*, 2020). Os *snRNAs* podem ser alvos de retrotransposição quando seus transcritos são reconhecidos e movidos pela maquinaria de retrotransposons, como o retrotransposon LINE-1 (L1), por exemplo, como já relatado em mamíferos (GARCIA-PEREZ *et al.*, 2007; DOUCET *et al.*, 2015). Segundo Marz *et al.* (2008), os *snRNAs* se comportariam como elementos móveis no contexto genômico, uma vez que a sintenia com seus genes de flanco não permanecem conservados ao longo da escala de tempo evolutiva dos metazoários e, além disso, percebe-se que *snRNAs* são frequentemente fundadores de família de pseudogenes. A presença de cópias defectivas e pseudogenes de *snRNAs* já foi observada antes para peixes em *Apareiodon* sp. (AZAMBUJA *et al.*, em preparação). Os pseudogenes podem ser divididos em unitários e duplicados, quando são derivados diretamente de sequência de DNA e mantêm seus elementos reguladores, ou em pseudogenes processados, que são formados pela retrotransposição de transcritos de mRNA (LI *et al.*, 2013). O fragmento de 267 pb amplificado com primers de *snRNA U4* a partir de *A. aguaboensis* apresentou duas cópias adjacentes de *U4* separadas por uma região NTS curta,

sem a presença das sequências promotoras necessárias para a transcrição de *snRNAs*, demonstrando assim, um indício da formação de pseudogenes por retrotransposição em *Ancistrus*. A retrotransposição de *U4* poderia ser o indicativo das marcações dispersas encontradas nas três espécies. Ainda, os sítios de marcação observados para essa família, embora diferentes entre as espécies, não estavam em lugares suspeitos de possíveis rearranjos estruturais de cromossomos.

A análise das sequências obtidas dos *snRNAs U1, U2, U4, U5 e U6* não retornaram similaridade para TEs e a ausência dos mesmos em regiões gênicas dos *snRNAs U1, U2 e U5* corroboram para a conservação de sítios cromossômicos em *Ancistrus*. As sequências NTS destes genes, bem como suas adjacências, ainda necessitam de uma investigação mais apurada para uma confirmação do mecanismo envolvido para a formação de pseudogenes de *snRNA U4*, bem como a confirmação de genes funcionais.

Em peixes Neotropicais, o estudo de localização cromossômica dos *snRNAs U4 e U6* é restrito para os cariótipos de algumas espécies da família Parodontidae (AZAMBUJA *et al.*, em preparação). Nesse grupo, sítios *snRNA U4* foram envolvidos em quebras e rearranjos cromossômicos, enquanto o *snRNA U6* apresentou localização em cromossomos homeólogos (AZAMBUJA *et al.*, em preparação). Nas três espécies de *Ancistrus* aqui avaliadas não foram observados sinais de marcações cromossômicas utilizando-se a sonda de *snRNA U6*, o que poderia ser atribuído ao seu baixo número de cópias nos clusters, indetectáveis pelo procedimento de hibridização (KRETSCHMER *et al.*, 2018). Em outra via, a ocorrência de cópias dispersas ao longo de todo o genoma não pode ser descartada.

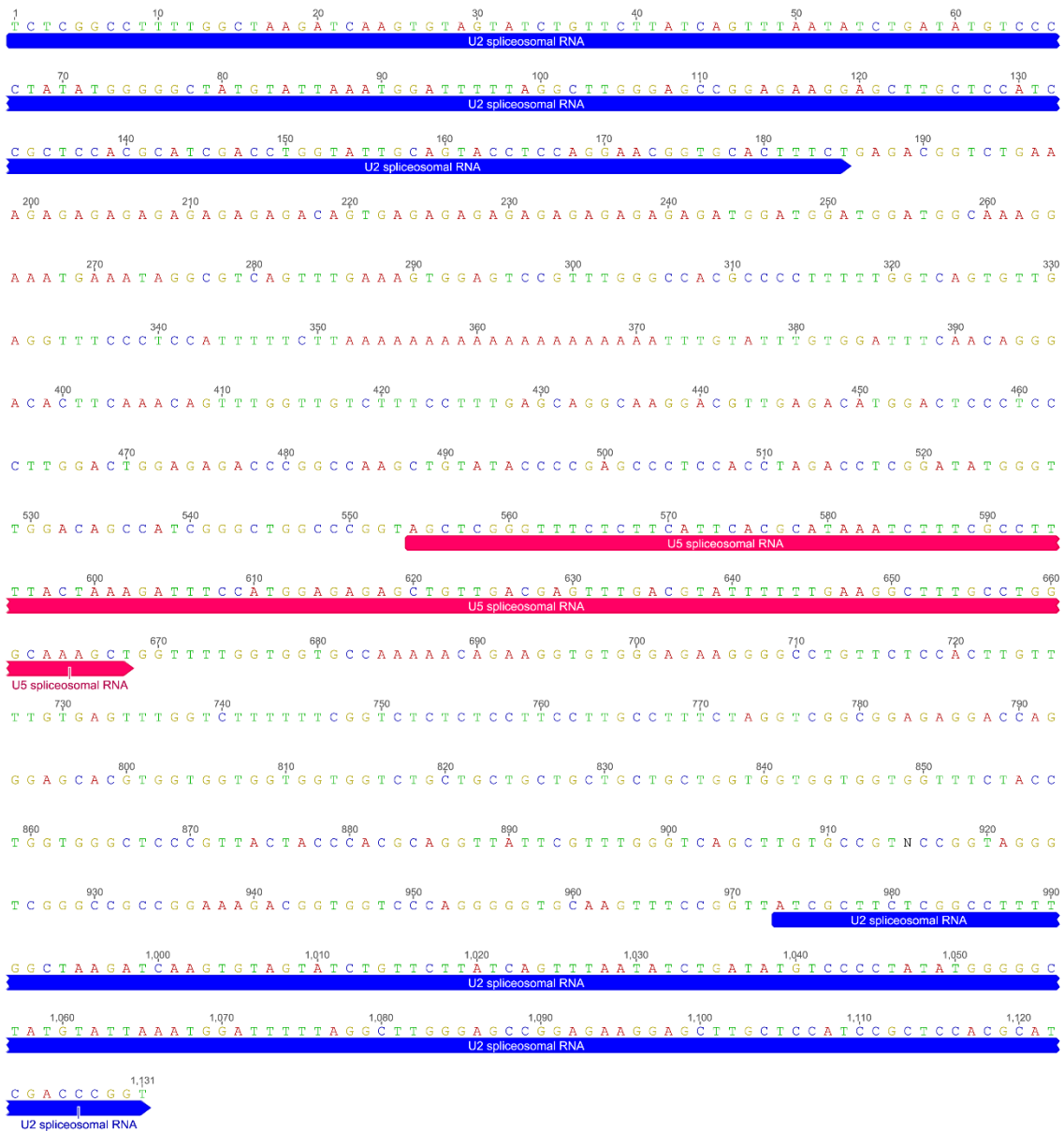
A enorme plasticidade cariotípica encontrada em espécies de Loricariidae é decorrente de quebras e rearranjos cromossômicos oriundos em regiões enriquecidas de DNAs repetitivos (PRIMO *et al.*, 2018; GLUGOSKI *et al.*, 2018, 2020; DEON *et al.*, 2020), especialmente no gênero *Ancistrus* (MARIOTTO *et al.*, 2011; FAVARATO *et al.*, 2016; BARROS *et al.*, 2017; GLUGOSKI *et al.*, 2020). Este é o primeiro estudo de caracterização de sequências e localização *in situ* de *snRNAs* em espécies de *Ancistrus*. As sequências nucleotídicas dos *snRNAs U* pertencentes ao complexo *major* spliceossomo obtidas aqui para *Ancistrus*, bem como suas estruturas secundárias, se mostraram putativamente funcionais. Os dados moleculares e cromossômicos aqui obtidos demonstraram a clusterização *U2-U5* nos genomas de *Ancistrus*, sítios cromossômicos únicos de *U1* e sinais dispersos de *U4* sobre os cromossomos. O padrão de marcação para os *snRNAs U1, U2, U4 e U5*, bem como a

conservação em prováveis cromossomos homeólogos dentro do gênero e a não sintonia entre essas famílias aos rDNAs, já descritos anteriormente como participativos dos eventos de fusões cêntricas, evidenciam que os *snRNAs* não estão envolvidos em rearranjos cromossômicos descritos para *Ancistrus* sp., *A. aguaboensis* e *A. cf. multispinis*.

## **Conclusão**

Em conclusão, os dados obtidos neste estudo não indicaram uma associação entre a família multigênica dos *snRNAs* e os rearranjos cromossômicos geradores da diversidade cariotípica presente em *Ancistrus*. Tidos como “pontos de quebra evolutiva” na família Loricariidae, visto a verificação do seu reuso em eventos de quebras e rearranjos cromossômicos, os rDNAs mostraram-se não sintênicos às sondas de *snRNAs* analisadas.

