

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

LARISSA GLUGOSKI

**Análise de marcadores cromossômicos em *Rineloricaria* (Siluriformes:
Loricariidae) com ênfase na diversidade cariotípica**

Ponta Grossa

2017

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

LARISSA GLUGOSKI

**Análise de marcadores cromossômicos em *Rineloricaria* (Siluriformes:
Loricariidae) com ênfase na diversidade cariotípica**

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 mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Biologia Evolutiva).

Orientadora: Profa. Dra. Viviane Nogaroto Vicari

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari

Ponta Grossa

2017

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

G567 Glugoski, Larissa
 Análise de marcadores cromossômicos em
 Rineloricaria (Siluriformes: Loricariidae)
 com ênfase na diversidade cariotípica/
 Larissa Glugoski. Ponta Grossa, 2017.
 69f.

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

 Orientadora: Prof^a Dr^a Viviane Nogaroto
 Vicari.

 Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Ricardo
 Vicari.

 1.DNAs repetitivos. 2.Elementos
 transponíveis. 3.Rearranjos cromossômicos.
 I.Vicari, Viviane Nogaroto. II. Vicari,
 Marcelo Ricardo. III. Universidade
 Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em
 Ciências Biológicas. IV. T.

CDD: 576.312.32

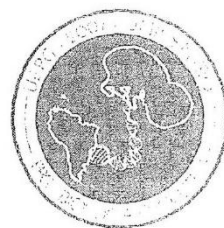


Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva



PARANÁ

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. 07/2017

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, pela candidata **Larissa Glugoski**.

Aos vinte e três dias do mês de fevereiro de dois mil e dezessete, no auditório do Programa, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob a presidência da Dr^a Viviane Nogaroto Vicari em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **Larissa Glugoski**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-área de concentração Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Dr^a Viviane Nogaroto Vicari (Orientadora UEPG), Dr^a Lucia Giuliano Caetano (UEL) e Dr^a Michelle Orane Schemberger (UEPG). 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 (a) candidato (a) das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir a candidata passou a defesa de sua dissertação intitulada: "**Análise de marcadores cromossômicos em *Rineloricaria* (Actinopterygii: Siluriformes: Loricariidae) com ênfase na diversidade cariotípica**". Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o (a) candidato (a) **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 de Dissertação, bem como as cópias em CD (PDF) com todas as correções feitas e atestadas pelo (a) orientador (a) 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, 23 de fevereiro de dois mil e dezessete.

Prof^a Dr^a Viviane Nogaroto Vicari (UEPG) Viviane Nogaroto Vicari
Prof^a Dr^a Lucia Giuliano Caetano (UEL) Lucia Giuliano Caetano
Prof^a Dr^a Michelle Orane Schemberger (UEPG) Michelle Orane Schemberger

“Complicações surgiram, continuaram e foram superadas”

(Capitão Jack Sparrow)

Dedico este trabalho ao meu pai,
José Glugoski Sobrinho (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, minha mãe Janete e meu pai José, por todo esforço, dedicação, por acreditarem em mim e me apoiarem em minhas escolhas, principalmente meu Pai, que sempre acreditou em mim, por todas nossas conversas, todos os conselhos, tudo o que sou hoje dedico a Ele. Mesmo não estando presente, sei que tudo que consegui tem sua mão, nos momentos complicados você me deu forças e não me deixou desistir. “Uma pessoa nunca morre, não enquanto houver alguém que a mantenha viva, dentro de si”, e você Pai, sempre vai estar guardadinho em meu coração.

Agradeço meu irmão Richard e minha cunhada Isabel, que sempre torceram por mim e me deram incentivo nessa caminhada, e minha irmã Andreina, que gostava de assistir minhas “aulas”, sempre pacienciosa e atenta.

Ao meu noivo Michael, por estar sempre ao meu lado todos esses anos, me dando total apoio, por toda paciência nos momentos de estresse, mesmo quando nada dava certo você me apoiava, pedia para eu ter calma e que tudo ia dar certo, e deu! Meu companheiro de toda vida. Muito obrigada meu amor. Te amo muito!

A minha orientadora Prof. Viviane Nogaroto Vicari, e ao meu co-orientador Prof. Marcelo Vicari, quem eu considero mais que professores, considero grandes amigos. Muito obrigada por toda paciência nesses anos, por acreditarem em mim, por todos os ensinamentos, por sempre estarem disponíveis para tirar minhas dúvidas, pela confiança, que foram fundamentais em minha formação profissional e pessoal.

A minha amiga e companheira de laboratório Geize, que esse ano se tornou meu braço direito. Obrigada pelas conversas, pelos conselhos, por sempre estar disposta a me ajudar, por me aguentar e me dar forças nos momentos em que nada dava certo, minha companheira de chimarrão, minicursos, caminhadas. Sei que nossa amizade vai além do laboratório, vou levar você sempre comigo.

A Michelle Orane, por todo ensinamento sobre elementos repetitivos, clonagem, programas de computador. Me ajudou desde a graduação, no meu TCC, sempre que precisava recorria a você, sempre atenciosa, parava o que estava fazendo para me ensinar. Devo muito a você. Muito obrigada.

A Marcela e a Kaline, que sempre me ajudaram nos momentos de desespero, quando faltava reagente, quando eu não sabia alguma técnica, sempre pacienciosas e dispostas a me ajudar.

Ao Alain e a Michele Andressa, pela paciência em esclarecer minhas dúvidas sobre o 5S.

Aos amigos e colegas de laboratório Daiane, Carol, Viviane, Lucas, Emanuel, Rafael, Thais, Gabi, Fernanda, Mariana (mesmo que por pouco tempo), aos colegas de citogenética de insetos, Matheus, Bruno, Bia, Leonardo, que contribuíram de alguma forma para meu trabalho e pelos momentos de descontração.

Ao Prof. Dr. Orlando Moreira Filho e a Giovana Malimpensa da UFSCar, por ter disponibilizado o material do Rio Piumhi, necessário para realização deste trabalho.

Ao professor Rafael Bueno Noletto da UNESPAR, Campus União da Vitória e ao professor Dr. Fabio André Santos do Departamento de Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa por todo auxílio prestado.

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

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho, meu muito obrigada!

RESUMO

A família Loricariidae é a mais numerosa dentro da ordem Siluriformes e abrange oito subfamílias. A subfamília Loricarinae apresenta uma grande diversidade no que diz respeito ao número de cromossomos e a fórmula cariotípica, com variação do número diploide ($2n$) de 36 a 74 cromossomos, sendo os rearranjos Robertsonianos (Rb) considerados os principais mecanismos para explicar esta variação cromossômica. *Rineloricaria* é o gênero mais numeroso de Loricariinae, com espécies apresentando $2n = 36 - 70$ cromossomos. Contudo, pouco ainda se sabe sobre quais os tipos de DNAs repetitivos originaram os eventos de fissão e fusão cromossômica. Estudos anteriores revelaram a presença de sítios múltiplos de rDNA 5S em exemplares de *Rineloricaria* da bacia do Rio Paraná, associados aos eventos de fissão/fusão Robertsonianos. O objetivo deste trabalho foi a caracterização molecular de sítios frágeis associados ao rDNA 5S, além da localização *in situ* de marcadores cromossômicos em *Rineloricaria latirostris* do rio das Pedras e *R. latirostris* do rio Piumhi (pela primeira vez descrito neste trabalho), visando a compreensão da diversificação do $2n$ neste grupo. *Rineloricaria latirostris* do rio das Pedras apresentou $2n = 46$ cromossomos, enquanto *R. latirostris* do rio Piumhi apresentou $2n = 48$ cromossomos, ambos com número fundamental (NF) de 60. Ensaio de hibridação *in situ* fluorescente em *R. latirostris* do rio Piumhi revelaram 2 pares cromossômicos marcados com rDNA 5S, o par 7 marcado com rDNA 18S, além de apenas marcações terminais utilizando-se a sonda telomérica (TTAGGGn). A população do rio das Pedras apresentou 5 pares portadores de sítios de rDNA 5S, o par metacêntrico (m) 2 marcado com rDNA 18S, marcações de TTAGGGn nas regiões terminais dos cromossomos, além da presença de vestígios de sítios teloméricos intersticiais (*interstitial telomeric sites* - ITS) nos pares m 1 e m 3, sendo este último em sintonia com o rDNA 5S, indicativo de eventos de fusão Robertsoniana. O isolamento, clonagem e sequenciamento de fragmentos de rDNA 5S, revelaram clones apresentando alta identidade ao rDNA 5S de outras espécies, além das regiões necessárias para o reconhecimento e transcrição pela RNA polimerase III. Um dos clones de ~700 pb apresentou um fragmento do transposon *hAT* em sua sequência, já em intensa degeneração molecular, sendo denominado de rDNA 5S degenerado. A hibridação *in situ* fluorescente evidenciou cromossomos com marcações co-localizadas de rDNA 5S/*hAT*, rDNA 5S/rDNA 5S degenerado e rDNA 5S/ITS (no par m 3) em *R. latirostris* do rio das Pedras. Em *R. latirostris* do rio Piumhi, não foram detectados sítios com rDNA 5S degenerado. Estes resultados nos permitem inferir o papel do TE *hAT* na dispersão dos sítios de rDNA 5S na população estudada, visto que alguns estudos indicam haver uma relação entre a dispersão do rDNA 5S pelo genoma e TEs em peixes. Em conclusão, os dados obtidos neste estudo indicam uma possível associação entre o elemento *hAT* e a dispersão de sítios de rDNA 5S e eventos Robertsonianos presentes na população de *R. latirostris* estudada. A presença de rDNA 5S/rDNA 5S degenerado/ITS geram *hotspots* para as quebras cromossômicas, contribuindo assim para a ampla diversidade cariotípica encontrada em Loricariidae.

Palavras chave: DNAs repetitivos, elementos transponíveis, rearranjos cromossômicos

ABSTRACT

The Loricariidae family is the largest in the Siluriformes order, being comprised of eight subfamilies. One of these, the Loricariinae subfamily, shows great diversity in respect to the number of chromosomes and karyotype formula, varying in the diploid number ($2n$) from 36 to 74 chromosomes. This diverse range originated mainly from Robertsonian (Rb) rearrangements. *Rineloricaria* is the largest genre in the Loricariinae subfamily, its species ranging from $2n = 36$ to 70 chromosomes. In spite of this, little is known about which kinds of repetitive DNA gave rise to the events of chromosome fusion or fission. Previous studies have revealed the presence of multiple 5S rDNA sites in specimens of *Rineloricaria* from the Paraná River Basin, associated to the Robertsonian fission/fusion events. The aim of this work was the molecular characterization of the fragile sites associated to the 5S rDNA, besides localizing *in situ* marker chromosomes in *Rineloricaria latirostris* from the Das Pedras River and *R. latirostris* from the Piumhi River (first described in this work), seeking to understand the $2n$ diversification in this group. *Rineloricaria latirostris* from the Pedras River exhibited $2n = 46$ chromosomes, while those from the Piumhi River presented $2n = 48$ chromosomes, and both had a fundamental number (FN) of 60. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) assays in *R. latirostris* from the Piumhi River revealed 2 chromosome pairs with 5S rDNA sites, pair 7 with 18S rDNA, and only terminal staining when subjected to a telomeric probe (TTAGGGn). The population of the Pedras river exhibited 5 pairs with 5S rDNA sites, the metacentric (m) pair 2 marked with 18S rDNA, TTAGGGn markers in the terminal regions of the chromosomes, and the presence of interstitial telomeric sites (ITS) in pairs m 1 and m 3. The latter, in synteny with 5S rDNA, is indicative of Robertsonian fusion events. The isolation, cloning and sequencing of the 5S rDNA revealed clones with high sequence identity to 5S rDNA from other species, in addition to the necessary regions for recognition and transcription by RNA polymerase III. One clone of ~700 bp exhibited a degenerated fragment of *hAT* transposon in its sequence. It was named degenerated 5S rDNA. The fluorescence *in situ* hybridization assay highlighted chromosomes with co-localized staining for 5S rDNA/*hAT*, 5S rDNA/degenerated 5S rDNA, and 5S rDNA/ITS (m 3 pair) in *R. latirostris* from das Pedras River. In *R. latirostris* from Piumhi River, there was no detection of degenerated 5S rDNA sites. These results allow us to infer the role of the *hAT* transposon in the dispersion of 5S rDNA sites in the population, since some studies have indicated a relation between 5S rDNA dispersion and transposons in fish. In conclusion, data obtained by this study indicate a possible association between the *hAT* and the dispersion of 5S rDNA sites and Robertsonian events in the studied population of *R. latirostris*. The presence of the 5S rDNA/degenerated 5S rDNA/ITS generates hotspots for chromosomal breakage, contributing to the large karyotype diversity found in Loricariidae.

Keywords: Repetitive DNA, transposable elements, chromosomal rearrangement.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Representação esquemática do gene que codifica o rRNA 5S (com 120 pb) intercalado com uma unidade de espaçador não transcrita (NTS) de tamanho variável. Adaptado de MARTINS; WASKO, 2004.....18
- Figura 2-** Representação esquemática do rDNA 5S de *Imparfinis schubarti*, onde podem ser observados os elementos típicos, como a região TATA-like, Box A, Elemento Intermediário (EI) e Box C. Modificado de GOUVEIA et al., 2016.....19
- Figura 3-** Representação esquemática do clone rDNA 5S degenerado (702 pb), obtido a partir de *R. latirostris* do Rio das Pedras. Em vermelho, está destacado parte do TE *hAT* (com 275 pb), localizado em uma região altamente degenerada do rDNA 5S. A sequência parcial do gene rRNA 5S está representada em azul. As flechas em preto indicam os locais de anelamento dos *primers* utilizados para amplificar o rDNA 5S (5SFwA e 5SRvB) e o TE *hAT* (*hAT_F* e *hAT_R*)27
- Figura 4-** Cariótipos de exemplares de *R. latirostris*. Em (a,b) cariótipo da população do rio das Pedras, e em (c,d) cariótipo da população do rio Piumhi. Em (a, c) coloração convencional por Giemsa e, em (b,d) bandamento C. Barra =10 µm.....42
- Figura 5 -** Representação esquemática da sequência de rDNA 5S de *R. latirostris* do rio das Pedras, indicando a localização do TATA-like (cinza), região GC (marrom), citosina (rosa), box A (verde), elemento intermediário (azul), box C (amarelo) e poli T terminador (vermelho). As letras em cinza indicam a região de NTS e as letras em preto indicam a região do rDNA 5S.....43
- Figura 6 -** Representação esquemática da sequência de rDNA 5S degenerado de *R. latirostris* do rio das Pedras, indicando a localização TE *hAT* (vermelho), rDNA 5S (verde) e região rica em nucleotídeos TA (azul)44
- Figura 7 -** Dupla FISH indicando sinais co-localizados de rDNA 5S (vermelho) e rDNA 5S degenerado (verde) em *R. latirostris* do rio das Pedras. Em detalhe, o par m2 com marcação do rDNA 18S na região pericentromérica. Barra = 10 µm.....45

Figura 8 - Dupla FISH indicando sinais co-localizados de rDNA 5S (vermelho) e TE <i>hAT</i> (verde) em <i>R. latirostris</i> do Rio das Pedras. Barra = 10 µm.....	46
Figura 9 -Dupla FISH indicando sinais co-localizados de TTAGGGn (verde) e rDNA 5S (vermelho) em <i>R. latirostris</i> do rio das Pedras. Barra = 10 µm.....	47
Figura 10 - FISH indicando 2 pares marcados com rDNA 5S (vermelho) em <i>R. latirostris</i> do rio Piumhi. Em detalhe, o par st/a 7 com marcação do rDNA 18S na região terminal. Barra = 10 µm.....	48
Figura 11 - FISH com a sonda TTAGGGn (verde) em <i>R. latirostris</i> do rio Piumhi, evidenciando marcações terminais nos cromossomos. Barra = 10 µm.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

2n- Número diploide

dNTP- Desoxirribonucleotideo trifosfato

EI- Elemento intermediário

eu-ITS- ITS eucromáticos

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

het-ITS- ITS heterocromático

ITS- Sítios teloméricos intersticiais (do inglês *interstitial telomeric sites*)

Kb- 1000 bases

LINE- (do inglês *Long Interspersed Nuclear Elements*)

LTR- Longas terminações repetidas (do inglês *Long Terminal repeats*)

m - Metacêntrico

NAHR- Recombinação não homóloga (do inglês *Non-Allelic Homologous Recombination*)

NF- Número fundamental

NHEJ- Junção de extremidades não homólogas (do inglês *non-homologous end joining*)

NTS- Espaçador não transcrito (do inglês *non-transcribed spacer sequence*)

ORF- Fase aberta de leitura (do inglês *Open Reading Frame*)

Pb- Pares de base

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

Rb- Robertsonianas

RCIs- Região controle interna

rDNA- DNA ribossômico

rRNA- RNA ribossômico

RTEs- Elementos retrotransponíveis

SDs - Segmentos duplicados

s-ITS- ITS pequenos (do inglês *short-ITS*)

SINE- Elementos nucleares intercalados curtos (do inglês *Short Interspersed Nuclear Elements*)

sm- Submetacêntrico

st/a- Subtelocêntrico/acrocêntrico

TE- Elementos transponíveis

TIR- Repetições terminais invertidas (do inglês *Terminal Inverted Repeats*)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Família Loricariidae: Aspectos morfológicos e citogenéticos.....	13
1.2 DNAs repetitivos in tandem.....	16
1.3 Elementos repetitivos dispersos.....	20
1.4 Superfamília <i>hAT</i>	22
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	24
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 Material Biológico e Locais de Coleta.....	25
3.2 Preparações cromossômicas e obtenção de DNA genômico.....	25
3.3 Obtenção e caracterização do rDNA 5S.....	26
3.4 Obtenção das sondas de DNAs repetitivos.....	27
3.5 <i>Hibridação in situ fluorescente (FISH)</i>	28
4. RESULTADOS.....	29
Capítulo I.....	30
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
6. ANEXOS.....	63

1. INTRODUÇÃO

1.1 Família Loricariidae: Aspectos morfológicos e citogenéticos

Peixes da ordem Siluriformes são os mais diversos e estão amplamente distribuídos dentro do grupo Ostariophysi (TEUGELS, 1996). Possuem 39 famílias reconhecidas e cerca de 3600 espécies válidas (ESCHMEYER; FONG, 2016). A maioria de seus representantes habita as águas doces das regiões tropicais, embora existam algumas famílias que apresentam espécies estuarinas, como Auchenipteridae, Aspredinidae e Pangasiidae (DE PINNA, 1998). Há ainda duas famílias apomórficas evolutivamente adaptadas a água salgada, Plotosidae e Ariidae, distribuídas mundialmente (BERRA, 2001).

Siluriformes têm importante papel na biogeografia histórica. Seu padrão de distribuição global demonstra evidências do modelamento geográfico da terra e de sistemas aquáticos. Acredita-se que os Siluriformes foram primariamente habitantes de água doce e que realizaram significantes migrações marinhas (BRIGGS, 2005), sendo esta uma propensão filogenética da ordem, pelo menos de um dos seus ramos principais (BETANCUR-R et al., 2003). As duas famílias marinhas são, portanto, provavelmente derivadas de ancestrais de água doce e apresentam seu próprio padrão biogeográfico (BERRA, 2001). Sua ampla distribuição e variedade de formas e hábitos os tornam um excelente grupo para estudos ecológicos, evolutivos e filogeográficos (LUNDLBERG; FREIL, 2003).

A família Loricariidae é a mais numerosa da ordem Siluriformes, a qual abrange oito subfamílias: Lithogeneinae, Delturinae, Neoplecostominae, Hypoptopomatinae, Rhinelepininae, Loricariinae, Otothyridinae e Hypostominae (ESCHMEYER; FONG, 2016). Os peixes representantes desta família são comumente reconhecidos por possuírem o corpo recoberto por placas dérmicas, por isso são popularmente conhecidos como “cascudos” e, a boca em forma de ventosa na região ventral do corpo. Possuem comportamento crepuscular ou noturno. Vivem na região bentônica, alimentam-se de algas do perifíton e de detritos (SCHAEFER, 1990). Os cascudos da família Loricariidae são encontrados na América do Sul e Central, abrangendo toda região Neotropical, sendo encontrados registros também na América do Norte e Ásia.

Estudos citogenéticos têm se mostrado de grande importância no auxílio da compreensão de acontecimentos genéticos e evolutivos a respeito da diversificação

cariotípica dos mais diversos grupos, auxiliando no entendimento a respeito da citotaxonomia de grupos críticos e na compreensão da biogeografia das espécies (ARTONI et al., 2009).

Dados citogenéticos na família Loricariidae revelam extensiva variação cromossômica no grupo, decorrente da ampla variação de números diploides ($2n = 34 - 96$ cromossomos) e inúmeros tipos de rearranjos cromossômicos geradores da diversidade cariotípica (ARTONI; BERTOLLO, 2001; ALVES et al., 2003; KAVALCO et al., 2005; BLANCO et al., 2012; 2013; BUENO et al., 2012, 2014; PRIMO et al., 2017).

A subfamília Loricariinae, considerada a segunda mais numerosa de Loricariidae, atrás apenas de Ancistrinae, apresenta uma grande diversidade no que diz respeito a número de cromossomos e a fórmula cariotípica (ROSA et al., 2012). Entre os representantes da subfamília Loricariinae a variação do $2n$ é de 36 a 70 cromossomos. Nesta subfamília, Rosa et al. (2012) relataram que tanto fissões quanto fusões cêntricas, aliados a mecanismos de inversão e combinações gaméticas, poderiam explicar a variação do $2n$. *Rineloricaria* Bleeker, 1862 é o gênero mais rico em espécies de Loricariinae, com cerca de 65 espécies (ERRERO-PORTO et al., 2014), das quais cerca de 25% apresentam resultados citogenéticos (ZIEMNICZAK, 2011). Este gênero possui uma ampla variação cariotípica, desde *Rineloricaria latirostris* (BOULENGER, 1900) apresentando o $2n = 36$ cromossomos, até *Rineloricaria* sp. e *Rineloricaria* cf. *lima* (Kner, 1853) com um número diploide de 70 cromossomos (GIULIANO-CAETANO, 1998; ALVES et al., 2003; RODRIGUES; ALMEIDA-TOLEDO, 2008; ROSA et al., 2012; PRIMO et al., 2017).

Giuliano-Caetano (1998) descreveu um amplo polimorfismo numérico para *R. latirostris*, com variação do $2n = 36 - 48$ cromossomos oriundos de fusão cêntrica. Rosa et al. (2012) analisaram duas populações da espécie *R. cf. lima* de afluentes do rio Ribeira, as quais apresentaram uma variação de número cromossômico de 66 a 70 cromossomos, além de diferentes fórmulas cariotípicas, apresentando um total de 8 citótipos. A variação cromossômica encontrada nesta espécie foi decorrente de rearranjos do tipo fusão cêntrica e inversões, visualizadas com a presença de sítios teloméricos intersticiais (do inglês *interstitial telomeric sites* - ITS) e rDNA 5S em pontos de fusão (ROSA et al., 2012). Da mesma forma, em *Rineloricaria lanceolata* foram encontradas dez formas cariotípicas com variação de $2n = 45 - 48$ cromossomos e NF = 52 – 55 (ERRERO-PORTO et al., 2014). Este polimorfismo cromossômico de *R.*

lanceolata também foi decorrente de fusões Robertsonianas (Rb) e diferentes combinações de gametas balanceados (ERRERO-PORTO et al., 2014). Além destas variações de $2n$, em *Rineloricaria pentamaculata* do rio Paraná foram descritos $2n = 56$ cromossomos, contudo com variação intra e interindividual de cromossomos B (ERRERO-PORTO; PORTELA-CASTRO; MARTINS-SANTOS, 2010, 2011).

Primo e colaboradores (2017) analisaram diferentes populações de *Rineloricaria* e evidenciaram uma organização cariotípica distinta entre os representantes, variando de 46 a 64 cromossomos, fato atribuído à instabilidade telomérica, inversões e eventos Robertsonianos. Ensaio de hibridação *in situ* fluorescente (*Fluorescence in situ Hybridization* - FISH) em espécies com números diploides menores evidenciaram sítios marcados com rDNA 5S, rDNA 18S e TTAGGGn em regiões centroméricas de cromossomos metacêntricos, os quais estariam envolvidos em rearranjos cromossômicos, como as fusões cêntricas. Em espécies com $2n$ mais alto, as fissões cêntricas seriam o mecanismo para diversificação cariotípica no grupo estudado (PRIMO et al., 2017). Ainda, a FISH utilizando como sonda a sequência telomérica TTAGGGn revelou a presença de ITS heterocromático (*het*-ITS) em espécies de *R. latirostris* (cromossomo 1 com vestígios de ITS e cromossomo 3 com co-localização ITS/rDNA 5S), além de uma espécie de *R. pentamaculatta* com vestígios de ITS no par 1 (PRIMO et al. 2017).

Algumas espécies de peixes têm apresentado vestígios de sequências teloméricas localizadas longe das regiões terminais, geralmente presentes em regiões pericentroméricas ou centroméricas (OCALWICZ, 2013). Há diferentes tipos de ITS, como o *het*-ITS, composto por extensos blocos de DNA telomérico, presentes principalmente nas regiões centroméricas ou pericentroméricas dos cromossomos, considerados como regiões instáveis propensas a eventos de fissão e inversão, além de representarem possíveis pontos em que novos telômeros podem surgir, a partir das sequências teloméricas pré-existentes (RUIZ-ERRERA et al., 2008). Os ITS pequenos ou *s*-ITS (do inglês *short*-ITS) são trechos com números limitados de hexâmeros teloméricos distribuídos em posições internas e presentes em todos vertebrados. Eventos de *s*-ITS podem ser explicados por repetições teloméricas que são inseridas pela telomerase em sítios intra-cromossômicos durante mecanismos de reparo ao DNA dupla fita (AZZALIN et al., 2001; RUIZ-ERRERA et al., 2008). Recentemente, uma nova categoria de ITS foi descrita em anuros, os ITS eucromáticos (*eu*-ITS), os quais podem

ser divididos em: eu-ITS restritos, restritos a pequenas regiões eucromáticas com padrão aleatório de distribuição; e, eu-ITS dispersos, presentes em muitas regiões eucromáticas (SCHMID; STEINLEIN, 2016).

Os DNAs repetitivos estão envolvidos em rearranjos cromossômicos geradores de diversidade cariotípica em espécies de *Rineloricaria* (GIULIANO-CAETANO, 1998; ROSA et al., 2012; PRIMO et al., 2017). Contudo, pouco ainda se sabe quais os tipos de DNAs repetitivos e como são originados os eventos de fissão e fusão cromossômica.

1.2 DNAs repetitivos *in tandem*

Uma das principais características do genoma dos eucariotos é a presença de um grande número de DNAs repetitivos (SUMNER, 2003). Essas sequências podem ser agrupadas em dois diferentes tipos: sequências repetitivas *in tandem*, como microssatélites, minissatélites, satélites (satDNA) e famílias multigênicas; e, elementos dispersos, conhecidos como transposons e retrotransposons (CHARLESWORTH, 1994).

As unidades de repetições *in tandem* são geralmente organizadas em clusters, localizadas frequentemente em regiões teloméricas ou pericentroméricas presentes em um ou em vários pares cromossômicos. As sequências repetitivas organizadas *in tandem* têm se mostrado fundamentais em estudos relacionados à evolução cromossômica (MAXON et al., 1983; CHARLESWORTH et al., 1994; VICARI et al., 2010).

Em eucariotos, uma considerável porção do genoma é constituída por heterocromatina constitutiva, a qual na maioria das vezes, é composta por satDNA (CHAVES et al., 2004; JOHN, 1988). O estudo de DNAs satélites em peixes neotropicais têm se tornado frequente, uma vez que essas sequências podem gerar informações valiosas para estudos microevolutivos, principalmente no caso de sequências espécie-específicas e/ou cromossomo-específicas (UGARKOVIC; PLOHL, 2002; VICARI et al., 2010), assim como em estudos filogenéticos (PONS; GILLESPIE, 2003; KANTEK et al., 2009; SCHEMBERGER et al., 2011).

A sequência telomérica geral dos vertebrados (TTAGGG)_n constitui outra fração repetitiva *in tandem* importante no estudo de evolução cromossômica de peixes neotropicais. Sua análise permite a verificação de rearranjos cromossômicos, principalmente em eventos relacionados a fusões cêntricas, nos quais há a possibilidade de detecção de ITS (BLANCO et al., 2012; ROSA et al., 2012; ERRERO-PORTO et al.,

2014; PRIMO et al., 2017).

Os microssatélites consistem de pequenas sequências repetidas *in tandem* que apresentam de 2 a 6 pares de nucleotídeos de comprimento (ZANE et al., 2002). Poucos são os peixes neotropicais com mapeamento físico de microsatélites (HATANAKA et al., 2002; ZIEMNICZAK et al., 2014; PUCCI et al., 2016). Os minissatélites são repetições *in tandem* que apresentam de 10 a 80 pares de nucleotídeos de comprimento (SNUSTAD; SIMMONS, 2013). Estas sequências foram descritas para inúmeras espécies de peixes (GOODIER; DAVIDSON, 1998), contudo o mapeamento cromossômico de minissatélites foi realizado apenas para algumas espécies (PÉREZ et al., 1999; CROLLIUS et al., 2000).

As famílias multigênicas são um conjunto de genes originados por duplicação e variação de algum gene ancestral. Estes genes podem estar clusterizados e localizados em um único cromossomo ou situados em inúmeros sítios no cariótipo.

Os genes ribossomais compreendem duas famílias gênicas distintas, compostas por repetições organizadas *in tandem*. O rDNA maior (rDNA 45S) é a região responsável pela organização do nucléolo e engloba os genes que codificam os rRNAs 18S, 5,8S e 28S, os quais são sintetizados, processados e parcialmente montados para formar a subunidade ribossômica no nucléolo, e são transcritos pela RNA polimerase I (LONG; DAWID, 1980). O rDNA menor é composto pela família gênica codificante de rRNA 5S, o qual é sintetizado em outro lugar do genoma e entra no nucléolo para participar da montagem da subunidade ribossomal maior (LONG; DAWID, 1980). Inúmeros trabalhos realizados com sondas de rDNA 18S e 5S têm mapeado a localização cromossômica destes sítios com hibridização *in situ* fluorescente em peixes neotropicais; contudo, em espécies pertencentes a Loricariidae tais estudos ainda estão em seu início (KAVALCO et al., 2004; 2005; MARIOTTO et al., 2009; 2011; MENDES-NETO et al., 2011; BITENCOURT et al., 2012; ROSA et al., 2012; ZIEMNICZAK et al., 2012; BUENO et al., 2014; TAKAGUI et al., 2014; BARROS et al., 2017; PRIMO et al., 2017; entre outros), frente a enorme diversidade de peixes existente.

O rDNA 5S consiste de uma unidade de transcrição de aproximadamente 120 pb, que é separada da seguinte por uma unidade de espaçador não transcrita (do inglês *non-transcribed spacer sequence* - NTS) de tamanho variado (figura 1). Embora a sequência do gene 5S para rRNA seja altamente conservada, mesmo entre espécies diferentes, os NTS são variáveis, tanto em tamanho quanto em sequência, resultado de

inversões, substituições de base, deleções e pseudogenes, possibilitando seu uso em estudos evolutivos (REBORDINOS et al., 2013). As regiões de NTS parecem estar sujeitas a uma evolução mais rápida, sendo consideradas importantes para estudos de organização e evolução das famílias multigênicas.

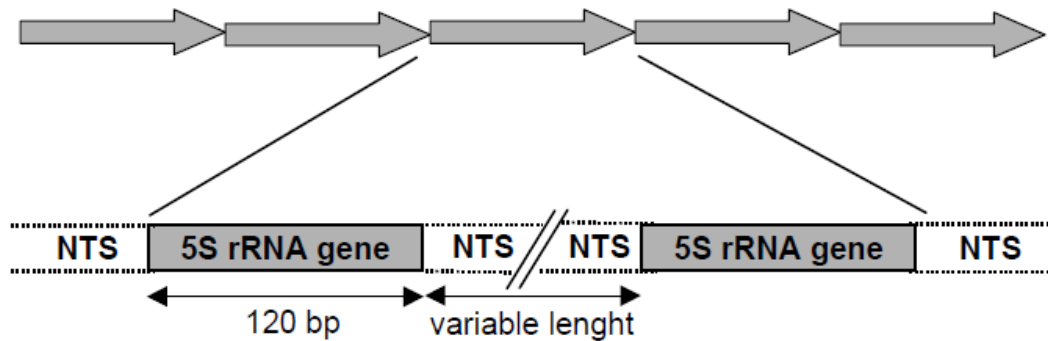


Figura 1- Representação esquemática do gene que codifica o rRNA 5S (com 120 pb) intercalado com uma unidade de espaçador não transcrita (NTS) de tamanho variável. Adaptado de MARTINS; WASKO, 2004.