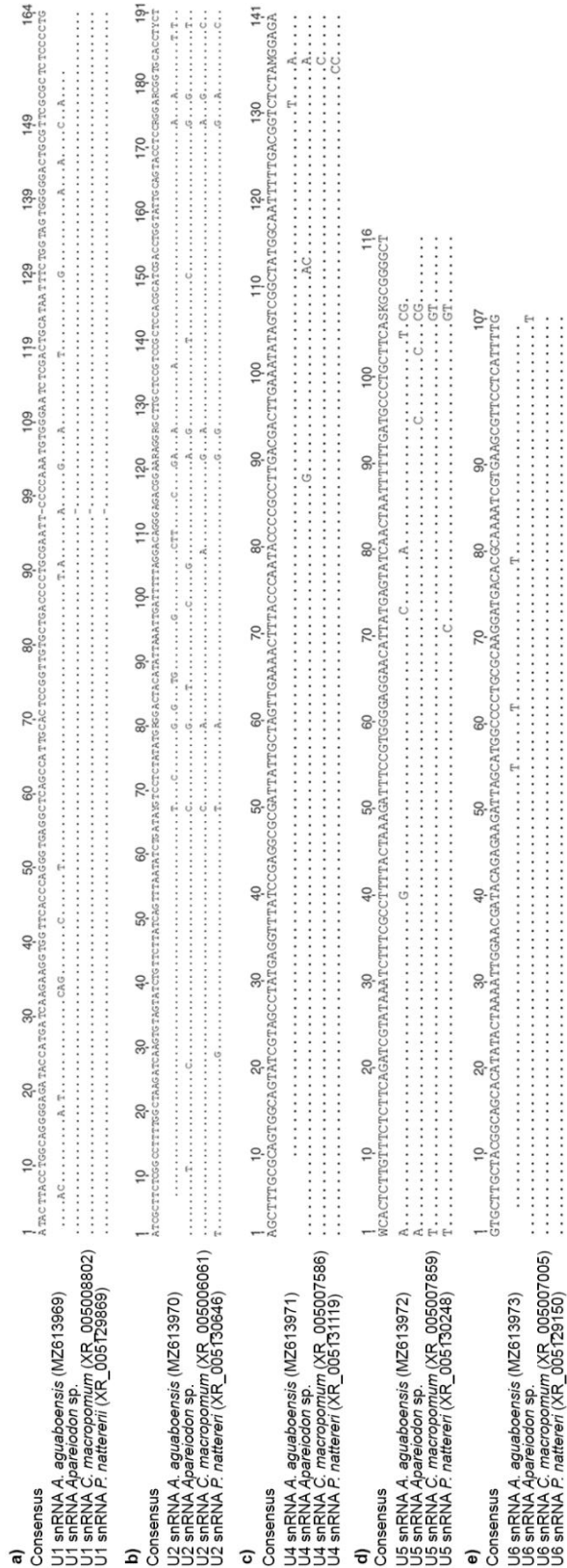




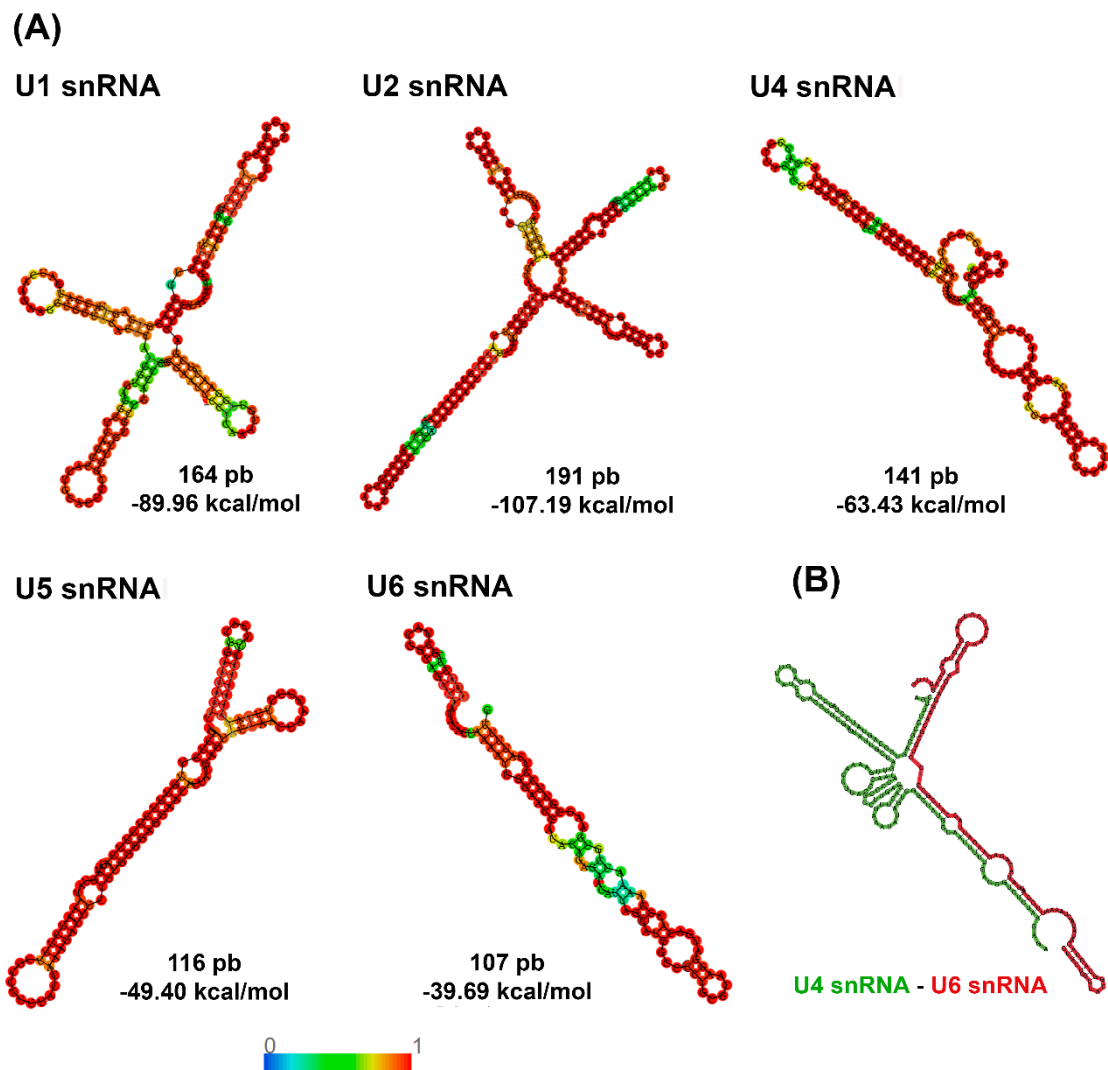
**Figura 3-** Sequência de 1131 pb, contendo o cluster *snRNA* U2-U5, obtida a partir do genoma de *A. aguaboensis*. Sequências *snRNA* U2 em azul e *snRNA* U5 em rosa. As regiões 186-553 pb e 669-972 pb compreendem as sequências espaçadoras NTS.