As sequências dos genes para rRNA 5S contém uma região controle interna (RCIs), a qual atua como promotora da transcrição, um Box A que é uma sequência geral RCI para RNA polimerase III, um elemento intermediário (EI) e um Box C que são específicos para a transcrição do rRNA 5S, uma sequência TATA que atua como elemento promotor que direciona a transcrição, pela RNA polimerase II, de um grande conjunto de genes que codificam proteínas em eucariotos (figura 2). A sequência conservada *TATA-like*, observada *upstream* ao rRNA 5S em diversos peixes como *Salmo salar* (PENDÁS et al., 1994), sugere então, uma possível influência na transcrição deste gene (MARTINS; WASKO, 2004). O rRNA 5S requer uma sequência terminadora, rica em timinas. Além desta região, é possível encontrar outra região conservada (GAAACAA) *downstream* ao gene rRNA 5S de algumas espécies de peixes, que poderia atuar como uma sequência terminadora (MARTINS; WASKO, 2004).

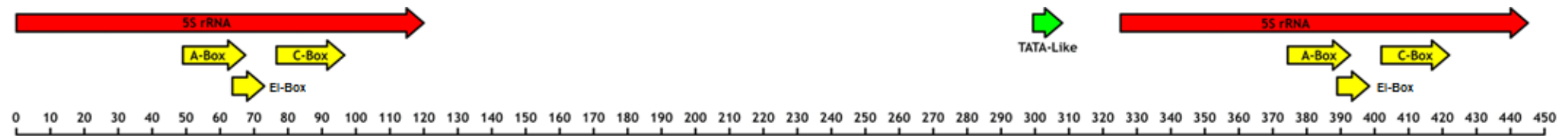


Figura 2- Representação esquemática do rDNA 5S de *Imparfinis schubarti*, onde podem ser observados os elementos típicos, como a região TATA-*like*, Box A, Elemento Intermediário (EI) e Box C. Modificado de GOUVEIA et al., 2016.

1.3 Elementos repetitivos dispersos

Os elementos transponíveis (do inglês *Transposable Elements* - TEs), são sequências distintas capazes de se transportar para diferentes locais dentro do genoma. Estes elementos podem ser identificados de acordo com sua organização estrutural e seu mecanismo de transposição. Retrotransposons (ou elementos transponíveis de classe I) se movimentam no genoma via transcriptase reversa, enquanto os transposons (ou elementos de classe II) apresentam sequências que se propagam pelo genoma como fragmentos de DNA (BÖHNE, 2008), constituindo a principal fonte de mutação no genoma.

Os TEs de classe I ou elementos retrotransponíveis (RTEs) realizam a síntese de DNA complementar a partir de uma cópia de RNA transcrita do elemento transponível, do tipo “copia-e-cola” (FINNERGAN, 1989), então este DNA se insere em um novo sítio, produzindo cópias duplicadas destes RTEs (WICKER et al., 2007). Devido a manutenção da cópia no lugar de origem, os TEs de classe I são considerados um dos agentes responsáveis pelo aumento e diminuição do tamanho do genoma de diversos organismos (FESHOTTE; PRITHMAN, 2007). Esta classe pode ser subdividida em elementos LTR (*long terminal repeats*) com longas repetições terminais e elementos não-LTRs (*non-long terminal repeat*), com ausência dessas repetições terminais.

Os elementos retrotransponíveis LTRs possuem as longas repetições terminais orientadas no mesmo sentido, geralmente possuem algumas centenas de pares de nucleotídeos, e flanqueiam a parte central conhecida como fase aberta de leitura (do inglês *open reading frame* – ORF). A ORF pode ser constituída pelo gene *gag* que codifica uma proteína estrutural da cápsula viral. Outra ORF é constituída pelo gene *pol* que codifica as enzimas necessárias à transposição do retroelemento (protease, transcriptase reversa, RNase H e integrase). Os retrovírus têm um terceiro gene, *env*, que codifica uma proteína do envoltório viral (VOLFF et al., 2001; BÖHNE et al., 2008). Nos elementos semelhantes a retrovírus, as proteínas *gag* e *pol* tem papel importante no processo de transposição (SNUSTAD; SIMMONS, 2013).

Os retroelementos não-LTRs podem ser divididos em: LINEs (*long interspersed nuclear elements*), os quais codificam as proteínas do nucleocapsídeo, endonuclease e transcriptase reversa, elementos que codificam as enzimas necessárias à sua transposição; e, SINEs (*short interspersed nuclear elements*) que não possuem enzimas

necessárias à sua retrotransposição, necessitando assim, utilizar as enzimas produzidas pelos LINES (SMIT, 2002).

Os TEs de classe II realizam sua transposição através de um intermediário de DNA e são divididos em duas subclasses. A subclasse I compreende os elementos transponíveis do tipo “cortar-e-colar” da ordem TIR, caracterizados por suas repetições terminais invertidas (do inglês *Terminal Inverted Repeats* - TIRs) de tamanho variável (WICKER et al., 2007). Esta ordem é subdividida em nove superfamílias (*Tc1-Mariner*, *hAT*, *Mutator*, *Merlin*, *transib*, *P*, *PiggyBac*, *PIF-Harbinger* e *CACTA*), que se distinguem pelo tamanho das TIRs e das duplicações do sítio alvo (WICKER et al., 2007). Já a subclasse II compreende os elementos transponíveis do tipo “copiar-e-colar” e compreende as ordens *Helitron* e *Maverick* (WICKER et al., 2007).

Estas duas classes de elementos transponíveis existem como elementos autônomos, os quais codificam todas as enzimas necessárias para sua transposição e, não autônomos, que dependem das enzimas produzidas pelos elementos autônomos (WICKER et al., 2007). A maioria dos TEs está presente nos genomas como cópias não autônomas.

O impacto dos TEs pode adquirir proporções distintas dependendo da sua localização. Cópias ativas podem ser observadas principalmente em regiões eucromáticas, enquanto cópias degeneradas e rearranjadas em sua maioria, em regiões heterocromáticas (KIDWELL; LISCH, 2001; SCHEMBERGER et al., 2014). A distribuição das cópias de TEs tem mostrado ser não aleatória, com inserções preferenciais em algumas regiões específicas do genoma (KIDWELL; LISCH, 2001). No entanto, não se sabe ao certo se esta localização em determinadas regiões é devido à inserção preferencial ou se é um padrão resultante de diferentes pressões seletivas para estes TEs (KIDWELL, 2002).

O ciclo de vida dos transposons envolve o processo de nascimento até a morte destes elementos, resultando na sua inativação pelo acúmulo de mutações e, consequentemente a perda de identidade. Novos TEs podem se originar no genoma por transferência horizontal (OLIVEIRA et al., 2012) ou por eventos de mutação e recombinação de sequências no genoma (FINNEGAN, 1985), levando a uma rápida propagação e aumento do número de cópias destes elementos no genoma. Seguindo-se a este processo, ocorre a deterioração molecular, com redução crescente da mobilidade do elemento, resultante do acúmulo de cópias defeituosas ou, ao seu

silenciamento epigenético causado pelo genoma hospedeiro (SLOTKIN; MARTIENSSEN, 2007), até serem eliminados ou passarem por processos de exaptação, perdendo a sua identidade como transposon.

1.4 Superfamília *hAT*

A superfamília *hAT* pertence à classe II de TEs e inclui elementos ativos em fungos, plantas e animais (ZHOU et al., 2004). Dentro da classe II, os membros da superfamília *hAT* pertencem a Subclasse I, caracterizada pelos elementos que utilizam o mecanismo “cortar-e-colar” para realizar sua transposição.

Warren e colaboradores (1994) criaram o termo *hAT* devido às primeiras letras dos três transposons fundadores: *hobo* de *Drosophila melanogaster* (CALVI et al., 1991), *Activator* de *Zea mays* (MCCLINTOCK, 1974) e *Tam3* de *Antirrhinum majus* (HEHL et al., 1991). Os elementos da superfamília *hAT* são caracterizados por apresentarem normalmente menos de 4Kb de tamanho, geração de 8 pb de duplicações no sítio alvo e TIRs relativamente curtas de 5 a 27 pb (KEMPKEN; KUCK, 1996). Uma característica comum entre os membros da superfamília *hAT*, é a similaridade entre as sequências de aminoácidos da transposase (CALVI et al., 1991). Um estudo de Rubin et al. (2001), propôs que os elementos *hAT* são caracterizados por apresentarem uma transposase contendo seis blocos de aminoácidos conservados e TIRs curtas com um consenso fraco.

A superfamília *hAT* é numerosa e amplamente distribuída. Esta ampla distribuição pode ser devida a origem antiga desta superfamília, a qual provavelmente surgiu antes ou nos estágios iniciais da separação de plantas, fungos e animais (RUBIN et al., 2001). Calvi et al. (1991) propuseram que a transferência horizontal poderia explicar a presença do elemento *hAT* em espécies tão distantemente relacionadas, como plantas e moscas.

Alguns estudos indicam haver uma relação entre a dispersão do rDNA 5S pelo genoma e TEs em peixes (REBORDINOS et al., 2013). Em Gymnotiformes, da Silva et al. (2011) localizaram *in situ* clusters múltiplos do rDNA 5S, fato atribuído ao envolvimento do TE *Tc1-Like* presente na região espaçadora (NTS) do rDNA 5S, que contribuiria para a dispersão deste rDNA na espécie analisada. Symonová et al. (2013) propuseram que em alguns casos os rDNAs são carregados durante o mecanismo de dispersão dos TEs para aumentar em cópias e como consequência, afetar as taxas de recombinação e propiciar a diferenciação cariotípica entre genomas próximos. Primo et

al. (2017) analisaram várias espécies de *Rineloricaria* da Bacia do Rio Paraná e relataram a presença de múltiplos sítios de rDNA 5S no gênero, fato que também poderia ser atribuído à presença de TEs e que deve ser melhor investigado.

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Os peixes da família Loricariidae são conhecidos por possuírem ampla diversidade cariotípica e sabe-se que, os DNAs repetitivos são considerados pontos quentes para quebras e rearranjos cromossômicos. No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos que levam a essa diversidade cariotípica e aos eventos que correlacionam os DNAs repetitivos aos eventos de rearranjos cromossômicos observados na família. Assim, o objetivo deste trabalho foi a localização *in situ* e caracterização molecular de DNAs repetitivos, utilizando-se marcadores cromossômicos em espécies do gênero *Rineloricaria*, visando a compreensão da diversificação do 2n neste grupo. Os objetivos específicos foram:

- 1- Sequenciar e caracterizar molecularmente o rDNA 5S, bem como suas regiões NTS;
- 2- Analisar os TEs e o possível envolvimento dos mesmos aos rearranjos/inversões ocorridos no grupo;
- 3- Localizar por hibridação *in situ* fluorescente marcadores cromossômicos de DNAs repetitivos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Biológico e Locais de Coleta

Foram analisados citogeticamente 12 exemplares (5 machos e 7 fêmeas) de *Rineloricaria latirostris* do Rio das Pedras, bacia do rio das Cinzas (Ventania - PR, 24°07'39.29" S e 50°14'16.21" O) e 13 exemplares (7 machos e 6 fêmeas) de *R. latirostris* do rio Piumhi, bacia do rio São Francisco (Piumhi - MG, 20°31'55" S e 46°02'42" O). Os peixes foram capturados com auxílio de redes de arrasto, tarrafas, peneiras e transportados vivos para o laboratório de "Biologia Cromossômica: Estrutura & Função" (*Chromosome Biology: Structure & Function LAB*) da Universidade Estadual de Ponta Grossa. No laboratório, estes animais 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). As coletas foram realizadas conforme aprovação do Comitê de Ética do Uso de Animais (Processo CEUA 028/2016) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (anexo 2).

3.2 Preparações cromossômicas e obtenção de DNA genômico

Os cromossomos mitóticos foram obtidos de células do rim anterior, órgão este que possui função hematopoiética em peixes, segundo metodologia descrita por Bertollo et al., 1978 (anexo 3).

Para a detecção de heterocromatina constitutiva foi aplicada a técnica de bandamento-C, segundo Sumner (1972) (anexo 4).

Porções de fígado (50-100 mg⁻¹cm²) foram armazenadas e utilizadas para extração de DNA genômico, utilizando-se o método *cetyltrimethylammonium bromide* (CTAB) (MURRAY; THOMPSON, 1980) (anexo 5). 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%, e esse DNA foi utilizado como molde para as reações em cadeia da polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction*-PCR).

3.3 Obtenção e caracterização do rDNA 5S

O DNA genômico total de *R. latirostris* do Rio das Pedras foi utilizado como molde em amplificações por PCR para obtenção do rDNA 5S, utilizando-se *primers* específicos 5Sa (5'- TACGCCCGATCTCGTCCGATC-3') e 5Sb (5'- CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC -3') (PENDÁS et al., 1994) e, *primers* desenhados neste estudo a partir de uma biblioteca de sequências rDNA 5S de Loricariidae 5SFwA (5'- GCTTACGGCCATACCAG -3') e 5SRvB (5'- TTCCRAGATCGGACGAGA -3'). A reação de amplificação foi realizada de acordo com Barros et al. (2017): DNA genômico = 40 ng, *primer fw* = 0.2 µM, *primer rv* = 0.2 µM, dNTPs = 0.16 mM, *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen) = 1U, MgCl₂ = 1.5 mM, *reaction buffer* 1x (200 mM Tris, pH 8.4, 500 mM KCL). O programa de amplificação consistiu de: 5 min – 95 °C / (30 s - 95 °C / 45 s – 56 °C / 2 min – 72 °C) 30 ciclos / 7 min – 72 °C.

A eletroforese em gel de agarose permitiu a visualização de fragmentos de DNA de aproximadamente 200 pb para o conjunto de *primers* 5Sa e 5Sb e, entre 180-750 pb para os *primers* 5SFwA e 5SRvB, os quais foram isolados (kit “PCR DNA and Gel Band Purification Kit” -GE Healthcare) e ligados em vetor plasmidial (“InstAclone PCR Cloning Kit” – Promega), de acordo com as instruções dos fabricantes. Após transformação em bactérias *Escherichia coli* DH5-α, as colônias recombinantes foram isoladas e sujeitas ao serviço de sequenciamento nucleotídico (ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer - Applied Biosystems). Para identificação de possíveis similaridades dos DNAs repetitivos com aquelas já depositadas em banco de dados, as sequências nucleotídicas obtidas foram submetidas à análise em base de dados de DNAs repetitivos de referência para sequências repetitivas e TEs utilizando-se o CENSOR *online software* (JURKA et al., 2005), RepeatMasker (<http://www.repeatmasker.org>) para identificação de similaridades com sequências depositadas em banco de dados; *software* Geneious 4.8.5 (DRUMMOND et al., 2009) para pesquisa de ORFs e tradução em proteína; e, GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) para análise das sequências.

Os dados do sequenciamento nucleotídico do produto de amplificação de ~ 700 pb do conjunto de *primers* 5SFwA e 5SRvB permitiram identificar um segmento interno de 276 pb apresentando identidade ao TE *hAT*. Para este segmento *hAT* foram então sintetizados os *primers* hAT_F (5'- AGRGGCGCCRTATGRRGG -3') e hAT_R (5'- GGACRGAACCATTTCA -3'), os quais foram submetidos a mesma reação de

amplificação do rDNA 5S, para a recuperação deste TE parcial a partir do genoma de *R. latirostris* (figura 3).

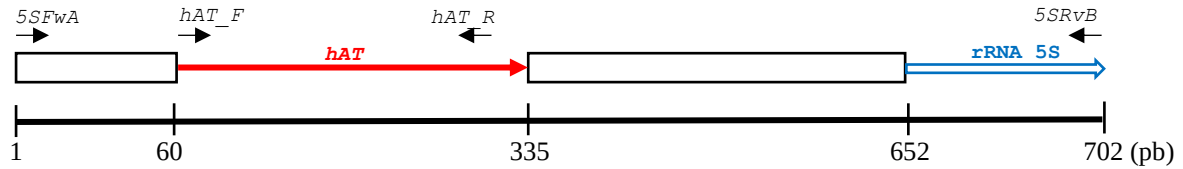


Figura 3- Representação esquemática do clone denominado rDNA 5S degenerado (702 pb), obtido a partir de *R. latirostris* do Rio das Pedras. Em vermelho, está destacado parte do TE *hAT* (com 276 pb), localizado em uma região altamente degenerada do rDNA 5S. A sequência parcial do gene rRNA 5S está representada em azul. As flechas em preto indicam os locais de anelamento dos *primers* utilizados para amplificar o rDNA 5S (5SFwA e 5SRvB) e o TE *hAT* (hAT_F e hAT_R).

3.4 Obtenção das sondas de DNAs repetitivos

Foram utilizadas cinco sondas para o mapeamento físico de sequências repetitivas sobre os cromossomos: sonda de rDNA 18S (HATANAKA; GALETTI Jr, 2004); sonda de rDNA 5S (222 pb); rDNA 5S degenerado (702 pb); uma sonda para sequência geral do telômero de vertebrados (TTAGGG)_n (IJDO et al., 1991); e, uma sonda para o TE *hAT*, isolada a partir do clone rDNA 5S degenerado.

As sondas de rDNA 18S, (TTAGGG)_n, rDNA 5S degenerado e *hAT* foram marcadas por PCR com concentrações adequadas de dNTPs e um dNTP acoplado a uma molécula repórter, neste caso biotina 16 dUTP (Roche Applied Science) (anexo 6). A sequência telomérica geral dos vertebrados foi obtida segundo Ijdo et al. (1991), em duas condições de amplificação, a primeira realizada com baixa estrigência: 4 min - 94 °C; (1 min a 94 °C, 45 s a 52 °C e 1 min e 30 s a 72 °C) 12 ciclos; seguidos por 35 ciclos de alta estrigência (1 min - 94 °C, 1 min e 30 s - 60 °C, 1 min e 30 s - 72 °C).

A sonda do rDNA 5S foi submetida à marcação com digoxigenina 11 dUTP (Roche Applied Science).

3.5 Hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

Lâminas contendo preparações cromossômicas foram submetidas à hibridação *in situ* fluorescente (FISH), utilizando-se as sondas descritas anteriormente, de acordo com o procedimento geral descrito por Pinkel et al. (1986) (anexo 7).

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 DAPI em meio de montagem Vectashield (Vector), e analisados no microscópio de epifluorescência Zeiss Axio Imager A2 acoplado ao software ZEISS pro 2011 em Câmera Zeiss AxioCam MRm de Captura Monocromática com sensor CCD e resolução de 1.4 megapixels (Carl Zeiss®). As melhores imagens foram utilizadas para organizar os cariótipos, nos quais os cromossomos homólogos foram pareados e dispostos em grupos metacêntrico (m), submetacêntrico (sm), subtelocêntrico (st) e acrocêntrico (a) (LEVAN et al., 1964).

4.RESULTADOS

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

*Capítulo I: Elementos transponíveis em segmentos duplicados geram sítios frágeis e rearranjos cromossômicos em *Rineloricaria* (Actinopterygii: Siluriformes: Loricariidae)*

Elementos transponíveis em segmentos duplicados geram sítios frágeis e rearranjos cromossômicos em *Rineloricaria* (Actinopterygii: Siluriformes: Loricariidae)

Resumo

Dados citogenéticos na família Loricariidae (Actinopterygii: Siluriformes) revelam uma extensiva variação de número diploide e ampla plasticidade cromossômica no grupo. Nestes peixes, a localização *in situ* de sítios de rDNA 5S em regiões colocadas a sítios teloméricos intersticiais (ITS) evidenciaram o envolvimento de múltiplos clusters de rDNA 5S em rearranjos cromossômicos nas subfamílias Loricariinae e Ancistrinae. Estes vestígios de sequências (TTAGGG)_n em sítios internos podem corresponder à locais de rearranjos cromossômicos e também são considerados como pontos quentes para quebras cromossômicas, os “sítios frágeis”. O gênero *Rineloricaria* apresenta ampla diversidade cariotípica, porém sem a caracterização de sequências de sítios frágeis. Assim, este trabalho teve como objetivo a caracterização molecular de segmentos duplicados (SD) de rDNA 5S, discutir seu envolvimento como sítio frágil, além da sua localização *in situ* em duas populações de *Rineloricaria latirostris*. *Rineloricaria latirostris* do rio das Pedras apresentou $2n = 46$ cromossomos e 5 pares de cromossomos marcados com rDNA 5S, além de um par portador de ITS/rDNA 5S co-localizado, enquanto *R. latirostris* do rio Piumhi apresentou $2n = 48$ cromossomos, 2 pares com sítios para rDNA 5S e ausência de ITS. Fragmentos isolados de rDNA 5S de 222 pb mostraram identidade com rDNAs 5S de outras espécies, além disso um amplificado de 702 pb apresentou inserção de um segmento do TE *hAT* em sua sequência, clone denominado rDNA 5S degenerado. Ensaios de dupla-FISH evidenciaram a co-localização de rDNA 5S/rDNA 5S degenerado, rDNA 5S/*hAT* e ITS/rDNA 5S em *R. latirostris* do rio das Pedras, enquanto na outra população estudada apenas marcações de rDNA 5S foram detectadas. Segundo nossos dados, a invasão do TE *hAT* no rDNA 5S gerou por crossing-over desigual a região de SD rDNA 5S degenerada, a qual atuou como sítio frágil para quebras cromossômicas e fusão Robertsoniana (Rb) em *Rineloricaria*. Assim, a evidência do SD rDNA 5S em pontos de fusão Rb em outras espécies sugerem que esta região é um sítio frágil para genomas de Loricariidae e, poderia explicar parte dos eventos Robertsonianos neste grupo de peixes.

Palavras-chave: elementos transponíveis, rDNA 5S, sítios ITS.

Introdução

A predisposição à instabilidade e quebra de certas regiões genômicas tem sido descrita como “sítios frágeis” e são considerados *hotspots* para rearranjos cromossômicos. Em humanos, os sítios cromossômicos frágeis são regiões propensas a formar *gaps*, constrições ou quebras em uma ou ambas as cromátides (GLOVER, 2006). Dados de sequenciamento tem revelado que os rearranjos cromossômicos acontecem próximos, ou dentro, de regiões ricas em DNAs repetitivos (EICHLER; SANKOFF, 2003). Em *Nomascus l. leucogenys*, as regiões de quebra são ricas em segmentos com duplicações e repetições, com os elementos *Alu* sendo localizados próximos à estas regiões (CARBONE et al., 2009). Em mamíferos, sequências LTR, LINE e SINE foram determinadas em sítios frágeis, os quais são reconhecidos por formar uma região do DNA de alta flexibilidade e baixa estabilidade (EICHLER; SANKOFF, 2003).

Para entender o mecanismo molecular dos rearranjos cromossômicos, as sequências de DNA presentes nos sítios de quebra cromossômicos deveriam ser identificadas e caracterizadas (KEHRER-SAWATZKI; COOPER, 2008). Em diversos organismos foram evidenciados segmentos duplicados (SDs) flanqueando ambos os lados de um rearranjo cromossômico (EICHLER; SANKOFF, 2003; HUANG et al., 2008; CARBONE et al., 2009). Os SDs são mais facilmente reconhecidos como sendo os arranjos *in tandem* das famílias gênicas ou expansões de microssatélites. A associação aparente entre SDs e sítios em que ocorreram divergências estruturais é confirmada pela determinação de pontos quentes de rearranjos cromossômicos enriquecidos por SDs (EICHLER; SANKOFF, 2003; KEHRER-SAWATZKI; COOPER, 2008). Contudo, por conter sítios homólogos, os SDs podem apenas ter facilitado o rearranjo cromossômico, enquanto que o ponto de quebra cromossômica pode estar localizado nas sequências que flanqueiam as regiões duplicadas (KEHRER-SAWATZKI; COOPER, 2008).

Estudos de organização genômica em eucariotos mostraram trocas de sequências não homólogas durante a evolução cromossômica. Trocas não recíprocas de sequências e as duplicações entre regiões subteloméricas são frequentes nos eucariotos, especialmente quando expandem famílias gênicas próximas ao telômero (KELLIS et al., 2003). Os clusters de rDNAs apresentam características comuns para regiões de quebras cromossômicas, tais como: são repetidos *in tandem*; geralmente são localizados em regiões pericentroméricas ou subteloméricas; se transpõem; estão

sujeitos a altas taxas de recombinação intra e inter-cromossômica; e, podem estar invadidos por elementos transponíveis (TEs). Regiões de rDNA 45S foram consideradas como sítios frágeis em cromossomos de *Lolium* spp. (HUANG et al., 2008) e *Mus* (CAZAUX et al., 2011). Em peixes, o papel dos rDNAs como determinante na reorganização do genoma, principalmente se localizados na região pericentromérica ou subtelomérica, pode ser observado em mecanismos de fusões cêntricas ou Robertsonianas (Rb) (ROSA et al., 2012; BARROS et al., 2017; PRIMO et al., 2017), evento favorecido pela proximidade física entre cromossomos não homólogos contendo cópias parálogas de rDNAs, durante a intérfase.

Dados citogenéticos na família Loricariidae (Actinopterygii: Siluriformes) revelam extensiva variação de número diploide (34 - 96 cromossomos) e ampla plasticidade cromossômica no grupo (ARTONI; BERTOLLO, 2001; KAVALCO et al., 2005; BLANCO et al., 2012; 2013; BUENO et al., 2012; TAKAGUI et al., 2014; PRIMO et al., 2017). Nestes peixes, a localização *in situ* de sítios de rDNA 5S em regiões colocalizadas a ITS evidenciaram o envolvimento de múltiplos clusters de rDNA 5S em rearranjos cromossômicos nas subfamílias Loricariinae (ROSA et al., 2012; PRIMO et al., 2017) e Ancistrinae (FAVARATO et al., 2016; BARROS et al., 2017). Estes vestígios de sequências (TTAGGG)_n em sítios internos podem corresponder à locais de rearranjos cromossômicos (MEYNE et al., 1990; RUIZ-HERRERA et al., 2008) e também são considerados como pontos quentes para quebras cromossômicas (SLIJEPCEVIC et al., 1997).

O rDNA 5S consiste de uma unidade de transcrição de aproximadamente 120 pb, que é separada da seguinte por uma unidade de espaçador não transcrita de tamanho variado (LONG; DAWID, 1980). Embora a sequência do gene 5S para rRNA seja altamente conservada, mesmo entre espécies diferentes, os NTS são variáveis, tanto em tamanho quanto em sequência, resultado de inversões, substituições de base, deleções e pseudogenes, possibilitando seu uso em estudos evolutivos (REBORDINOS et al., 2013). As regiões de NTS parecem estar sujeitas a uma evolução mais rápida, sendo consideradas importantes para estudos de organização e evolução das famílias multigênicas (da SILVA et al., 2011; REBORDINOS et al., 2013; GOUVEIA et al., 2016).

O gênero *Rineloricaria* apresenta ampla plasticidade cariotípica (GIULLIANO-CAETANO, 1998; ROSA et al., 2012; ERRERO-PORTO et al., 2014; PRIMO et al., 2017), porém sem a caracterização de sequências de sítios frágeis. Primo et al. (2017)

descreveram a ocorrência de fusão cromossômica no par metacêntrico 3 de *R. latirostris* mediada entre repetições rDNA 5S e (TTAGGG)_n nos braços curtos de dois cromossomos subtelocêntricos ancestrais. Assim, este trabalho teve como objetivo a caracterização molecular de prováveis sequências sítios frágeis, com enfoque no SD do rDNA 5S, e suas localizações *in situ* em duas populações de *Rineloricaria latirostris*.

Material e métodos

Material e análises convencionais

Foram analisados citogeneticamente 12 exemplares (5 machos e 7 fêmeas) de *R. latirostris* do Rio das Pedras, bacia do rio das Cinzas (Ventania- PR, 24°07'39.29" S e 50°14'16.21" O) e 13 exemplares (7 machos e 6 fêmeas) de *R. latirostris* do rio Piumhi, bacia do rio São Francisco (Piumhi- MG, 20°31'55" S e 46°02'42" O). Os procedimentos de coleta dos peixes na natureza estão 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.

Os cromossomos mitóticos foram obtidos segundo metodologia descrita por Bertollo et al. (1978). A detecção de heterocromatina constitutiva foi realizada segundo Sumner (1972). O DNA genômico foi extraído de fígado, utilizando-se o método *cetyltrimethylammonium bromide* (CTAB) (MURRAY; THOMPSON, 1980).

Obtenção e análise de sequências

O DNA genômico total de *R. latirostris* do Rio das Pedras foi utilizado como molde em amplificações por PCR para obtenção do rDNA 5S, utilizando-se *primers* específicos 5Sa (5'- TACGCCCCGATCTCGTCCGATC-3') e 5Sb (5'- CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC -3') (PENDÁS et al., 1994) e, *primers* desenhados neste estudo a partir de uma biblioteca de sequências rDNA 5S de Loricariidae 5SFwA (5'- GCTTACGGCCATACCAG -3') e 5SRvB (5'- TTCCRAGATCGGACGAGA -3'). A reação de amplificação foi realizada de acordo com Barros et al. (2017): DNA genômico = 40 ng, *primer fw* = 0.2 µM, *primer rv* = 0.2 µM, dNTPs = 0.16 mM, *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen) = 1U, MgCl₂ = 1.5 mM, *reaction buffer* 1x (200 mM Tris, pH 8.4, 500 mM KCL). O programa de amplificação consistiu de: 5 min – 95 °C / (30 s -95 °C / 45 s – 56 °C / 2 min – 72 °C)30 ciclos / 7 min – 72 °C.

A eletroforese em gel de agarose permitiu a visualização de fragmentos de DNA entre aproximadamente 200 pb para o conjunto de *primers* 5Sa e 5Sb e, entre 180 - 750 pb para os *primers* 5SFwA e 5SRvB, os quais foram isolados (kit “*PCR DNA and Gel Band Purification Kit*” -GE Healthcare) e ligados em vetor plasmidial (“*InsTAclone PCR Cloning Kit*” – Promega), de acordo com as instruções dos fabricantes. Após transformação em bactérias *Escherichia coli* DH5- α , as colônias recombinantes foram isoladas e sujeitas ao serviço de sequenciamento nucleotídico (ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer - Applied Biosystems). Para identificação de possíveis similaridades dos DNAs repetitivos com aquelas já depositadas em banco de dados, as sequências nucleotídicas obtidas foram submetidas à análise em base de dados de DNAs repetitivos de referência para sequências repetitivas e TEs utilizando-se o CENSOR *online software* (JURKA et al., 2005), *RepeatMasker* (<http://www.repeatmasker.org>) para identificação de similaridades com sequências depositadas em banco de dados; *software* Geneious 4.8.5 (DRUMMOND et al., 2009) para pesquisa de ORFs e tradução em proteína; e, *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) para análise das sequencias.

Os dados do sequenciamento nucleotídico do produto de amplificação de ~ 700 pb do conjunto de *primers* 5SFwA e 5SRvB permitiram identificar um segmento interno de 276 pb apresentando identidade ao TE *hAT*. Para este segmento *hAT* foram então sintetizados os *primers* hAT_F (5'- AGRGGCGCCRTATGRRGG -3') e hAT_R (5'- GGACRGAACCATTTCA -3'), os quais foram submetidos a mesma reação de amplificação do rDNA 5S, para a recuperação deste TE parcial a partir do genoma de *R. latirostris*.

Localização in situ

A FISH foi desenvolvida conforme Pinkel et al. (1986), utilizando-se as seguintes sondas marcadas por PCR: rDNA 18S (HATANAKA; GALETTI Jr, 2004), rDNA 5S (222 pb), rDNA 5S degenerado (702 pb), a sequência telomérica geral dos vertebrados (TTAGGG)_n (IJDO et al., 1991) e o TE *hAT*. As sondas de rDNA 18S, (TTAGGG)_n, rDNA 5S degenerado e do TE *hAT* foram submetidas à marcação com biotina 16 dUTP (Roche Applied Science). Já a sonda de rDNA 5S foi marcada com digoxigenina 11 dUTP (Roche Applied Science). 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

DAPI em meio de montagem Vectashield (Vector), e analisados no microscópio de epifluorescência Zeiss Axio Imager A2 acoplado ao software ZEISS pro 2011 em Câmera Zeiss AxioCam MRm de Captura Monocromática com sensor CCD e resolução de 1.4 megapixels (Carl Zeiss®). Para a montagem dos cariótipos os cromossomos homólogos foram pareados e dispostos em grupos de metacêntrico (m), submetacêntrico (sm) e subtelocêntrico/acrocêntrico (st/a) classificados de acordo com a razão de braços, como descrito por Levan et al. (1964).

Resultados

Descrição da estrutura dos cariótipos

As populações de *R. latirostris* estudadas (rio das Pedras, bacia do rio das Cinzas, PR; e, rio Piumhi, bacia do rio São Francisco, MG) apresentaram números diploides de 46 e 48 cromossomos, respectivamente. *Rineloricaria latirostris* - rio das Pedras – apresentou fórmula cariotípica $10m+4sm+32st/a$ e número fundamental (NF) = 60 (figura 4a). O bandamento C evidenciou pequenos blocos na região pericentromérica de todos cromossomos (figura 4b). Já *R. latirostris* - rio Piumhi - tem fórmula cariotípica de $6m+6sm+36st/a$ e NF = 60 (figura 4c). A técnica de bandamento C revelou pequenos blocos de heterocromatina nas regiões pericentroméricas dos cromossomos (figura 4d).