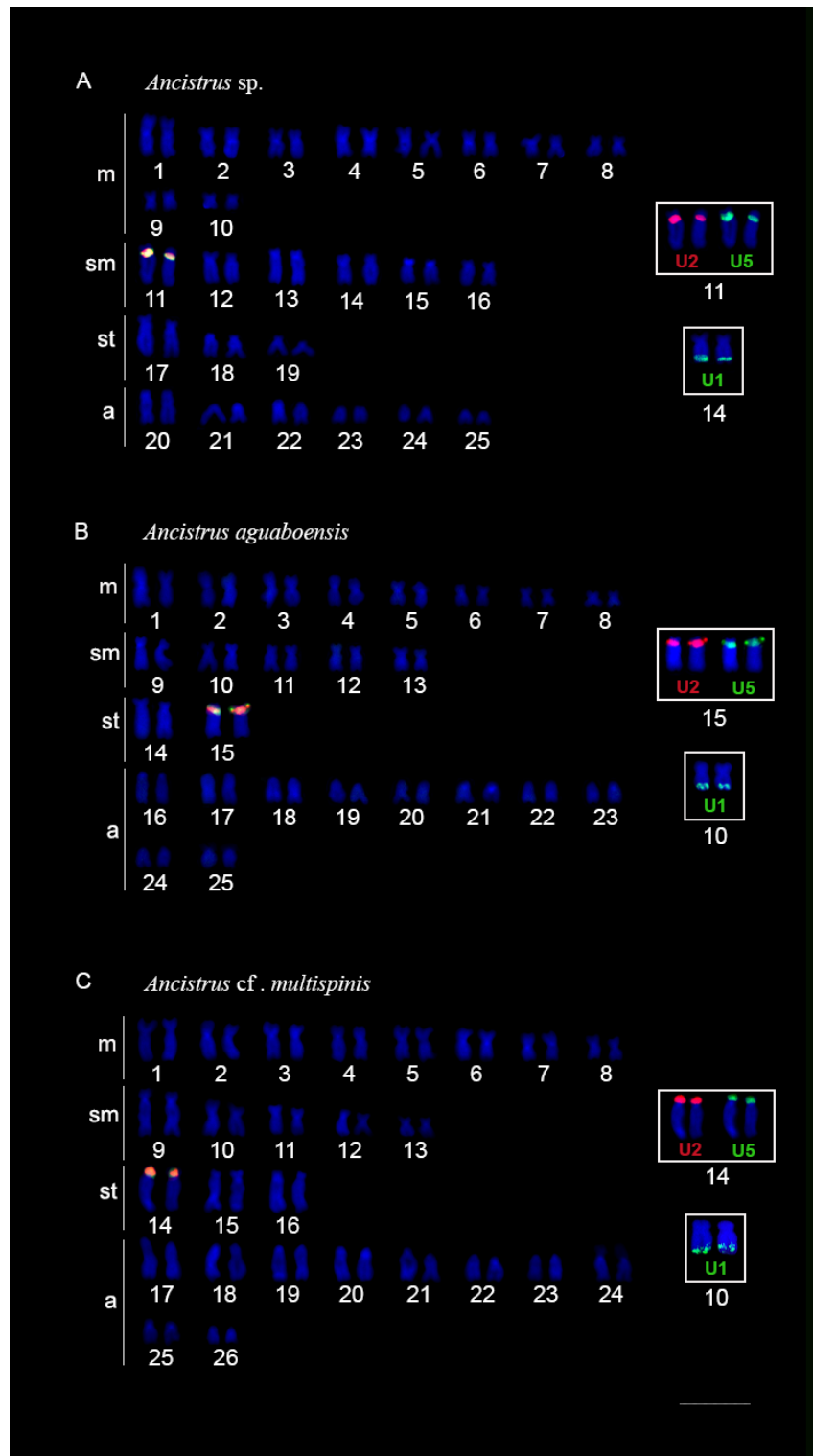
**Figura 4-** Sequência de 267 pb contendo duas cópias adjacentes de *snRNA U4*, obtida a partir do genoma de *A. aguaboensis*. Sequências *snRNA U4* em vermelho (1-132 pb e 137-267 pb). A região 133-136 pb compreende a sequência espaçadora NTS.



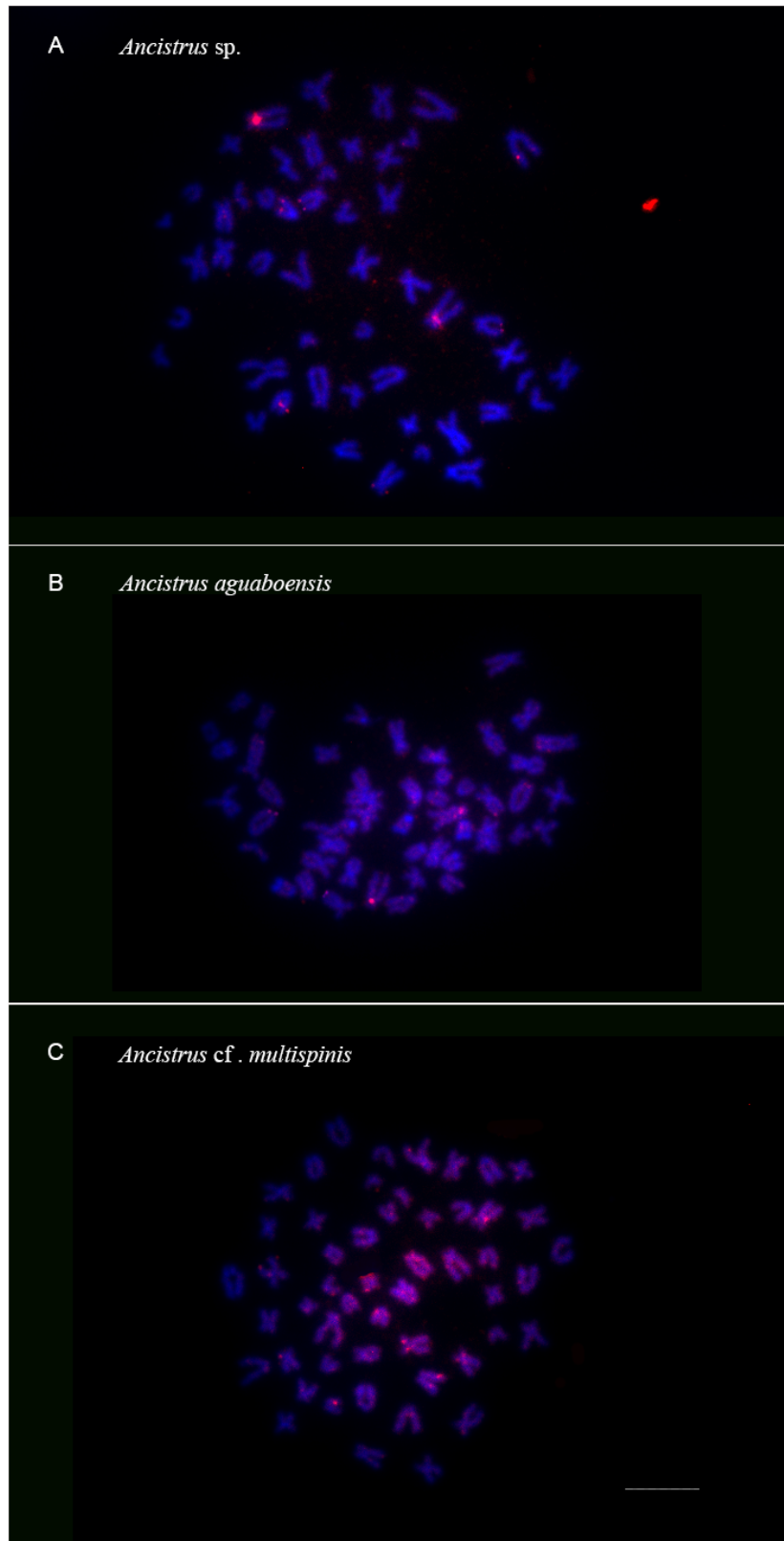
**Figura 5-** Alinhamentos das sequências completas dos *snRNAs* U1 164 pb (a), U2 191 pb (b), U4 141 pb (c), U5 116 pb (d) e U6 107 pb (e), obtidas a partir de *A. aguaboensis.*, *Apareiodon* sp, *Colossoma macropomum* e *Pygocentrus nattereri*.



**Figura 6-** Predição das estruturas secundárias dos *snRNAs* *U1*, *U2*, *U4*, *U5* e *U6*. Em (A) estruturas com escala de cor para probabilidade do pareamento dos pares de bases (em destaque), onde o vermelho representa a máxima e azul a mínima, tamanho de cada sequência e energia livre. Em (B) pareamento do complexo *U4/U6*, participantes da estrutura do spliceossomo.



**Figura 7-** Cariótipos de *Ancistrus* sp. (A), *A. aguaboensis* (B) e *A. cf. multispinis* (C) submetidos a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) empregando-se a sonda da sequência *snRNAs U1* (em verde) e a *double FISH* com as sondas de *U2* (em vermelho) e *U5* (em verde). Em destaque (caixas), estão evidenciados os pares cromossomos portadores das marcações individualizadas. Barra = 10  $\mu$ m.



**Figura 8-** Metáfases cromossômicas de *Ancistrus* sp. (A), *A. aguaboensis* (B) e *A.* cf. *multispinis* (C) submetidos a localização fluorescente *in situ*, empregando-se sonda de *snRNA* U4 (em vermelho). Barra = 10  $\mu$ m.

## REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- ALVES, L. A.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Karyotype variability in eight species of the subfamilies Loricariinae and Ancistrinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). **Caryologia**, v. 56, n. 1, p. 57-63, 2003.
- ALVES, A. L.; OLIVEIRA, C.; NIRCHIO, M.; GRANADO, A.; FORESTI, F. Karyotypic relationships among the tribes of Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae) with description of XO sex chromosome system in a Neotropical fish species. **Genetica**, v. 128, p. 1-9, 2006.
- ARAYA-JAIME, C.; LAM, N.; PINTO, I. V.; MÉNDEZ, M. A.; ITURRA, P. Chromosomal organization of four classes of repetitive DNA sequences in killifish *Orestias ascotanensis* Parenti, 1984 (Cyprinodontiformes, Cyprinodontidae). **Comparative Cytogenetics**, v. 11, n. 3, p. 463-475, 2017.
- 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. 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, p. 1-76, 2008.
- ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A. C. Trends in the karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). **Hereditas**, v. 134, n. 3, p. 201-210, 2001.
- ARTONI, R. F.; VICARI, M. R.; ALMEIDA, M. A.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C. Karyotype diversity and fish conservation of southern field from south Brazil. **Reviews in Fish Biology and Fish**, v. 19, n. 3, p. 393-401, 2009.
- BARROS, A. V.; WOLSKI, M. A. V.; NOGAROTO V.; ALMEIDA, M. C.; MOREIRA-FILHO, O.; VICARI, M. R. Fragile sites, dysfunctional telomere and chromosome fusions: What is 5S rDNA role? **Gene**, v. 608, p. 20-27, 2017.
- BERNHART, S. H.; TAFER, H.; MÜCKSTEIN, U.; FLAMM, C.; STADLER, P. F.; HOFACKER, I. L. Partition function and base pairing probabilities of RNA heterodimers. **Algorithms for Molecular Biology**, v. 1, n. 3, 2006.
- BERNHART, S. H.; HOFACKER, I. L.; WILL, S.; GRUBER, A. R.; STADLER, P. F. RNAalifold: improved consensus structure prediction for RNA alignments. **BMC Bioinformatics**, v. 9, n. 474, 2008.
- BERRA, T. M. Freshwater fish distribution. **Academic Press**. London, 2001.
- BERTOLLO, L. A. C.; CIOFFI, M. B.; MOREIRA-FILHO, O. Direct chromosome preparation from freshwater teleost fishes. In: OZOUF-COSTAZ, C.; PISANO, E.; FORESTI, F.; ALMEIDA TOLEDO, L. F. **Fish cytogenetic techniques (Ray- Fin Fishes and Chondrichthyans)**. 2. ed. Enfield USA: CRC Press, 2015. p. 21-26.

- BLASS, E.; BELL M.; BOISSINOT, S. Accumulation and rapid decay of non-LTR retrotransposons in the genome of the three-spine stickleback. **Genome Biology and Evolution**, v. 4, n. 5, p. 687–702, 2012.
- BOLZÁN, A. D. Interstitial telomeric sequences in vertebrate chromosomes: origin, function, instability and evolution. **Mutation Research**, v. 773, p. 51-65, 2017.
- BRUSCHI, D. P.; RIVERA, M.; LIMA, A. P.; ZÚÑIGA, A. B.; RECCO-PIMENTEL, S. M. Interstitial Telomeric Sequences (ITS) and major rDNA mapping reveal insights into the karyotypical evolution of Neotropical leaf frogs species (Phyllomedusa, Hylidae, Anura). **Molecular Cytogenetics**, v. 7, n. 22, p. 1-12, 2014.
- BUENO, D.; PALACIOS-GIMENEZ, O. M.; CABRAL-DE-MELLO, D. C. Chromosomal Mapping of Repetitive DNAs in the Grasshopper *Abracris flavolineata* Reveal Possible Ancestry of the B Chromosome and H3 Histone Spreading. **Plos One**, v. 8, n. 6, p. 1-8, 2013.
- 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**, v. 15, n. 5, p. 492-503, 2018.
- BUCK, S.; SAZIMA, I. An assemblage of mailed catfishes (Loricariidae) in southeastern Brazil: distribution, activity, and feeding. **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v. 6, p. 325– 332, 1995.
- 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 Research**, v. 20, n. 2, p. 279–292, 2012.
- CAPY P.; BAZIN C.; HIGUET, D.; LANGIN, T. Dynamics and Evolution of Transposable Elements. **Landes Bioscience/Chapman & Hall**, v. 197, 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, n. 1, p. 43-41, 2013.
- CHARLESWORTH B.; SNIEGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, v. 371, n. 6494, p. 215-220, 1994.
- CHISTIAKOV, D. A.; HELLEMANS, B.; VOLCKAERT, F. A. M. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. **Aquaculture**, v. 255, n. 1-4, p.1 1-29, 2006.
- CROSS, I.; REBORDINOS, L. 5S rDNA and U2 snRNA are linked in the genome of *Crassostrea angulata* and *Crassostrea gigas* oysters: does the (CT)<sub>n</sub>(GA)<sub>n</sub> microsatellite stabilize this novel linkage of large tandem arrays? **Genome**, v. 48, n. 6, p. 1116-1119, 2005.
- DEON, G. A.; GLUGOSKI, L.; VICARI, M. R.; NOGAROTO, V.; SASSI, F. de M. C.; Cioffi, M. de B.; LIEHR, T.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Highly Rearranged Karyotypes and Multiple Sex Chromosome Systems in Armored Catfishes from the Genus *Harttia* (Teleostei, Siluriformes). **Genes**, v. 11, n. 11, p. 1366, 2020.
- DÍAZ-CASTILLO, C. Junk DNA contribution to evolutionary capacitance can drive species dynamics. **Evolutionary Biology**, v. 44, n. 2, p. 190-205, 2017.



- DOUCET, A. J.; DROC, G.; SIOL, O.; AUDOUX, J.; GILBERT, N. U6 snRNA Pseudogenes: Markers of Retrotransposition Dynamics in Mammals. **Molecular Biology and Evolution**, v. 32, n. 7, p. 1815-1832, 2015.
- DULZ, T. A.; LORSCHIEDER, C. A.; NASCIMENTO, V. D.; NOLETO, R. B.; MOREIRA-FILHO, O.; NOGAROTO, V.; VICARI, M.R. Comparative cytogenetics among *Leporinus friderici* and *Leporellus vittatus* populations (Characiformes, Anostomidae): focus on repetitive DNA elements. **Comparative Cytogenetics**, v. 13, n. 2, p. 105-120, 2019.
- DULZ, T. A.; AZAMBUJA, M.; NASCIMENTO, V. D.; LORSCHIEDER, C. A.; NOLETO, R. B.; MOREIRA-FILHO, O.; NOGAROTO, V.; DINIZ, D.; AFFONSO, P. R. A. de M.; VICARI, M. R. Karyotypic Diversification in Two *Megaleporinus* Species (Characiformes, Anostomidae) Inferred from In Situ Localization of Repetitive DNA Sequences. **Zebrafish**, v. 17, n. 5, p. 333-341, 2020.
- FAVARATO, R. M.; da SILVA, M.; de 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, n. 2, p. 103-111, 2015.
- 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. **The Journal of Heredity**, v. 108, p. 254-261, 2016.
- FESCHOTTE, C.; PRITHAM, E. J. DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. **Annual Review of Genetics**, v. 41, n. 1, p. 331-368, 2007.
- FERRARIS JR, C. J. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of Siluriform primary types. **Zootaxa**, v. 1418, n. 1, p. 1-628, 2007.
- FERREIRA, D. C.; PORTO-FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. FORESTI, F. Transposable elements as a potential source for understanding the fish genome. **Mobile Genetic Elements**, v. 1, n. 2, p. 112-117, 2011.
- FRICKE, R.; ESCHMEYER, W. N; FONG, J. D. Species by family/subfamily in Eschmeyer's Catalog of Fishes. Disponível em: <<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>> Acesso em: 25 jun. 2021.
- GARCIA-PEREZ, J. L.; DOUCET, A. J.; BUCHETON, A.; MORAN, J. V.; GILBERT, N. Distinct mechanisms for trans-mediated mobilization of cellular RNAs by the LINE-1 reverse transcriptase. **Genome Research**, v. 17, n. 5, p. 602-6011, 2007.
- GARCÍA-SOUTO, D.; TRONCOSO, T.; PÉREZ, M. Molecular Cytogenetic Analysis of the European Hake *Merluccius merluccius* (Merlucciidae, Gadiformes): U1 and U2 snRNA Gene Clusters Map to the Same Location. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, p. 1-12, 2015.
- GE, S. X. Exploratory bioinformatics investigation reveals importance of “junk” DNA in early embryo development. **BMC genomics**, v. 18, n. 1, p. 1-19, 2017.
- GEERINCKX, T.; HERREL, A.; ADRIAENS, D. Suckermouth armored catfish resolve the 1073 paradox of simultaneous respiration and suction attachment: a kinematic study of *Pterygoplichthys disjunctivus*. **Journal of Experimental Biology**, v. 315, n. 3, p. 121–131, 2011.