Caracterização das sequências de rDNA 5S

Foram obtidos diferentes clones contendo sequências de rDNA 5S de tamanhos distintos. Uma sequência de rDNA 5S de tamanho de 222 pb foi obtida para as duas populações de *R. latirostris* e apresentou identidade média de 93% com regiões de rDNA 5S de *Plectorhinchus mediterraneus* (número acesso GenBank JN850642.1) e *Dicentrarchus punctatus* (número acesso GenBank HM014371.1). Esta sequência detém 120 pb de fase codificadora, NTS de 102 pb, promotor interno composto de box A (47 – 58 pb), elemento intermediário (EI), box C (76 – 86 pb), um poli T cluster (*downstream* à região transcrita), uma região TATA-like (-33 a -30), um GC box (-16 a -13) e a Citosina -1 (figura 5).

Já a sequência de tamanho de 702 pb foi obtida apenas para *R. latirostris* do rio

das Pedras e apresentou similaridade com o TE *hAT-N33_SSa* e com *5S-Sauria* e foi aqui denominado de “rDNA 5S degenerado”. A análise de similaridade realizada utilizando-se o *software* CENSOR revelou que esta sequência apresentou um segmento de 276 pb (entre 60 – 335 pb) com identidade média de 74,28% com o TE *hAT* da espécie *Salmo salar* (*hAT-N33_SSa*) e um segmento de 50 pb (entre 652 – 702 pb) com 91,84% de similaridade com o elemento SINE derivado de rDNA 5S de *Anolis carolinensis* (*5S-Sauria*), além dos segmentos (1 – 59 e 336 – 652 pb) sem identidade conhecida, porém ricos em nucleotídeos TA (figura 6). A análise da sequência obtida com os *primers* TE *hAT* detectaram os mesmos 276 pb internos ao rDNA 5S degenerado.

Localização in situ dos DNAs repetitivos

R. latirostris do rio das Pedras apresentou marcações co-localizadas de rDNA 5S/rDNA 5S degenerado em 5 pares de cromossomos: região centromérica do cromossomo m 3 e nas regiões terminais dos cromossomos st/a 10, 11, 22 e 23 (figura 7 - em detalhe, o par m 2 com marcação do rDNA 18S na região intersticial). Este mesmo padrão de marcação foi observado em ensaios de dupla-FISH utilizando-se as sondas rDNA 5S/TE *hAT* (figura 8). O mapeamento dos sítios TTAGGGn pela técnica de FISH evidenciou marcações terminais em todos os cromossomos, além de vestígios de ITS nos pares m 1 e m 3, sendo que neste último par a região do ITS está em sintonia ao rDNA 5S (figura 9 - em detalhe, o par m 3 com marcação co-localizada do TE *hAT*/ ITS).

A localização *in situ* da sequência do rDNA 5S em *R. latirostris* do rio Piumhi evidenciou marcação na região terminal dos cromossomos st/a 9 e 16 (figura 10 – em detalhe, o par st/a 7 com marcação do rDNA 18S na região terminal). Não foram observadas marcações nos cromossomos quando utilizadas as sondas do rDNA 5S degenerado e *hAT*. A FISH utilizando-se a sonda telomérica TTAGGGn evidenciou apenas marcações nas regiões terminais dos cromossomos (figura 11).

Discussão

Pouco se sabe sobre a identificação de sequências e os mecanismos moleculares que levam as extensivas quebras e rearranjos cromossômicos observados em Loricariidae. Um grande número de sítios de rDNA 18S e rDNA 5S observado em algumas populações pode ser associado a transposições destas famílias gênicas nos cariótipos ou sua associação com elementos transponíveis promovendo sua dispersão, como já encontrado em peixes (da SILVA et al., 2011; GORNUNG, 2013; SYMONOVÁ et al., 2013; PRIMO et al., 2017). Para investigar os mecanismos que levaram as mudanças cromossômicas durante a diversificação de *Rineloricaria* este estudo procurou caracterizar sequências de DNA presentes no ponto de fusão Rb do par metacêntrico 3 de *R. latirostris* (PRIMO et al., 2017). Para isso, comparamos duas populações identificadas morfológicamente como *R. latirostris*, uma com $2n = 46$ cromossomos, $NF = 60$ e portadora de fusão Rb no par m 3, similar ao visualizado por Primo et al. (2017) e, a segunda, com $2n = 48$ cromossomos, $NF = 60$, porém sem evidências de fusão envolvendo este par.

A família Loricariidae tradicionalmente é conhecida por apresentar $2n = 54$ cromossomos como caráter basal (ARTONI; BERTOLLO, 2001; ZIEMNICZAK et al., 2012). Outras espécies de *Rineloricaria* apresentam o $2n = 54$ cromossomos basal putativo, reforçando a proposta que *R. latirostris* apresentou inúmeras fusões Rb em sua história evolutiva (GIULIANO-CAETANO, 1998; ERRERO-PORTO et al., 2014; PRIMO et al., 2017). Na comparação citogenética deste trabalho, os indícios mostram a ocorrência de fusão Rb para *R. latirostris* do rio das Pedras nos pares m 1 (portador de ITS), par m 2 (portador de rDNA 45S em região proximal) e, par m3 (portador de ITS/rDNA 5S). Já *R. latirostris* do rio Piumhi não mantém resquícios de DNA indicativos de fusões Rb. Entretanto, a redução numérica à $2n = 48$ cromossomos a partir do $2n$ basal putativo deve ter ocorrido por mecanismos de fusão. Reforça essa proposta a possibilidade dos resquícios ITS serem perdidos durante a evolução cromossômica (SLIJEPCEVIC et al., 1997).

De modo interessante, a comparação citogenética das duas populações mostra que o rDNA 5S de *R. latirostris* do rio das Pedras foi invadido por uma sequência transponível *hAT*, o qual pode ter contribuído para espalhar sítios rDNA 5S no genoma e propiciado a fusão Rb no par 3. A presença de elementos transponíveis degenerados em regiões NTS do rDNA 5S é hipotetizada para gerar inúmeras transposições em

peixes (da SILVA et al., 2011; REBORDINOS et al., 2013). Por sua vez, *R. latirostris* do rio Piumhi apresentou apenas cópias íntegras de rDNA 5S.

A sequência de rDNA 5S de 222 pb obtida neste estudo em ambas as populações de *R. latirostris* apresentou alta similaridade com rDNA 5S de outros peixes, além de regiões necessárias para o reconhecimento e transcrição pela RNA polimerase III, a qual dá origem a um rRNA 5S de 120 nucleotídeos (CLOIX et al., 2002). Essas regiões consistem de um box A, um elemento intermediário, do box C e uma curta sequência TATA-Like em aproximadamente -30, uma região GC em -13, a citosina -1 e, quatro ou mais timinas necessárias para sinal de término da transcrição (VENKATESWARLU et al., 1991; CLOIX et al., 2000; PAULE; WHITE, 2000). A análise da sequência nucleotídica demonstrou que o rDNA 5S encontrado em *R. latirostris* provavelmente é funcional por apresentar todas as regiões necessárias para o reconhecimento e transcrição pela RNA polimerase III.

Especificamente para *R. latirostris* portadora de rDNA 5S/ITS no par m3, oriundo de fusão Rb, a caracterização de sequências de DNA neste sítio identificou um fragmento de 702 pb, denominado rDNA 5S degenerado. Esta sequência apresenta parte de um elemento transponível (*hAT*), parte de uma sequência com identidade a um SINE derivado de rDNA 5S e, duas regiões sem identidade conhecida. Esta sequência não apresentou ORFs ativas e detém alto grau de degeneração molecular, o que pode interferir na atividade como TE propriamente dito (FERNÁNDEZ-MEDINA et al., 2012; ABRUSAN et al., 2013) ou rDNA 5S (CLOIX et al., 2002). O TE *hAT* pertence à superfamília de classe II de transposons de DNA e são largamente distribuídos em plantas e animais (FESCHOTTE; PRITHAM, 2007). Geralmente, apresentam menos de 4 Kb em tamanho, com TIRs variando de 5 – 27 pb e geração de sítios de duplicação de 8 pb nas regiões alvo. Embora o número de sequências depositadas deste transposon tenha aumentado, poucos exemplares contendo as sequências das TIRs e ORFs intactas foram recuperados (ATKINSON, 2014). Considerando que sinais de localização *in situ* do TE *hAT* nos cromossomos de *R. latirostris* foram visualizados apenas quando presentes nos SDs do rDNA 5S, neste estudo é possível inferir que este TE deve estar em baixa cópia no genoma.

Alguns estudos indicam haver uma relação entre a dispersão do rDNA 5S pelo genoma e TEs em peixes (REBORDINOS et al., 2013). Symonová et al. (2013) propuseram que em alguns casos os rDNAs são carregados durante o mecanismo de

dispersão dos TEs para aumentar em cópias e como consequência, afetar as taxas de recombinação e propiciar a diferenciação cariotípica entre genomas próximos. Os TEs podem desempenhar um papel significativo na reorganização do genoma, promovendo a inserção de outras sequências de genes e a formação de pseudogenes (BROSIUS, 1999). É conhecido também que inúmeros sítios frágeis estão presentes em SDs dos genomas, ou em regiões flangeadoras a estes (KEHRER-SAWATZKI; COOPER, 2008), as quais podem estar enriquecidas por elementos transponíveis (EICHLER; SANKOFF, 2003).

Em nossa hipótese, a invasão do TE *hAT* no rDNA 5S gerou por crossing-over desigual a região de SD rDNA 5S degenerada, a qual atuou como sítio frágil para quebras cromossômicas e fusão Rb em *Rineloricaria*. Em espécies de levedura, nove em cada 10 translocações recíprocas ocorreram entre cromossomos portadores de sequências altamente similares do TE *Ty* ou em sequências do rDNA (CARLTON et al., 2002). Em chimpanzés, sítios de quebras cromossômicas foram identificados em regiões enriquecidas dos SDs (LOCKE et al., 2003; KEHRER-SAWATZKI et al., 2005). Sequências transponíveis *Alu* também estão enriquecidas em regiões flangeadoras dos SDs e podem ter envolvimento com a plasticidade cromossômica em símios (BAILEY et al., 2003). Deste modo, a origem da sequência rDNA 5S degenerada propiciou sítios de SDs em regiões subterminais do braço curto de *R. latirostris*. Sítios SDs em regiões subterminais de cromossomos são reconhecidas por gerar extensivos eventos de trocas não recíprocas e duplicações próximas ao telômero (KELLIS et al., 2003), neste caso, espalhando cópias do rDNA 5S e rDNA 5S degenerado no genoma.

A análise detalhada da sequência rDNA 5S degenerada mostra regiões ricas em timina e adenina. Na caracterização de um sítio frágil, a sequência deve ser capaz de adotar uma conformação denominada de DNA não B (do inglês *non-B DNA conformation*). Segmentos com repetições purina/pirimidina ou polipirimidina, polipurina podem gerar alças durante a duplicação (do inglês *slipped structures*; WELLS, 2007). Estas estruturas induzem quebras de duplas fita de DNA (SZAMALEK et al., 2005), deixando as pontas propensas a rearranjos cromossômicos (SLIJEPCEVIC, 2016). Os mecanismos responsáveis pela formação destas estruturas permanecem desconhecidos em Loricariidae. No entanto, o conjunto de evidências deste estudo leva a inferência que as cópias AT das inúmeras repetições rDNA 5S degenerado, ou uma sequência de DNA

similar formariam uma conformação do DNA não B e, esta teria atuado como sítio frágil para quebras da dupla fita.

Em outras espécies da família Loricariidae, a localização *in situ* do rDNA 5S co-localizados aos ITS também já evidenciaram a participação destes SDs nos inúmeros eventos de fusão Rb (FAVARATO et al., 2016; BARROS et al., 2017; PRIMO et al., 2017). Pevzner e Tesler (2003) propuseram que a característica chave do modelo não randômico de quebras é o re-uso evolutivo das regiões de quebras cromossômicas em diferentes linhagens. Em outra espécie da subfamília Loricariinae, *Rineloricaria lima* (ROSA et al., 2012), e em espécies de *Ancistrus*, subfamília Ancistrinae (FAVARATO et al., 2016; BARROS et al., 2017), também foram demonstrados o envolvimento de SDs rDNA 5S com as fusões Rb, evidenciando re-uso evolutivo destas sequências para rearranjos cromossômicos em genomas de Loricariidae. Barros et al. (2017) caracterizaram uma cópia de pseudogene do rDNA 5S, denominado como rDNA 5S.2, em um provável sítio frágil para recombinação não homóloga (do inglês *Non-Allelic Homologous Recombination* - NAHR) no genoma de *Ancistrus*, o qual seria responsável também por explicar parte das fusões Rb neste gênero.

Em *R. latirostris* ($2n = 46$ cromossomos), o mecanismo de NAHR deve ter atuado no compartilhamento da sequência rDNA 5S degenerado em regiões subterminais do braço curto de cromossomos subtelo/acrocêntricos. Ainda, quebras de dupla fita nestas regiões SDs subterminais de cromossomos subtelo/acrocêntricos levaram ao mecanismo de união não homóloga (do inglês *non-homologous end joining* - NHEJ), durante o mecanismo de reparo do DNA. Análises detalhadas dos pontos de quebras cromossômicas em primatas indicaram que o mecanismo NHEJ é predominante em regiões subteloméricas, portadoras de SDs específicas (LINARDOPOULOU et al., 2005). Assim, nosso conjunto de evidências, sítios rDNA 5S, rDNA 5S degenerado, TE *hAT* e, ITS no ponto de fusão Rb mostram que este SD atuou em mecanismos de diversificação cromossômica em *Rineloricaria*. A evidência do SD rDNA 5S em pontos de fusão Rb em outras espécies sugerem que esta região é um sítio frágil para genomas de Loricariidae e, poderia explicar parte dos eventos Robertsonianos neste grupo de peixes.

Conclusão

Em conclusão, os dados obtidos neste estudo indicam uma possível associação entre o elemento *hAT* e a dispersão de sítios de rDNA 5S e eventos Robertsonianos presentes

na população de *R. latirostris* estudada. A co-localização do rDNA 5S e o TE *hAT* gera *hotspots* para as quebras cromossômicas, contribuindo assim para a ampla diversidade cariotípica encontrada em Loricariidae.

Agradecimentos

Os autores são gratos ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA/MMA/SISBIO nº: 15117). Este trabalho teve apoio financeiro do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico Processo:), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), SETI (Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado do Paraná) e Fundação Araucária (Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná).

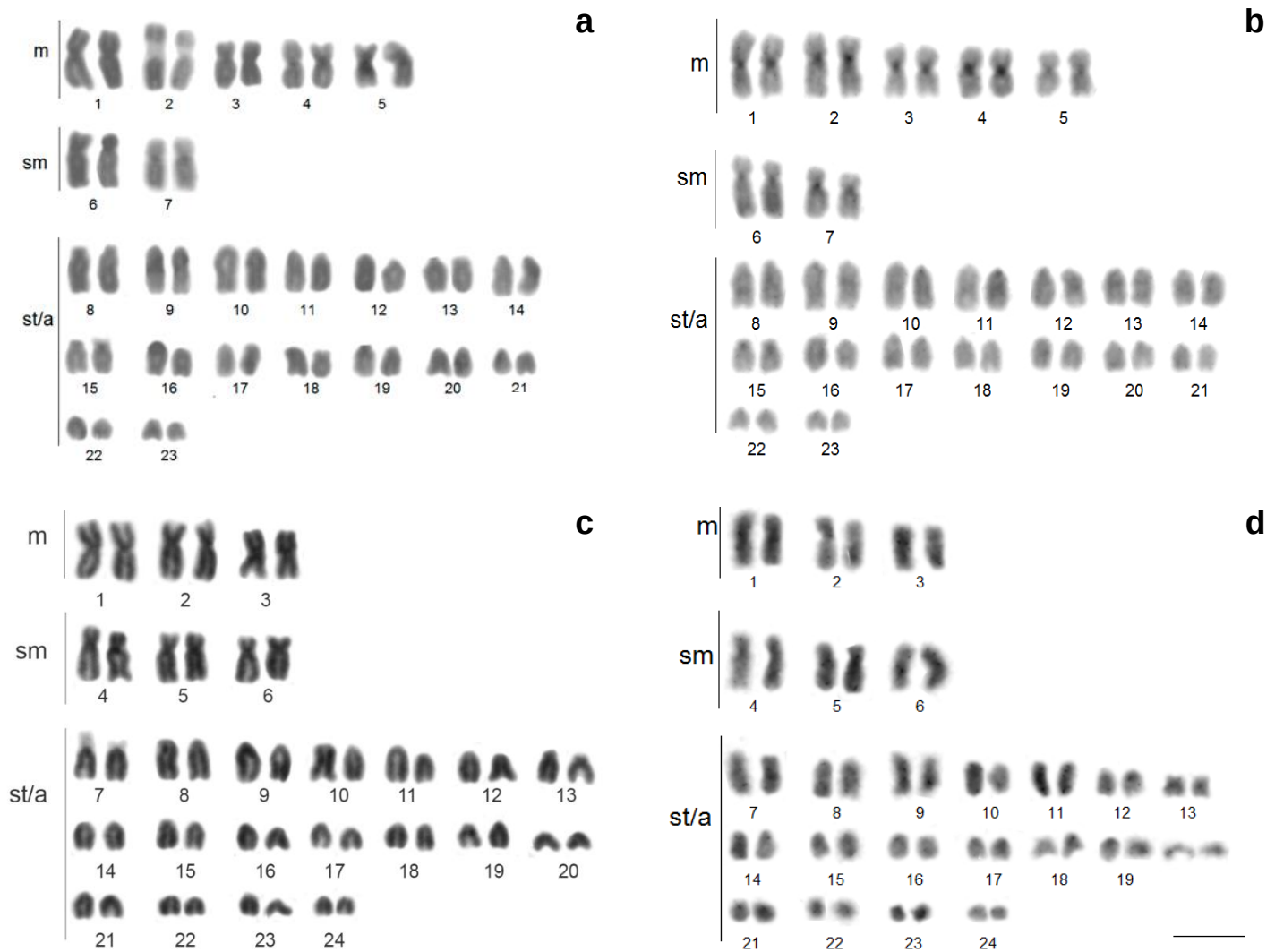


Figura 4 - Cariótipos de exemplares de *R. latirostris*. Em (a,b) cariótipo da população do rio das Pedras, e em (c,d) cariótipo da população do rio Piumhi. Em (a, c) coloração convencional por Giemsa e, em (b,d) bandamento C. Barra = 10 μm.

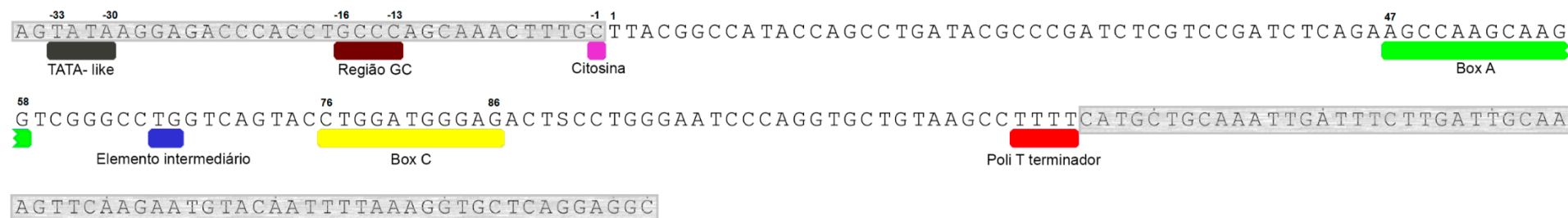


Figura 5 - Representação esquemática da sequência de rDNA 5S de *R. latirostris* do rio das Pedras, indicando a localização do TATA-like (cinza), região GC (marrom), citosina (rosa), box A (verde), elemento intermediário (azul), box C (amarelo) e poli T terminador (vermelho). As letras em cinza indicam a região de NTS e as letras em preto indicam a região do rDNA 5S.

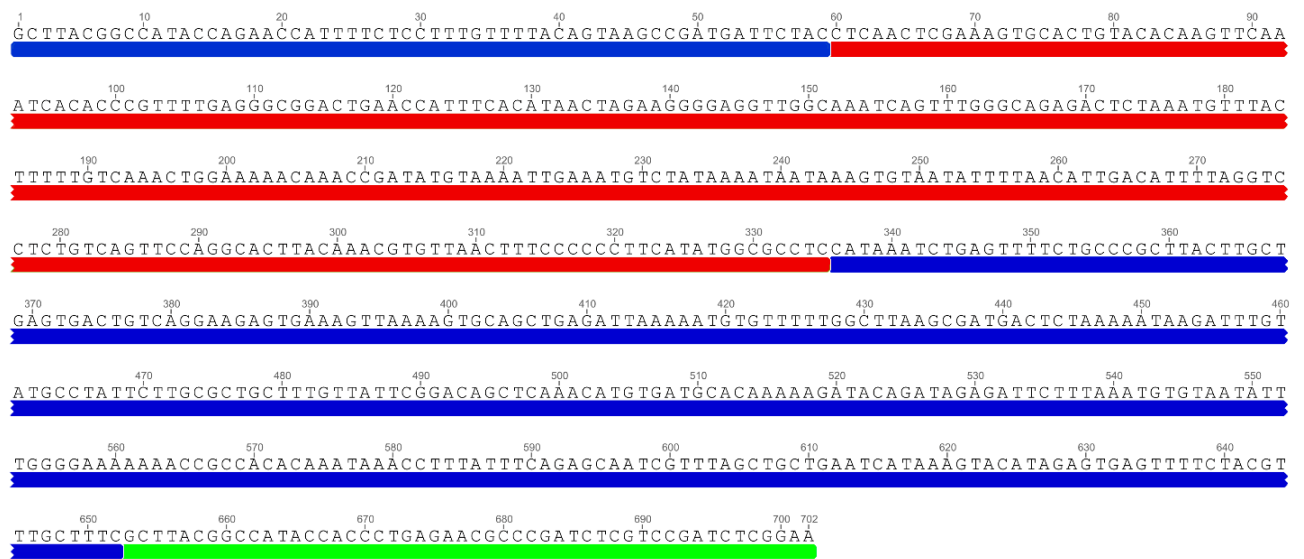


Figura 6 - Representação esquemática da sequência de rDNA 5S degenerado de *R. latirostris* do rio das Pedras, indicando a localização TE *hAT* (vermelho), rDNA 5S (verde) e região rica em nucleotídeos TA (azul).

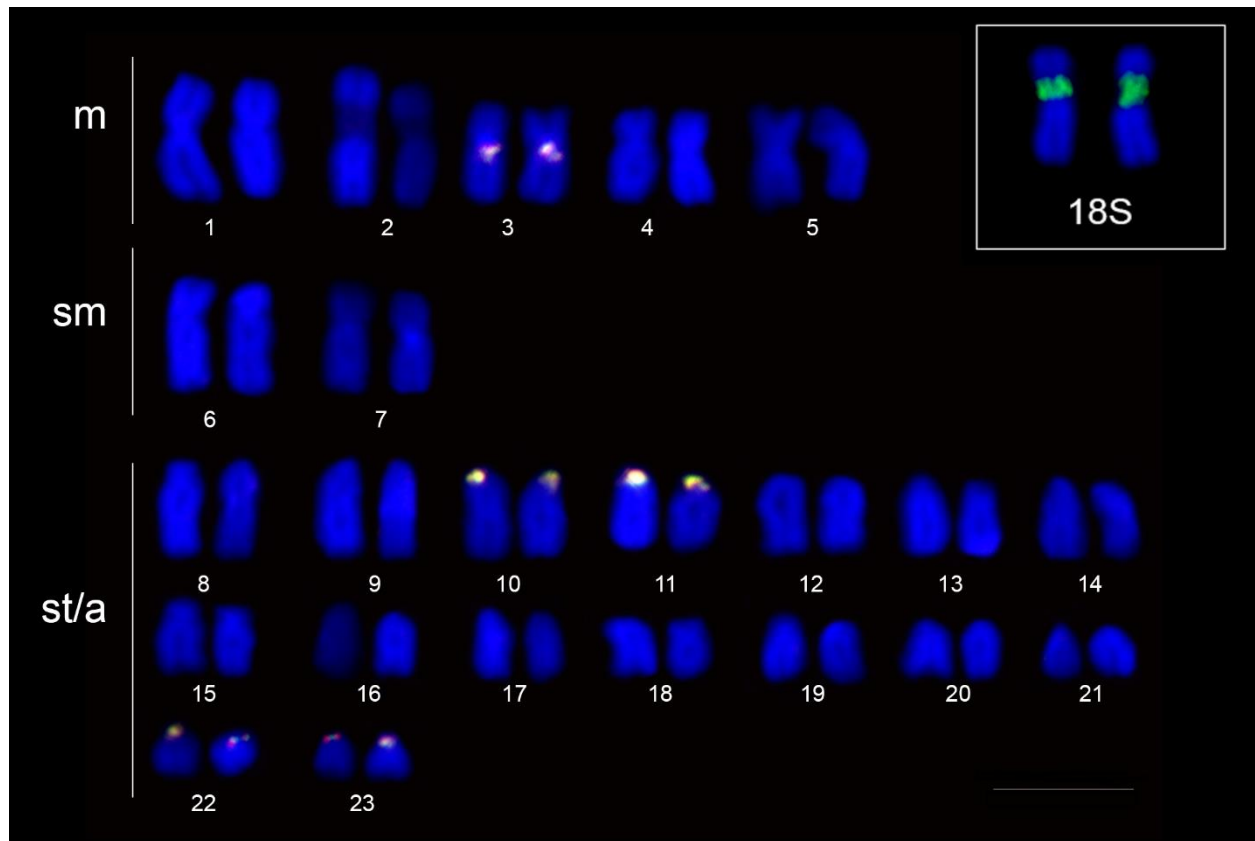


Figura 7 - Dupla FISH indicando sinais co-localizados de rDNA 5S (vermelho) e rDNA 5S degenerado (verde) em *R. latirostris* do rio das Pedras. Em detalhe, o par m 2 com marcação do rDNA 18S na região pericentromérica. Barra = 10 μ m.

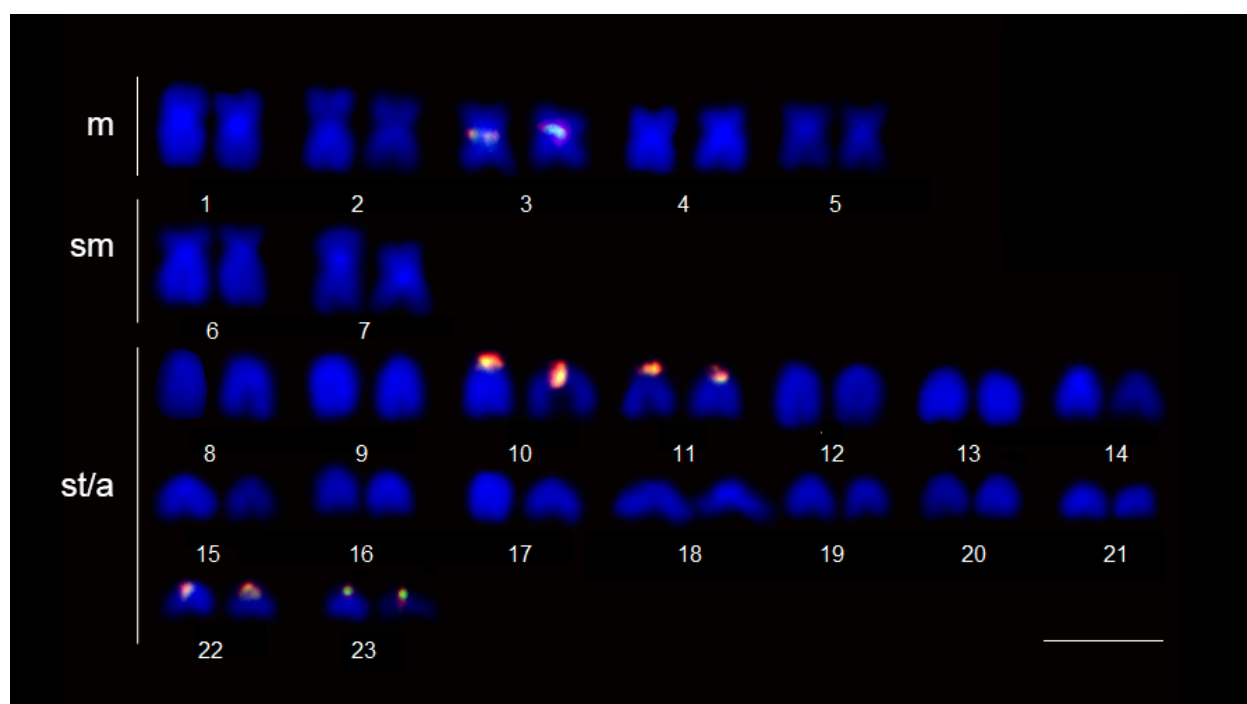


Figura 8 - Dupla FISH indicando sinais co-localizados de rDNA 5S (vermelho) e TE *hAT* (verde) em *R. latirostris* do rio das Pedras. Barra = 10 μ m.

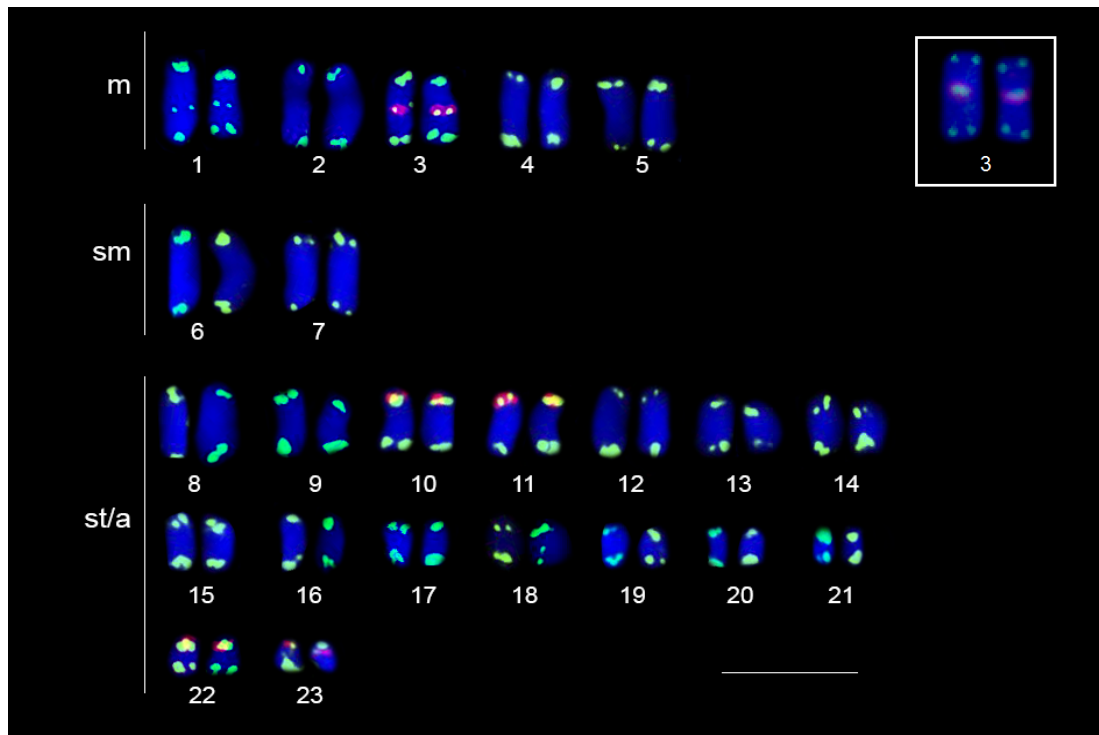


Figura 9 - Dupla FISH indicando sinais co-localizados de TTAGGGn (verde) e rDNA 5S (vermelho) em *R. latirostris* do rio das Pedras. Em detalhe, o par m 3 com marcação co-localizada do TE *hAT*/ITS. Barra = 10 μ m.