- GIULIANO-CAETANO, L. Polimorfismo cromossômico Robertsoniano em populações de *Rineloricaria latirostris* (Pisces, Loricariinae). PhD Thesis, Universidade Federal de São Carlos. 78. p. 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.
- GLUGOSKI L.; DEON, G.; SCHOTT, S.; VICARI, M. R.; NOGAROTO, V.; MOREIRA-FILHO, O. Comparative cytogenetic analyses in *Ancistrus* species (Siluriformes: Loricariidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 18, n. 2, p. 1-16, 2020.
- GREGORY, T. R. Synergy between sequence and size in Large-scale genomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, n. 9, p. 699-708, 2005.
- GREGORY, T. R.; NICOL, J. A.; TAMM, H.; KULLMAN, B.; KULLMAN, K.; LEITCH, I. J.; MURRAY, B. G.; KAPRAUN, D. F.; GREILHUBER, J.; BENNETT, M. D. Eukaryotic genome size databases. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p. D332– D338, 2007.
- HASHIMOTO, D. T.; FERGUSON-SMITH, M. A.; RENS, W.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. Chromosome mapping of H1 histone and 5S rRNA gene clusters in three species of *Astyanax* (Teleostei, Characiformes). **Cytogenetics and Genome Research**, v. 134, n. 1, p. 64–71, 2011.
- HAYES, J. J.; WOLFFE, A. P. Preferential and asymmetric interaction of linker histones with 5S DNA in the nucleosome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 14, p. 6415-6419, 1993.
- ISBRUCKER, I. J. H.; NIJSSEN, H. Sexualdimorphismus bei Harnischwelsen (Loricariidae). **Harnischwelse**, p. 19–33, 1992.
- KALVARI, I.; NAWROCKI, E. P.; ARGASINSKA, J.; QUINONES-OLIVEIRA, N.; FINN, R. D.; BATEMAN, A.; PETROV, A. I. Non-coding RNA analysis using the Rfam database. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 62, e51, 2018.
- KALVARI, I.; NAWROCKI, E. P.; ONTIVEROS-PALACIOS, N.; ARGASINSKA, J.; LAMKIEWICZ, K.; MARZ, M.; GRIFFITHS-JONES, S.; TOFFANO-NIOCHE, C.; GAUTHERET, D.; WEINBERG, Z.; RIVAS, E.; EDDY, S. R.; FINN, R. D.; BATEMAN, A.; PETROV, A. I. Rfam 14: expanded coverage of metagenomic, viral and microRNA families. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. 1, p. D192-D200, 2020.
- KAVALCO, K. F.; PAZZA, R.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). **Heredity**, v. 94, n. 2, p. 180-186, 2005.
- KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARKOWITZ, S.; DURAN, C.; THIERER, T.; ASHTON, B.; MEINTJES, P.; DRUMMOND, A. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647-1649, 2012.
- KIDWELL, M. G. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. **Genetica**, v. 115, n. 1, p. 49-63, 2002.

- KONERAT, J. T.; BUENO, V. MARGARIDO, V. P.; PORTELA-CASTRO, A. L. B.; MARTINS-SANTOS, I. C. Diversity of Sex Chromosome Systems in Ancistrini (Loricariidae, Hypostominae): ZZ/ZW in *Ancistrus taunayi* Miranda Ribeiro, 1918. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 146, n. 4, p. 306-310, 2015.
- KRETSCHMER, R.; de OLIVEIRA, T. D.; FURO, I. O.; SILVA, F. A. O.; GUNSKI, R. J.; GARNERO, A. V.; CIOFFI, M. B.; de OLIVEIRA, E. H. C.; de FREITAS, T. R. O. Repetitive DNAs and shrink genomes: A chromosomal analysis in nine Columbidae species (Aves, Columbiformes). **Genetics and Molecular Biology**, v. 41, n. 1, p. 98-106, 2018.
- LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, v. 52, n. 2, p. 201-220, 1964.
- LI, W.; YANG, W.; WANG, X. J. Pseudogenes: pseudo or real functional elements? **Journal of Genetics and Genomics**, v. 40, n. 4, p. 171-177, 2013.
- LONG, E. O.; DAWID, I. D. Repeated genes in eukaryotes. **Annual Review of Biochemistry**, v.49, n. 1, p. 727-764, 1980.
- LÓPEZ, H. L.; MIQUELARENA, A. M. Los Hypostominae (Pisces: Loricariidae) de Argentina. In: de CASTELLANOS, Z. A. **Fauna de Agua Dulce de la Republica Argentina**. La Plata: PROFADU, 1991. p. 1-64.
- LORSCHIEDER, C. A.; OLIVEIRA, J. I. N.; DULZ, T. A.; NOGAROTO, V.; MARTINS-SANTOS, I. C.; VICARI, M. R. Comparative cytogenetics among three sympatric *Hypostomus* species (Siluriformes: Loricariidae): an evolutionary analysis in a high endemic region. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 61, p. 1-14, 2018.
- LOWER, S. E.; DION-CÔTÉ, A.; CLARK, A. G.; BARBASH, D. A. Special Issue: Repetitive DNA Sequences. **Genes**, v. 10, n. 11, p. 896-898, 2019.
- LUJAN, N. K.; ROACH, K. A.; JACOBSEN, D.; WINEMILLER, K. O.; VARGAS, V. M.; CHING, V. R.; MAESTRE, J. A. Aquatic community structure across an Andes-to-Amazon fluvial gradient. **Journal Biogeography**, v. 40, n. 9, p. 1715-1728, 2013.
- LUJAN, N. K.; ARMBRUSTER, J. W.; LOVEJOY, N. R.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ 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.
- MALABARBA, L. R.; MALABARBA, M. C. Phylogeny and classification of Neotropical fish. **Biology and Physiology of Freshwater Neotropical Fish**, p. 1-19, 2020.
- MALIMPENSA, G. C.; TRALDI, J. B.; TOYAMA, D.; HENRIQUE-SILVA, F.; VICARI, M. R.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal mapping of repeat DNA in *Bergiaria westermanni* (Pimelodidae, Siluriformes): localization of 45S rDNA in B chromosomes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 154, n. 2, p. 99-106, 2018.
- MALIMPENSA, G. de C.; TRALDI, J. B.; MARTINEZ, J. de F.; DEON, G.; AZAMBUJA, M.; NOGAROTO, V.; VICARI, M. R.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal Diversification in Two Species of *Pimelodus* (Siluriformes: Pimelodidae): Comparative Cytogenetic Mapping of Multigene Families. **Zebrafish**, v. 17, n. 4, p. 278-286, 2020.
- MANCHADO, M.; ZUASTI, E.; CROSS, I.; MERLO, A.; INFANTE, C.; REBORDINOS, L. Molecular characterization and chromosomal mapping of the 5S rRNA gene in *Solea*

*senegalensis*: A new linkage to the U1, U2, and U5 small nuclear RNA genes. **Genome**, v. 49, p. 79-86, 2006.

MARIOTTO, S.; ARTONI, R. F.; MIYAZAWA, C. S. Occurrence of sexual chromosome, of the type ZZ/ZW in *Ancistrus cf. dubius* (Loricariidae, Ancistrinae) of the Paraguay River Basin, Mato Grosso, Brazil. **Caryologia**, v. 57, n. 4, p. 327-331, 2004.

MARIOTTO, S.; MIYAZAWA, C. S. *Ancistrus cf. dubius* (Siluriformes, Ancistrinae), a complex of species. 1. Chromosomal characterization of four populations and occurrence of sexual chromosomes of type XX/XY, in the Pantanal basin of Mato Grosso, Brazil. **Caryologia**, v. 59, n. 4, p. 299-304, 2006.

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, n. 4, p. 595-600, 2009.

MARIOTTO, S.; CENTOFANTE, L.; VICARI, M.; ARTONI, R.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal diversification in ribosomal DNA sites in *Ancistrus* Kner, 1854 (Loricariidae, Ancistrini) from three hydrographic basins of Mato Grosso, Brazil. **Comparative Cytogenetics**, v. 5, n. 4, p. 289-300, 2011.

MARTINS, C. Chromosomes and repetitive DNA: a contribution to the knowledge of the fish genome. In: PISANO, E.; OZOUF-COSTAZ, C.; FORESTI, F.; KAPPOR, B. G. **Fish cytogenetics**. Enfield: Science Publisher, 2007. p. 421-453.

MARZ, M.; KIRSTEN, T.; STADLER, P. Evolution of spliceosomal snRNA genes in metazoan animals. **Journal of Molecular Evolution**, v. 67, n. 6, p. 594-607, 2008.

MAXON, R.; COHN, R.; KEDES, L.; MOHUN, T. Expression and organization of histone genes. **Annual Review of Genetics**, v. 17, n. 1, p. 239-77, 1983.

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 & Genetic Systems**, v. 85, n. 5, p. 341-349, 2010.

MERLO, M.; PACCHIARINI, T.; PORELA-BENS, S.; CROSS, I.; MANCHADO, M.; REBORDINOS, L. Genetic characterization of *Plectorhynchus mediterraneus* yields important clues about genome organization and evolution of multigene families. **BMC Genetics**, v. 13, n. 1, p. 33, 2012.

do NASCIMENTO, V. D.; COELHO, K. A.; NOGAROTO, V.; de ALMEIDA, R. B.; ZIEMNICZAK, K.; CENTOFANTE, L.; PAVANELLI, C. S.; TORRES, R. A.; MOREIRA-FILHO, O.; VICARI, M. R. Do multiple karyomorphs and population genetics of freshwater darter characines (*Apareiodon affinis*) indicate chromosomal speciation? **Zoologischer Anzeiger**, v. 272, p. 93-103, 2018.

NEI, M.; ROONEY, A. P. Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. **Annual Review of Genetics**, v. 39, n. 1, p. 121-152, 2005.

NILSEN, T. W. The spliceosome: the most complex macromolecular machine in the cell? **Bioessays**, v. 25, n. 12, p. 1147-1149, 2003.