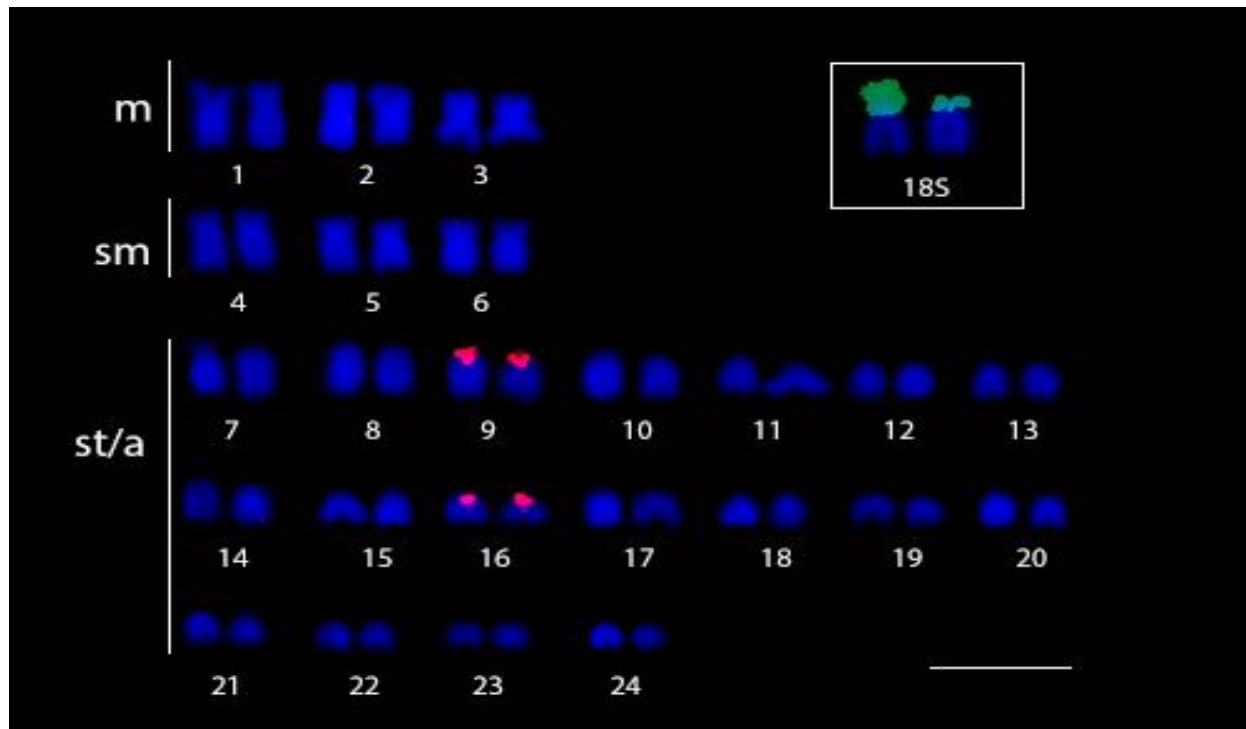


Figura 10 - FISH indicando 2 pares marcados com rDNA 5S (vermelho) em *R. latirostris* do rio Piumhi. Em detalhe, o par st/a 7 com marcação do rDNA 18S na região terminal. Barra = 10 μm.

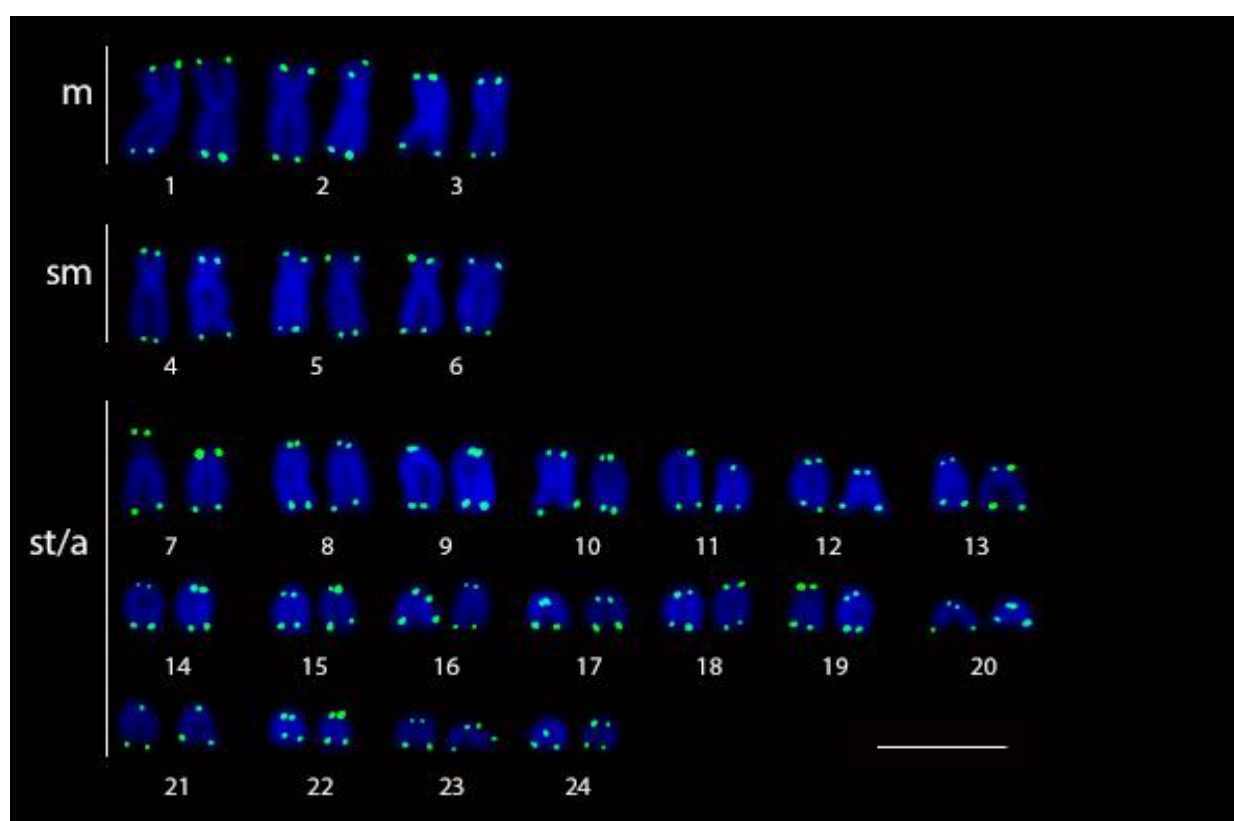


Figura 11 - FISH com a sonda TTAGGGn (verde) em *R. latirostris* do rio Piumhi, evidenciando marcações terminais nos cromossomos. Barra = 10 μ m.

5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRUSAN, G.; SZILAGYI, A.; ZHANG, Y.; PAPP, B. Turning gold into 'junk' transposable elements utilize central proteins of cellular networks. **Nucleic Acids Research**, v.41, n.5, p. 3190–3200, 2013.
- ALVES, A. L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Karyotype variability in eight species of the subfamilies Loricariinae and Ancistrinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). **Caryologia**, v.5, p.57-63, 2003.
- ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A. C. Trends in the Karyotype Evolution of Loricariidae Fish (Siluriformes). **Hereditas**, v.134, 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 Fisheries**, v.19, p.393-401, 2009.
- ATKINSON, P. W. *hAT* transposable elements. **Microbiology Spectrum**, v. 3, n.4, p.1-27, 2014.
- AZZALIN, C. M.; NERGADZE, S. G.; GIULOTTO, E. Human intrachromosomal telomeric-like repeats: Sequence organization and mechanisms of origin. **Chromosoma**, v.110, p.75–82, 2001.
- BAILEY, J. A.; LIU, G.; EICHLER, E. E. An *Alu* transposition model for the origin and expansion of human segmental duplications. **The American Journal of Human Genetics**, v.73, n.4, p.823-834, 2003.
- 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** (Amsterdam), v.608, p.20-27, 2017.
- BERRA, T. M. Freshwater fish distribution. **Academic Press**. London, 2001.
- BETANCUR-R, R.; ARTURO, A. P.; BERMINGHAM, E.; COOKE, R. Systematics and biogeography of New World sea catfishes (Siluriformes: Ariidae) as inferred from mitochondrial, nuclear, and morphological evidence. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.45, p.339-357, 2003.

BITENCOURT, J. A.; AFFONSO, P. R. A. M.; GIULIANO-CAETANO, L.; CARNEIRO, P. L. S.; DIAS, A. L. Population divergence and peculiar karyoevolutionary trends in the loricariid fish *Hypostomus* aff. *unae* from northeastern Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v.11, n.2, p. 933-943, 2012.

BLANCO, D. R.; BERTOLLO, L. A. C.; VICARI, M. R.; MARGARIDO, V. P.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O. A new technique for obtaining mitotic chromosome spreads from fishes in the field. **Journal of Fish Biology**, v. 81, p. 351-357, 2012.

BLANCO, D. R.; VICARI, M. R.; LUI, R. L.; BERTOLLO, L. A. C.; TRALDI, J. B.; MOREIRA-FILHO, O. The role of the Robertsonian rearrangements in the origin of the XX/XY₁Y₂ sex chromosome system and in the chromosomal differentiation in *Harttia* species (Siluriformes, Loricariidae). **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 23, n.1, p.127-134, 2013.

BÖHNE, A.; BRUNET, F.; GALIANA-ARNOUX, D.; SCHULTHEIS, C.; VOLFF, J.N. Transposable elements as drivers of genomic and biological diversity in vertebrates. **Chromosome Research**, v. 16, p. 203-215, 2008.

BOULENGER, G. A. A list of the batrachians and reptiles of the Gaboon (French Congo), with descriptions of new genera and species. **Proceedings of the Zoological Society of London**, v. 1900, p. 433–456, 1900.

BRIGGS, J. C. The biogeography of otophysan fishes (Ostariophysi: Otophysi): a new appraisal. **Journal of Biogeography**, v. 32, n. 2, p. 287-294, 2005.

BROSIUS, J. Vertebrate genomes were forged by massive bombardments with retroelements and retrosequences. **Genetica**, v. 107, p.209–238, 1999.

BUENO, V.; ZAWADZKI, C. H.; MARGARIDO, V. P. Trends in chromosome evolution in the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes, Loricariidae): a new perspective about the correlation between diploid number and chromosomes types. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 22, p. 241-250, 2012.

BUENO, V.; VENERE, P. C.; KONERAT, J. T.; ZAWADZKI, C. H.; VICARI, M. R.; MARGARIDO, V. P. Physical mapping of the 5S and 18S rDNA in ten species of *Hypostomus* Lacépède 1803 (Siluriformes: Loricariidae): Evolutionary tendencies in the genus. **The Scientific World Journal**, v.2014, 2014. doi. 10.1155/2014/943825

CALVI, B. R.; HONG, T. J.; FINDLEY, S. D.; GELBART, W. M. Evidence for a common evolutionary origin of inverted repeat transposon in *Drosophila* and plants: *hobo*, *Activator*, and *Tam3*. **Cell**, v. 66, p. 465–471, 1991.

CARBONE, L.; HARRIS, R. A.; VESSERE, G. M.; MOOTNICK, A. R.; HUMPHRAY, S.; ROGERS, J.; KIM, K. S.; WALL, J. D.; MARTIN, D.; JURKA, J.; MILOSAVLJEVIC, A.; JONG, P. J. Evolutionary Breakpoints in the Gibbon Suggest Association between Cytosine Methylation and Karyotype Evolution. **PLoS Genetics**, v.5, n.6, e1000538, 2009. doi:10.1371/journal.pgen.1000538(2009)

CARLTON, J. M.; ANGIUOLI, S. V.; SUH, B. B.; KOOIJ, T. W.; PERTEA, M.; SILVA, J. C.; ERMOLAEVA, M. D.; ALLEN, J. E.; SELENGUT, J. D.; KOO, H. L.; PETERSON, J. D.; POP, M.; KOSACK, D. S.; SHUMWAY, M. F.; BIDWELL, S. L.; SHALLOM, S. J.; VANAKEN, S. E.; RIEDMULLER, S. B.; FELDBLYUM, T. V.; CHO, J. K.; QUACKENBUSH, J.; SEDEGAH, M.; SHOAIBI, A.; CUMMINGS, L. M.; FLORENS, L.; YATES, J. R.; RAINE, J. D.; SINDEN, R. E.; HARRIS, M. A.; CUNNINGHAM, D. A.; PREISER, P. R.; BERGMAN, L. W.; VAIDYA, A. B.; VAN LIN, L. H.; JANSE, C. J.; WATERS, A. P.; SMITH, H. O.; WHITE, O. R.; SALZBERG, S. L.; VENTER, J. C.; FRASER, C. M.; HOFFMAN, S. L.; GARDNER, M. J.; CARUCCI, D. J. Genome sequence and comparative analysis of the model rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii yoelii*. **Nature**, v.419, p. 512-519, 2002.

CAZAUX, B.; CATALAN, J.; VEYRUNES, F.; DOUZERY, E. J.; BRITTON-DAVIDIAN, J. Are ribosomal DNA clusters rearrangement hotspots? A case study in the genus *Mus* (Rodentia, Muridae). **BMC Evolutionary Biology**, v.11, p.124, 2011.

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

CHAVES, R.; SANTOS, S.; GUEDES-PINTO, H. Comparative analysis (Hippotragini versus caprini, Bovidae) of X-chromosome's constitutive heterochromatin by *in situ* restriction endonuclease digestion: X-chromosome constitutive heterochromatin evolution. **Genetica**, v.121, p.315-325, 2004

CLOIX, C.; TUTOIS, S.; MATHIEU, O.; CUVILLIER, C.; ESPAGNOL, M. C.; PICARD, G.; TOURMENTE, S. Analysis of 5S rDNA arrays in *Arabidopsis thaliana*: physical mapping and chromosome-specific polymorphisms. **Genome Research**, v.10, p. 679-690, 2000.

CLOIX, C.; TUTOIS, S.; YUKAWA, Y.; MATHIEU, O.; CUVILLIER, C.; ESPAGNOL, M. C.; TOURMENTE, S. Analysis of the 5S RNA pool in *Arabidopsis thaliana*: RNAs are heterogeneous and only two of the genomic 5S loci produce mature 5S RNA. **Genome Research**, v.12, p.132-144, 2002.

CROLLIUS, H. R.; JAILLON, O.; DASILVA, C.; OZOUF-COSTAZ, C.; FIZAMES, C.; FISCHER, C.; BOUNEAU, L.; BILLAULT, A.; QUETIER, F.; SAURIN, W.; BERNOT, A.; WEISSENBACH, J. Characterization and repeat analysis of the compact genome of the freshwater pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. **Genome Research**, v.10, p.939-949, 2000.

DA SILVA, M.; MATOSO, D. A.; LUDWIG, L. A. M.; GOMES, E.; ALMEIDA, M. C.; VICARI, M. R.; ARTONI, R. F. Natural triploidy in *Rhamdia quelen* identified by cytogenetic monitoring in Iguaçu basin, southern Brazil. **Environmental Biology of Fishes**, v.91, p.361-366, 2011.

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., R. E. Reis, R. P. Vari, Z. M. Lucena & C. A. S. Lucena (Eds.). **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Porto Alegre, EDIPUCRS, p.603, 1998.

DRUMMOND, A. J.; ASHTON, B.; CHEUNG, M.; HELED, J.; KEARSE, M.; MOIR, R. Geneious v4.8.5, Disponível em: <http://www.geneious.com>, 2009.

EICHLER, E. E.; SANKOFF, D. Structural dynamics of eukaryotic chromosome evolution. **Science**, v.301, p.793–797, 2003.

ERRERO-PORTO, F.; PORTELA-CASTRO, A. L. B.; MARTINS-SANTOS, I. C. Possible origins of B chromosomes in *Rineloricaria pentamaculata* (Loricariidae, Siluriformes) from the Parana River basin. **Genetics and Molecular Research**, v.9, n.3, p. 1654–1659, 2010.

ERRERO-PORTO, F.; PORTELA-CASTRO, A. L. B.; MARTINS-SANTOS, I. C. Chromosome polymorphism in *Rineloricaria pentamaculata* (Loricariidae, Siluriformes) of the Paraná River basin. **Ichthyological Research**, v.58, p. 225–231, 2011.

ERRERO-PORTO, F.; VIEIRA, M. M.; BARBOSA, L. M.; BORIN-CARVALHO, L. A.; VICARI, M. R.; PORTELA-CASTRO, A. L.; MARTINS-SANTOS, I. C. Chromosomal

Polymorphism in *Rineloricaria Lanceolata* Günther, 1868 (Loricariidae: Loricariinae) of the Paraguay Basin (Mato Grosso do Sul, Brazil): Evidence of Fusions and Their Consequences in the Population. **Zebrafish**, v. 11, n.4, p. 318-324, 2014.

ESCHMEYER, W. N.; FONG, J. D. *Species of Fishes by family/subfamily*. [http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/Species>By Family.asp](http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/Species>By%20Family.asp), 2016.

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, p.103-111, 2016.

FERNÁNDEZ-MEDINA, R. D.; RIBEIRO, J. M. C.; CARARETO, C. M. A.; VELASQUE, L.; STRUCHINER, C. J. Losing identity: structural diversity of transposable elements belonging to different classes in the genome of *Anopheles gambiae*. **BMC Genomics**, v.13, p.272, 2012.

FESCHOTTE, C.; PRITHAM, E. J. DNA Transposons and the Evolution of Eukaryotic Genomes. **Annual Review of Genetic**, v.41, p.331–368, 2007.

FINNEGAN, D. J. Transposable elements in eukaryotes. **International Review of Cytology**, v. 93, p. 281-326, 1985.

FINNEGAN, D. J. Eukaryotic transposable elements and genome evolution. **Trends Genetics**, v.5, p.103–107, 1989.

GIULIANO-CAETANO, L. **Polimorfismo cromossômico Robertsoniano em populações de *Rineloricaria latirostris* (Pisces, Loricariidae)**. Tese (Doutorado em Ciências) – Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 1998.