OCALEWICZ, K.; FURGALA-SELEZNIOW, G.; SZMYT, M.; LISBOA, R.; KUCINSKI, M.; LEJK, A. M.; JANKUN, M. Pericentromeric location of the telomeric DNA sequences on the European grayling chromosomes. **Genetica**, v. 141, n. 10-12, p. 409-416, 2013.

- OHNO, S. So much “junk” DNA in our genome. In: SMITH, H. H. **Evolution of Genetic Systems**. New York: Gordon and Breach, 1972. p. 366–370.
- de OLIVEIRA, R. R.; SOUZA, I. L.; VENERE, P. C. Karyotype description of three species of Loricariidae (Siluriformes) and occurrence of the ZZ/ZW sexual system in *Hemiancistrus spilomma* Cardoso & Lucinda, 2003. **Neotropical Ichthyology**, v. 4, n. 1, p. 93-97, 2006.
- de OLIVEIRA, R. R.; FELDBERG, E.; ANJOS, M. B.; ZUANON, J. Karyotype characterization and ZZ/ZW sex chromosome heteromorphism in two species of the catfish genus *Ancistrus* Kner, 1854 (Siluriformes: Loricariidae) from the Amazon basin. **Neotropical Ichthyology**, v. 5, n. 3, p. 301-06, 2007.
- de OLIVEIRA, R. R.; FELDBERG, E.; ANJOS, M. B.; ZUANON, J. Occurrence of multiple sexual chromosomes (XX/XY 1 Y 2 and Z1 Z1 Z2 Z2/Z1 Z2 W1 W2) in catfishes of the genus *Ancistrus* (Siluriformes: Loricariidae) from the Amazon basin. **Genetica**, v. 134, n. 2, p. 243-49, 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, n. 9, p. 2209-2225, 2009.
- de OLIVEIRA, R. R.; FELDBERG, E.; dos ANJOS, M. B.; ZUANON, J. Karyotype characterization and ZZ/ZW sex chromosome heteromorphism in two species of the catfish genus *Ancistrus* Kner, 1854 (Siluriformes: Loricariidae) from the Amazon basin. **Neotropical Ichthyology**, v. 5, n. 3, p. 301-306, 2018.
- PANSONATO-ALVES, J. C.; HILSDORF, A. W. S.; UTSUNOMIA, R.; SILVA, D. M. Z. A.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. 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, 2013a.
- PANSONATO-ALVES, J. C.; SERRANO, E. A.; UTSUNOMIA, R.; SCACCHETTI, P. C.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. 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, 2013b.
- PATEL, A.; STEITZ, J. Splicing double: insights from the second spliceosome. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 4, n. 12, p. 960-970, 2003.
- PATHAK, D.; ALI, S. Repetitive DNA: A Tool to Explore Animal Genomes/Transcriptomes. In: GERMANA, M.; PETRERA, F. **Functional genomics**. InTech, p. 155–180, 2012.
- PETY, A. M.; CARDOSO, A. L.; 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, n. 3, p. 263-269, 2018.
- PEVZNER, P.; TESLER, G. Genome rearrangements in mammalian evolution: lessons from human and mouse genomes. **Genome Research**, v. 13, n. 1, p. 37-45, 2003.
- de PINNA, M. C. C. Phylogenetic relationships of Neotropical Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi): historical overview and synthesis of hypotheses. p. 279-330. In: Malabarba, L. R.; Reis, R. E.; Vari, R. P.; Lucena, Z. M.; Lucena, C. A. S. **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 1998. p. 603.

- PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 9, p. 2934-2938, 1986.
- PISCOR, D.; PARISE-MALTEMPI, P. P. Chromosomal mapping of H3 histone and 5S rRNA genes in eight species of *Astyanax* (Pisces, Characiformes) with different diploid numbers: syntenic conservation of repetitive genes. **Genome**, v. 59, n. 3, p. 167-172, 2016.
- 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, n. 1, p. 1-7, 2018.
- PONZIO, J. C.; PISCOR, D.; PARISE-MALTEMPI, P. P. Chromosomal locations of U2 snDNA clusters in *Megaleporinus*, *Leporinus* and *Schizodon* (Characiformes: Anostomidae). **Biologia**, v. 73, n. 3, p. 295-298, 2018.
- PORTO, F. E.; GINDRI, B. S.; VIEIRA, M. M. V.; BORIN, L. A.; PORTELA-CASTRO, A. L. B.; MARTINS-SANTOS, I. C. Polymorphisms of the nucleolus organizing regions in *Loricaria cataphracta* (Siluriformes, Loricariidae) of the upper Paraguay River basin indicate an association with transposable elements. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 1, p. 1627-1634, 2014.
- PRIMO, C. C.; GLUGOSKI, L.; ALMEIDA, M. C.; ZAWADZKI, H. C.; MOREIRA-FILHO, O.; VICARI, M. R.; NOGAROTO, V. Mechanisms of chromosomal diversification in species of *Rineloricaria* (Actinopterygii: Siluriformes: Loricariidae). **Zebrafish**, v. 14, n. 2, p. 161-68, 2017.
- PRIMO, C. C.; GLUGOSKI, L.; VICARI, M. R.; NOGAROTO, V. Chromosome Mapping and Molecular Characterization of the *Tc1/Mariner* Element in *Rineloricaria* (Siluriformes: Loricariidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 61, p. 1-7, 2018.
- PRIZON, A. C.; BORIN-CARVALHO, L. A.; BRUSCHI, D. P.; RIBEIRO, M. O.; BARBOSA, L. M.; FERREIRA, G. E. B.; CIUS, A.; ZAWADZKI, C. H.; PORTELA-CASTRO, A. L. B. Cytogenetic data on *Ancistrus* sp. (Siluriformes, Loricariidae) of the Paraguay River basin (MS) sheds light on intrageneric karyotype diversification. **Comparative Cytogenetics**, v. 10, n. 4, p. 625-636, 2016.
- PRIZON, A. C.; BRUSCHI, D. P.; BORIN-CARVALHO, L. A.; CIUS, A.; BARBOSA, L. M.; RUIZ, H. B.; ZAWADZKI, C. H.; FENOCCHIO, A. S.; PORTELA-CASTRO, A. L. de BRITO. Hidden Diversity in the Populations of the Armored Catfish *Ancistrus* Kner, 1854 (Loricariidae, Hypostominae) from the Paraná River Basin Revealed by Molecular and Cytogenetic Data. **Frontiers in Genetics**, v. 8, n. 185, p. 1-13, 2017.
- PUCCI, M. B.; NOGAROTO, V.; MOREIRA-FILHO, O.; VICARI, M. R. 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.
- RÁB, P.; YANO, C. F.; LAVOUÉ, S.; JEGEDE, O. I.; BERTOLLO, L. A. C.; EZAZ, T.; MAJTÁNOVÁ, Z.; de OLIVEIRA, E. A.; CIOFFI, M. B. Karyotype and Mapping of Repetitive DNAs in the African Butterfly Fish *Pantodon buchholzi*, the Sole Species of the Family Pantodontidae. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 149, n. 4, p. 312-320, 2016.
- REBORDINOS, L.; CROSS, I.; MERLO, A. High evolutionary dynamism in 5S rDNA of fish: state of the art. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 141, n. 2-3, p. 103-13, 2013.

- REIS, R. E.; PEREIRA, E. H. L.; ARMBRUSTER, J. A. 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.
- RIBEIRO, M. O.; NOLETO, R. B.; LORSCHIEDER, C. A.; PORTO, F. E.; PRIZON, A. C.; ZAWADZKI, C. H.; OLIVEIRA, L. C.; PORTELA CASTRO, A. L. B. Cytogenetic description of *Ancistrus abilhoai* (Siluriformes: Loricariidae) from Iguaçú River basin, southern Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 2, p. 4051-4057, 2015.
- RODILES-HERNANDEZ, R.; HENDRICKSON, D. A.; LUNDBERG, J. G.; HUMPHRIES, J. M. *Lacantunia enigmatica* (Teleostei: Siluriformes) a new and phylogenetically freshwater fish from Mesoamerica. **Zootaxa**, v. 1000, n. 1, p. 1-24, 2005.
- ROSA, K. O.; ZIEMNICZAK, K.; de BARROS, A. V.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M. C.; CESTARI, M. M.; ARTONI, R. F.; VICARI, M. R. Numeric and structural chromosome polymorphism in *Rineloricaria lima* (Siluriformes: Loricaridae) fusion points carrying 5S rDNA or telomere sequence vestiges. **Reviews in Fish Biology Fisheries**, v. 22, n. 3, p. 739-749, 2012.
- RUIZ-HERRERA, A.; CASTRESANA, J.; ROBINSON, T. J. Is mammalian chromosomal evolution driven by regions of genome fragility? **Genome Biology**, v. 7, n. 12, p. 1-16, 2006.
- SABAJ, M. H.; ARMBRUSTER, J. W.; PAGE, L. M. Spawning in *Ancistrus* with comments on the evolution of snout tentacles as a novel reproductive strategy: larval mimicry. **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v. 10, p. 217-229, 1999.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Molecular cloning, a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SANTOS, A. R. D.; USSO, M. C.; GOUVEIA, J. G.; ARAYA-JAIME, C.; FRANTINE-SILVA, W.; GIULIANO-CAETANO L.; FORESTI, F.; DIAS, A. L. Chromosomal mapping of repetitive DNA sequences in the genus *Bryconamericus* (Characidae) and DNA barcoding to differentiate populations. **Zebrafish**, v. 14, n. 3, p. 261-71, 2017.
- SCACCHETTI, P. C.; UTSUNOMIA, R.; PANSONATO-ALVES, J.; VICARI, M. R.; ARTONI R.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in *Characidium* (Teleostei, Characiformes): genomic organization and diversification of ZW sex chromosomes. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 146, n. 2, p. 136-143, 2015a.
- SCACCHETTI, P. C.; UTSUNOMIA, R.; PANSONATO-ALVEZ, J. C.; da COSTA SILVA, G. J.; VICARI, M. R.; ARTONI, R. F.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Repetitive DNA Sequences and Evolution of ZZ/ZW Sex Chromosomes in *Characidium* (Teleostei: Characiformes). **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, p. 1-13, 2015b.
- SCHEMBERGER, M. O.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M. C.; ARTONI, R. F.; VALENTE, G. T.; MARTINS, C.; MOREIRA-FILHO, O.; CESTARI, M. M.; VICARI, M. R. Sequence analyses and chromosomal distribution of the *Tc1/Mariner* element in Parodontidae fish (Teleostei: Characiformes). **Gene**, v. 593, n. 2, p. 308-314, 2016.
- SCHEMBERGER, M. O.; NASCIMENTO, V. D.; COAN, R.; RAMOS, E.; NOGAROTO, V.; ZIEMNICZAK, K.; VALENTE, G. T.; MOREIRA-FILHO, O.; MARTINS, C.; VICARI, M. R. DNA transposon invasion and microsatellite accumulation guide W chromosome differentiation in a Neotropical fish genome. **Chromosoma**, v. 128, n. 4, p. 547-560, 2019.

- 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 paraguayensis* (Gymnotiformes). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 134, n. 4, p. 303-307, 2011.
- SILVA, D. M. Z. A.; PANSONATO-ALVES, J. C.; UTSUNOMIA, 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. **Genetica**, v. 141, p. 329-336, 2013.
- SILVA, D. M. Z. A.; PANSONATO-ALVES, J. C.; UTSUNOMIA, R.; ARAYA-JAIME, C.; RUIZ-RUANO, F. J.; DANIEL, S. N.; HASHIMOTO, D. T.; OLIVEIRA, C.; CAMACHO, J. P.; PORTO-FORESTI, F.; FORESTI, F. Delimiting the origin of a B chromosome by FISH mapping, chromosome painting and DNA sequence analysis in *Astyanax paranae* (Teleostei, Characiformes). **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. 1-10, 2014.
- SILVA, D. M. Z. A.; UTSUNOMIA, R.; PANSONATO-ALVES, J. C.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Chromosomal Mapping of Repetitive DNA Sequences in Five Species of *Astyanax* (Characiformes, Characidae) Reveals Independent Location of U1 and U2 snRNA Sites and Association of U1 snRNA and 5S rDNA. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 146, n. 2, p.144-152, 2015.
- SILVANO, R. A. M.; OYAKAWA, O. T.; DO ANIARAL, B. D.; BEGOSSI, A. Peixes do alto rio Juruá (Amazônia, Brasil). São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo: Imprensa Oficial do Estado, 2001. 298 p.
- SNUSTAD, P.; SIMMONS, M. J. Fundamentos de Genética. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 6ª ed, 2013.
- SOUZA, A. C. P. Descrição cariotípica de peixes dos gêneros *Baryancistrus*, *Parancistrus*, *Peckoltia* e *Ancistrus* (Ancistrinae: Loricariidae) da Bacia Amazônica. 130f. Dissertação mestrado (Zoologia), Universidade Federal do Pará, Belém, 2003.
- SUMNER, A. Chromosomes Organization and Functions. Blackwell Science Ltd. Cap 7- p. 84-96, 2003.
- SUPIWONG, W.; LIEHR, T.; CIOFFI, M. B.; CHAVEERACH, A.; KOSYAKOVA, N.; PINTHONG, K.; TANEE, T.; TANOMTONG, A. Karyotype and cytogenetic mapping of 9 classes of repetitive DNAs in the genome of the naked catfish *Mystus bocourti* (Siluriformes, Bagridae). **Molecular Cytogenetics**, v.6, n. 51, 2013.
- THAKUR, J.; PACKIARAJ, J.; HENIKOFF, S. Sequence, Chromatin and Evolution of Satellite DNA. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, 2021.
- 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**, v. 158, n. 2, p. 106-113, 2019.
- ÚBEDA-MANZANARO, M.; MERLO, M.; PALAZÓN, J.; CROSS, I. S. Rebordinos L. Chromosomal mapping of the major and minor ribosomal genes, (GATA)<sub>n</sub> and U2 snRNA gene by double-colour FISH in species of the Batrachoididae family. **Genetica**, v. 138, n. 7, 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, n. 1, p. 30-36, 2014.
- 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*. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 142, n. 4, p. 286–292, 2014.
- VALADKHAN, S. snRNAs as the catalysis of pre-mRNA splicing. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 9, n. 6, p. 603-608, 2005.
- VICARI, M. R.; ALMEIDA, M. C.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O.; ARTONI, R. F. Cytogenetic analysis and chromosomal characteristics of the polymorphic 18S rDNA in the fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 4, p. 621-625, 2006.
- 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, n. 5, p. 1094-1116, 2010.
- WICKER, T.; SABOT, F.; HUA-VAN, A.; BENNETZEN, J. L.; CAPY, P.; CHALHOUB, B.; FLAVELL, A.; LEROY, P.; MORGANTE, M.; PANAUD, O.; PAUX, E.; SANMIGUEL, P.; SCHULMAN, H. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 12, p. 973-982, 2007.
- WILL, C. L.; LÜHRMANN, R. Spliceosome Structure and Function. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, vol. 3, n. 7, p. 1-23, 2011.
- YANO, C. F.; BERTOLLO, L. A. C.; REBORDINOS, L.; MERLO, M. A.; LIEHR, T.; PORTELA-BENS, S.; CIOFFI, M. B. Evolutionary dynamics of rDNAs and U2 small nuclear DNAs in *Triporthesus* (characiformes, triporthesidae): high variability and particular syntenic organization. **Zebrafish**, v. 14, n. 12, p. 146-154, 2017.
- YANO, C. F.; MERLO, M. A.; PORTELA-BENS, S.; CIOFFI, M. B.; BERTOLLO, L. A. C.; SANTOS-JUNIOR, C. D.; REBORDINOS, L. Evolutionary Dynamics of Multigene Families in *Triporthesus* (Characiformes, Triporthesidae): A Transposon Mediated Mechanism? **Frontiers in Marine Science**, v. 7, p. 1-12, 2020.
- ZAWADZKI, C. H.; BIFI, A. G.; MARIOTTO, S. *Araichthys loro*, a new genus and species of suckermouth armored catfish from the upper rio Tapajos basin, Brazil (Siluriformes: Loricariidae). **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v. 27, p. 361-372, 2016.
- 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. **Italian Journal of Zoology**, v. 79, n. 4, p. 492-501, 2012.
- ZUANON, J. A. S. História Natural da ictiofauna de corredeiras do rio Xingu, na região de Altamira. 199f. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

**ANEXOS**

## Anexo A- Licença permanente para coleta de material zoológico MMA/ IBAMA/SISBIO: 15117-1



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
**Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA**  
**Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio**  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Licença permanente para coleta de material zoológico

<b>Número: 15117-1</b>		<b>Data da Emissão: 26/03/2008 18:25</b>
<b>Dados do titular</b>		
Registro no Ibama: 2537361	Nome: Marcelo Ricardo Vicari	CPF: 952.846.480-72
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA		CNPJ: 80.257.355/0001-08

#### Observações, ressalvas e condicionantes

1	A participação de pesquisador(a) estrangeiro(a) nas atividades previstas nesta autorização depende de autorização expedida pelo Ministério de Ciência e Tecnologia (CNPq/MCT).
2	A licença permanente não é válida para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) manutenção de espécimes de fauna silvestre em cativeiro; c) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e d) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna. A restrição prevista no item d não se aplica às categorias Reserva Particular do Patrimônio Natural, Área de Relevante Interesse Ecológico e Área de Proteção Ambiental constituídas por terras privadas.
3	O pesquisador titular da licença permanente, quando acompanhado, deverá registrar a expedição de campo no Sisbio e informar o nome e CPF dos membros da sua equipe, bem como dados da expedição, que constarão no comprovante de registro de expedição para eventual apresentação à fiscalização;
4	Esta licença permanente não exime o seu titular da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
5	Esta licença permanente não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos.
6	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular da necessidade de atender ao disposto na Instrução Normativa Ibama nº 27/2002, que regulamenta o Sistema Nacional de Anilhamento de Aves Silvestres.
7	O pesquisador titular da licença permanente será responsável pelos atos dos membros da equipe (quando for o caso)
8	O órgão gestor de unidade de conservação estadual, distrital ou municipal poderá, a despeito da licença permanente e das autorizações concedidas pelo Ibama, estabelecer outras condições para a realização de pesquisa nessas unidades de conservação.
9	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
10	O titular da licença permanente deverá apresentar, anualmente, relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias após o aniversário de emissão da licença permanente.
11	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo Ibama e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
12	A licença permanente será válida enquanto durar o vínculo empregatício do pesquisador com a instituição científica a qual ele estava vinculado por ocasião da solicitação.
13	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico.
14	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.

#### Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	ORDEM	Characiformes, Cypriniformes, Synbranchiformes, Perciformes, Siluriformes, Gymnotiformes
2		

#### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA	Citogenética de Peixes
2	Museu Nacional da Universidade Federal do Rio de Janeiro	coleção

Este documento (Licença permanente para coleta de material zoológico) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet ([www.ibama.gov.br/sisbio](http://www.ibama.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 61434795**



## Anexo B- Carta de aprovação da Comissão de Ética do Uso de Animal



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL

### CARTA DE APROVAÇÃO

**Processo CEUA – 028/2016**

Protocolo UEPG – 8759/2016

**Título** – Prorrogação do projeto de pesquisa “Isolamento, localização *in situ* e expressão gênica de DNAs repetitivos em Loricariidae (Pisces, Siluriformes)” Processo aprovado sob o protocolo UEPG 2787/2014 e carta de aprovação CEUA 007/2014.

Interessado: Profa. Dra. Viviane Nogaroto Vicari

**Data de Entrada** –03/06/2016

**Resultado:** Aprovado

**Data/Prazo** – 03/06/2016 a 28/02/2018

#### Considerações

Prezada Professora Dra. Viviane Nogaroto Vicari

Em relação á utilização de animais no protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade, a CEUA deliberou pela sua aprovação, por dois anos, a utilização de aprovada a utilização de 30 peixes.

Ponta Grossa, 03 de junho de 2016.

Atenciosamente,

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
PROESP - CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

Profa. Dra. Maria Marta Lodi  
Coordenadora

**Anexo C- Obtenção de Cromossomos Mitóticos (Bertollo *et al.*, 2015)**

1. Injetar intra-abdominalmente no animal uma solução de colchicina 0,0125%.
2. Manter o peixe em aquário aerado durante 40 minutos.
3. Anestesiá-lo colocando-o em um recipiente contendo benzocaína diluída a 0.01%, sacrificando-o em seguida.
4. Retirar uma porção do rim anterior, transferindo-a para cerca de 5 ml de solução hipotônica (KCl 0.075M).
5. Dissociar as células com uma seringa desprovida de agulha.
6. Incubar em estufa a 37°C durante 30 minutos.
7. Re-suspender o material com o auxílio de uma pipeta Pasteur, colocando-o em um tubo de centrífuga, descartando os fragmentos de tecidos não desfeitos.
8. Acrescentar 12 gotas de fixador (3 partes de metanol para 1 de ácido acético glacial), recém preparado.
9. Re-suspender o material repetidas vezes.
10. Centrifugar durante 10 minutos, a 900 rpm.
11. Descartar o material sobrenadante com uma pipeta Pasteur.
12. Adicionar 6 ml do mesmo fixador e re-suspender bem o material
13. Centrifugar mais 3 vezes por 10 minutos cada, a 900 rpm.
14. Descartar o material sobrenadante.
15. Adicionar quantidade suficiente de fixador para que se tenha uma suspensão celular moderadamente concentrada (geralmente de 0,5 a 1,0 ml) e re-suspender bem o material.
16. Acondicionar em frascos microtubos. Nesta etapa, o material poderá ser armazenado em freezer, para posterior utilização.
17. Pingar 1-2 gotas da suspensão celular, com uma pipeta Pasteur, sobre uma lâmina bem limpa, levemente inclinada, com uma película d'água a 60°C, de tal forma que a água escorra e permita que o material fique aderido sobre a lâmina.
18. Deixar o material secar ao ar.

19. Corar com solução de Giemsa a 5%, em tampão fosfato pH=6,8 durante 6-8 minutos.

**Anexo D- Extração de DNA método Fenol-Clorofórmio (Sambrook *et al.*, 2001)**

Pequenos pedaços de tecido de fígado foram macerados em tubos de 2mL e, em seguida, adicionou-se 550mL de solução de digestão (14µL NaCl (5M) / 35µL EDTA (0,5M) / 7µL Tris-HCl (1M) / 35µL SDS (10%) / 3,5µL Proteinase K (20mg/mL) / 605,5µL H<sub>2</sub>O destilada) em cada um e foram para o vórtex. Os tubos foram incubados em banho maria a 55°C por 2 horas. Após isso, acrescentou-se 500µL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) em cada tubo e agitaram-se suavemente por 20 minutos. O material contido nos tubos foi centrifugado a 13.000 rpm por 15 minutos e, após isso, transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo (recuperando aproximadamente 300µL de sobrenadante). Acrescentou-se 300µL de NaCl 1M e 600µL de etanol 100% (proporção de 1:2) e agitaram-se suavemente para que o DNA precipitasse. Após isso, centrifugaram-se os tubos a 10.000 rpm por 5 minutos e descartou-se o sobrenadante, vertendo os tubos. Acrescentou-se 200µL de etanol 70% gelado em cada tubo e centrifugaram-se a 10.000 rpm por 5 minutos para, logo após, descartar o sobrenadante vertendo os tubos. O DNA contido nos tubos foi secado em estufa a 37°C por aproximadamente 1 hora. Acrescentou-se 60µL de tampão TE e 3µL de RNase. Por último, os tubos foram deixados em banho maria a 37°C por 40 minutos. O material foi armazenado a -20°C.

### **Anexo E- Marcação das sondas**

A sondas repetitivas utilizadas neste estudo foram marcadas pelo método de PCR usando digoxigenina 11 dUTP (Jena *Bioscience*) ou biotina 16 dUTP (Jena *Bioscience*). O PCR marcado com primers específicos foi realizado para o rDNA usando 40 ng de molde de DNA, 1X Taq Reaction buffer (200 mM Tris pH 8.4, 500 mM KCl), 40  $\mu$ M de dATP, dGTP e dCTP, 28  $\mu$ M de dTTP, 12  $\mu$ M digoxigenina 11 dUTP/ biotina 16 dUTP, 1  $\mu$ M de primers, 2mM MgCl<sub>2</sub> e 0.05 U/ $\mu$ L de Taq DNA Polymerase (Invitrogen®).



**Anexo F- *Fluorescence in situ Hybridization* (FISH) (Pinkel *et al.*, 1986)**

As lâminas foram lavadas em tampão PBS 1X, durante 5 min, em temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram desidratadas em uma série alcóolica em etanol gelado 70%, 85% e 100%, por 5 min cada. As lâminas foram então secas e submetidas ao pré-tratamento com RNase (100 µl/lâmina – 0,4% RNase/2XSSC) em câmara úmida a 37°C por 1 hr. Após isso, as lâminas foram lavadas em 2X SSC por 5 min (3X); PBS 1X por 5 min (3X) e incubadas em solução de pepsina 0,005% por 10 min. Em seguida foram lavadas novamente em PBS 1X por 5 min e incubadas em formaldeído 1% em PBS 1X/50mM MgCl<sub>2</sub> por 10 min a temperatura ambiente. Após, houve mais um banho em PBS 1X por 5 min, seguida de mais uma série alcóolica e desnaturação do cromossomo em formamida 70%/ 2X SSC por 5 min a 70°C. A seguir, o material foi desidratado em série alcóolica. As lâminas, depois de secas, foram cobertas com o mix de hibridação (de 150-500 ng de cada sonda, 50% formamida, 2X SSC, 10% sulfato dextrano, volume final 50 µl), o qual foi desnaturado a 100°C, por 10 min. A hibridação foi realizada no período de uma noite, a 37°C, em câmara úmida. Depois da hibridação, as lâminas foram lavadas em Tween 0,5%/4X SSC, em duas etapas de 10 min. As lâminas foram incubadas em tampão 5% NFDm/4X SSC por 15 min, seguido então de mais duas lavagens de Tween 0,5%/4X SSC por 5 min. A detecção dos sinais de hibridação foi realizada usando uma solução composta por Streptavidina conjugada com Alexa Fluor 488 (Invitrogen) e Anti-digoxigenina conjugada com rodamina (Roche *Applied Science*) por 1 hr em câmara úmida e escura. As lâminas foram lavadas 3X com Tween 0,5%/4X SSC por 5 min, seguida por uma série alcóolica final. Os cromossomos foram contra-corados com DAPI (0,2 µg/mL) em meio de montagem Vectashield (Vector).