GLOVER, T.W. Common fragile sites. **Cancer Lett**, v.232, p.4–12, 2006.

GOODIER, J. L.; DAVIDSON, W. S. Characterization of novel minisatellite repeat loci in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and their phylogenetic distribution. **Journal of Molecular Evolution**, v.46, p.245-255, 1998.

GOUVEIA, J. G.; WOLF, I. R.; MORAES-MANÉCOLO, V. P. O.; BARDELLA, V. B.; FERRACIN, L. M.; GIULIANO-CAETANO, L.; ROSA, R.; DIAS, A. L. Isolation and characterization of 5S rDNA sequences in catfishes genome (Heptapteridae and Pseudopimelodidae): perspectives for rDNA studies in fish by C0t method. **Cytotechnology**, v.68, p.2711-2720, 2016.

GORNUNG, E. Twenty years of physical mapping of major ribosomal RNA genes across the Teleosts: a review of research. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 141, n.2-3, p. 90-102, 2013.

HATANAKA, T., HENRIQUE-SILVA, F.; GALETTI JR., P.M. A polymorphic, telomeric-like sequence microsatellite in the Neotropical fish *Prochilodus*. **Cytogenetic and Genome Research**, v.98, p.308-310, 2002.

HATANAKA, T.; GALETTI JR, P. M. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). **Genetica**, v. 122, p. 239-244, 2004.

HEHL, R.; NACKEN, W. K.; KRAUSE, A.; SAEDLER, H.; SOMMER, H. Structural analysis of *Tam3*, a transposable element from *Antirrhinum majus*, reveal homologies to the *Ac* element from maize. **Plant Molecular Biology**, v.16, n.2, p.369-71, 1991.

HUANG, J.; MA, L.; YANG, F.; FEI, S. Z.; LI, L. 45S rDNA regions are chromosome fragile sites expressed as gaps in vitro on metaphase chromosomes of root-tip meristematic cells in *Lolium* spp. **Plos One**, v.3, e2167, 2008.

IJDO, J. W.; WELLS, R. A.; BALDINI, A.; REEDERS, S. T. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. **Nucleic Acids Research**, v.19, p.17, 1991.

JOHN, B. The biology of heterochromatin. In: Verma, R.S. **Heterochromatin: Molecular and Structural Aspects**. Cambridge, Cambridge University Press. 1988.

JURKA, J.; KAPITONOV, V. V.; PAVLICEK, A.; KLONOWSKI, P.; KOHANY, O.; WALICHIEWICZ, J. Repbase Update, a database of eukaryotic repetitive elements. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 110, n. 1-4, p. 462-467, 2005.

KANTEK, D. L. Z.; VICARI, M. R.; PERES, W. A. M.; CESTARI, M. M.; ARTONI, R. F.; BERTOLLO, L. A. C.; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal location and distribution of

As51 satellite DNA in five species of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characidae, Incertae sedis). **Journal of Fish Biology**, v.75, p.408-42, 2009.

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

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

KEHRER-SAWATZKI, H.; SANDIG, C.; CHUZHANOVA, N.; GOIDTS, V.; SZAMALEK, J.M.; TANZER, S.; MULLER, S.; PLATZER, M.; COOPER, D. N.; HAMEISTER, H. Breakpoint analysis of the pericentric inversion distinguishing human chromosome 4 from the homologous chromosome in the chimpanzee (*Pan troglodytes*). **Human Mutation**, v.25, p.45–55, 2005.

KEHRER-SAWATZKI, H.; COOPER, D. N. Molecular mechanisms of chromosomal rearrangement during primate evolution. **Chromosome Research**, v.16, p.41-56, 2008.

KELLIS, M.; PATTERSON, N.; ENDRIZZI, M.; BIRREN, B.; LANDER, E. S. Sequencing and comparison of yeast species to identify genes and regulatory elements. **Nature**, v.423, n.6937, p.241-54, 2003.

KEMPKEN, F.; KÜCK, U. Restless, an active Ac-like transposon from the fungus *Tolypocladium inflatum*: structure, expression, and alternative RNA splicing. **Molecular and Cellular Biology**, v.16, p.6563–6572, 1996.

KIDWELL, M. G.; LISCH, D. R. Perspective: transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution. **Evolution**, v. 55, n. 1, p. 1-24, 2001.

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

LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, v.52, p.201-220, 1964.

- LINARDOPOULOU, E. V.; WILLIAMS, E. M.; FAN, Y.; FRIEDMAN, C.; YOUNG, J. M.; TRASK, B. J. Human subtelomeres are hotspots of interchromosomal recombination and segmental duplication. **Nature**, v.437, p. 94–100, 2005.
- LOCKE, D. P.; ARCHIDIACONO, N.; MISCEO, D.; CARDONE, M. F.; DESCHAMPS, S.; ROE, B.; ROCCHI, M.; EICHLER, E. E. Refinement of a chimpanzee pericentric inversion breakpoint to a segmental duplication cluster. **Genome Biology**, v.4, p. R50, 2003.
- LONG, E. O.; DAWID, I. D. Repeated genes in eukaryotes. **Annual Review of Biochemistry**, v.49, p. 727-764, 1980.
- LUNDBERG, J. G.; FRIEL, J. P. Siluriformes. **Catfishes**. v. 20 January 2003 (under construction). 2003.
- MARIOTTO, S.; CENTOFANTE, L.; MIYAZAWA, S. C.; BERTOLLO, C. A. L.; MOREIRA FILHO, O. Chromosome polymorphism in *Ancistrus cuiabae* Knaack, 1999 (Siluriformes: Loricariidae: Ancistrini). **Neotropical Ichthyology**, v.7, n.4, p.595-600, 2009.
- MARTINS, C.; WASKO, A. P. Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. In: Williams CR, ed, **Focus on Genome Research**. Hauppauge, NY,USA: Nov a Science Publishers, 289-318. 2004.
- MAXON, R.; COHN, R.; KEDES, L. Expression and organization of histone genes. **Annual Review of Genetics**, v. 17, p. 239–277, 1983.
- MCCLINTOCK, B. Cytogenetic studies of maize and Neuspora. **Carnegie Institution Washington Year Book**, v.46, p.146-152, 1974.
- MENDES-NETO, E. O.; VICARI, M. R.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O. Description of karyotype in *Hypostomus regani* (Ihering, 1905) (Teleostei, Loricariidae) from the Piumhi river in Brazil with comments on karyotype variation found in *Hypostomus*. **Comparative Cytogenetics**, v.5, n.2, p. 133-142, 2011.
- MEYNE, J.; BAKER, R. J.; HOBART, H. H.; HSU, T. C.; RYDER, O. A. Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)_n telomeric sequence in vertebrate chromosomes. **Chromosoma**, v.99, p.3–10, 1990.
- MURRAY, G. M.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acid Research**, Oxford, v.8, p.4321-4325, 1980.

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, p.409-416, 2013. doi 10.1007/s10709-013-9740-7.

OLIVEIRA, S. G.; BAO, W.; MARTINS, C.; JURKA, J. Horizontal transfers of Mariner transposons between mammals and insects. **Mobile DNA**, v.3, p.14, 2012.

PAULE, M. R; WHITE, R. J. Survey and summary transcription by RNA polymerases I and III. **Nucleic Acids Research**, v.28, p.1283-1298, 2000.

PENDÁS, A. M.; MÓRAN, P.; FREIJE, J. P.; GARCIA-VÁSQUEZ, E. Chromosomal location and nucleotide sequence of two tandem repeats of the Atlantic salmon 5S rDNA. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v.67, p. 31-36, 1994.

PEREZ, J.; MORAN, P.; GARCIA-VASQUEZ, E. Physical mapping of three minisatellite sequences in the Atlantic salmon (*Salmo salar*) genome. **Animal Genetics**, v.30, p.371-374, 1999.

PEVZNER, P.; TESLER, G. Genome rearrangements in mammalian evolution: lessons from human and mouse genomes. **Genome Research**, v.13, p.37-45, 2003.

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

PONS, J.; GILLESPIE, R. G. Common origin of the satellite DNAs of the Hawaiian spiders of the genus Tetragnatha: evolutionary constraints on the length and nucleotide composition of the repeats. **Gene**, v.313, p.169–177, 2003.

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**, 2017. DOI: 10.1089/zeb.2016.1386.

PUCCI, M. B.; BARBOSA, P.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M. C.; ARTONI, R. F.; SCACCHETTI, P. C.; PANSONATO-ALVES, J. C.; FORESTI, F.; MOREIRA-FILHO, O.; VICARI, M. R. Chromosomal Spreading of Microsatellites and (TTAGGG)_n Sequences in the *Characidium zebra* and *C. gomesi* Genomes

(Characiformes: Crenuchidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 149, p. 182-190, 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, p. 1-11, 2013.

RODRIGUES, R. M.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. **Estudo comparativo citogenético-molecular em espécies do gênero *Rineloricaria* (Siluriformes, Loricariidae) das bacias dos rios Paraíba do Sul (RJ) e Nhundiaquara (PR)**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 54, 2008, Salvador. Resumos. Salvador: SBG, 2008.

ROSA, K. O.; ZIEMNICZAK, K.; 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: Loricariidae): fusion points carrying 5S rDNA or telomere sequence vestiges. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.22, p. 739-749, 2012.

RUBIN, E.; LITHWICK, G.; LEVY, A. A. Structure and evolution of the *hAT* transposon superfamily. **Genetics**, v.158, p.949-957, 2001.

RUIZ-HERRERA, A.; NERGADZE, S. G.; SANTAGOSTINO, M., GIULOTTO, E. Telomeric repeats far from the ends: mechanisms of origin and role in evolution. **Cytogenetic and Genome Research**, v.122, p.219–228, 2008.

SCHAEFER, S. A. Anatomy and relationships of the scoloplacid catfishes. **Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia**, v.142, p. 167–210, 1990.

SCHEMBERGER, M. O.; BELLAFRONTE, E.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M. C.; SCHÜHLI, G. S.; ARTONI, R. F.; MOREIRA-FILHO, O.; VICARI, M. R. Differentiation of repetitive DNA sites and sex chromosome systems reveal closely related group in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). **Genetica** ('s-Gravenhage), v. 139, p. 1499-1508, 2011.

SCHEMBERGER, M. O.; OLIVEIRA, J. I. N.; NOGAROTO, V.; ALMEIDA, M. C.; ARTONI, R. F.; CESTARI, M. M.; MOREIRA-FILHO, O.; VICARI, M. R. Construction and Characterization of a Repetitive DNA Library in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes): A Genomic and Evolutionary Approach to the Degeneration of the W Sex Chromosome. **Zebrafish**, v. 11, n.6, p. 518-527, 2014.

SCHMID, M.; STEINLEIN, C. Chromosome banding in amphibia. Intrachromosomal telomeric DNA sequences in Anura. **Cytogenetic Genome Research**, v.148, p.211–226, 2016.

SLIJEPCEVIC, P.; HANDE, M. P.; BOUFFLER, S. D.; LANSDORP, P.; BRYANT, P. E. Telomere length, chromatin structure and chromosome fusigenic potential. **Chromosoma**, v.106, p.413-421, 1997.

SLIJEPCEVIC, P. Mechanisms of the Evolutionary Chromosome Plasticity: Integrating the 'Centromere-from-Telomere' Hypothesis with Telomere Length Regulation. **Cytogenetic Genome Research**, v.148, p.268-278, 2016.

SLOTKIN, R. K.; MARTIENSSEN, R. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. **Nature**, v.8, p. 272-285, 2007.

SMIT, A. F. A. Initial survey of interspersed repeats in *Takifugu rubripes*. **Rebase Reports 2**, v.1, p. 54, 2002.

SNUSTAD, P.; SIMMONS, M. J. **Fundamentos de Genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 6ª ed, 2013.

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, v.75, p.304-306, 1972.

SUMNER, A. T. **Chromosomes: organization and function**. Blackwell Publishing, New York, USA. 304 pp, 2003.

SYMONOVÁ, R.; MAJTÁNOVÁ, S.; SEMBER, A.; STAAKS, G. B. O.; BOHLEN, J.; FREYHOF, J.; TÁBOVÁ, M.; RÁB, P. Genome differentiation in a species pair of coregonine fishes: an extremely rapid speciation driven by stress-activated retrotransposons mediating extensive ribosomal DNA multiplications. **BCM Evolutionary Biology**, v. 13, n.42, p. 1-11, 2013.

SZAMALEK, J. M.; GOIDTS, V.; CHUZHANOVA, N.; HAMEISTER, H.; COOPER, D. N.; KEHRER-SAWATZKI, H. Molecular characterization of the pericentric inversion that distinguishes human chromosome 5 from the homologous chimpanzee chromosome. **Human Genetic**, v.117, p.168–176, 2005.

TAKAGUI, F. H.; VENTURELLI, N. B.; DIAS, A. L.; SWARÇA, A. C.; VICARI, M. R.; FENOCCHIO, A. S.; GIULIANO-CAETANO, L. The Importance of Pericentric Inversions in the Karyotypic Diversification of the Species *Loricariichthys anus* and *Loricariichthys platymetopon*. **Zebrafish**, v. 11, p. 300-305, 2014.

TEUGELS, G. G. Taxonomy, phylogeny and biogeography of catfishes (Ostariophysi, Siluroidei): an over-view. **Aquatic Living Resources**, v. 9, p.9-34, 1996.

UGARKOVIC, D.; PLOHL, M. Variation in satellite DNA profiles - Causes and effects. **EMBO J**, v.21, p.5955-5959, 2002.

VENKATESWARLU, K.; LEE, S. W.; NAZAR, R. N. Conserved upstream sequence elements in plant 5S ribosomal RNA-encoding genes. **Gene**, v.105, p.249-253, 1991.

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

VOLFF, J. N.; KORTING, C.; FROSCHAUER, A.; SWEENEY, K.; SCHARTL, M. Non-LTR retrotransposons encoding a restriction enzyme-like endonuclease in vertebrates. **Journal of Molecular and Evolution**, v. 52, p. 351–360, 2001.

WARREN, W. D.; ATKINSON, P.W.; O'BROCHTA, D. A. The *Hermes* transposable element from the house fly, *Musca domestica*, is a short inverted repeat-type element of the *hobo*, *Ac*, and *Tam3* (*hAT*) element family. **Genetic Research**, v.64, p.87–97, 1994.

WELLS, R. D. Non-B DNA conformations, mutagenesis and disease. **Trends in Biochemical Sciences**, v.32, p. 271-278, 2007.

WICKER, T.; SABOT, F.; HUA-VAN, A. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. **Nature Reviews Genetics**, v.8, p.973–982, 2007.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PARTANELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, v. 11, n. 1, p. 1-16, 2002.

ZHOU, L.; MITRA, R.; ATKINSON, P. W.; HICKMAN, A. B.; DYDA, F.; CRAIG, N. L. Transposition of *hAT* elements links transposable elements and V(D)J recombination. **Nature**, v.432, p.995–1001, 2004. doi: 10.1038/nature03157.

ZIEMNICZAK, K. **Estudos citogenéticos em espécies de Loricariidae (Pisces, Siluriformes) das nascentes dos rios Ribeira e Tibagi, Ponta Grossa-PR.** Dissertação (Mestrado em Genética). Universidade Federal do Paraná, 2011, 84p.

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, p. 492-501, 2012.

6.ANEXOS

Anexo 1- 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

Número: 15117-1		Data da Emissão: 26/03/2008 18:25
Dados do titular		
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, bioprospecção 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, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

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	colecção

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).

Código de autenticação: 61434795



Página 1/2

Anexo 2 - 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

Prof.^a Dra. Maria Marta Loddi
Coordenadora

Anexo 3- Obtenção de Cromossomos Mitóticos (BERTOLLO et al., 1978)

1. Injetar intra-abdominalmente no animal uma solução de colchicina 0,025%, na proporção de 1 mL/100g de peso.
2. Manter o peixe em aquário aerado durante 50 minutos.
3. Anestesiá-lo colocando-o em um recipiente contendo benzocaína diluída a 0.01%, sacrificando-o em seguida.
4. Retirar uma pequena porção do rim anterior, transferindo-a para cerca de 10 ml de solução hipotônica (KCl 0.075M), dissociando as células com uma seringa desprovida de agulha.
5. Incubar em estufa a 37°C durante 30 minutos.
6. Re-suspender o material com o auxílio de uma pipeta Pasteur, colocando-o em um tubo de centrifuga, descartando os fragmentos de tecidos não desfeitos.
7. Acrescentar algumas gotas de fixador (3 partes de metanol para 1 de ácido acético glacial), recém preparado, re-suspendendo o material repetidas vezes.
8. Centrifugar durante 10 minutos, a 900 rpm.
9. Descartar o material sobrenadante com uma pipeta Pasteur. Adicionar 5-7 ml do mesmo fixador, re-suspender bem o material e centrifugar por mais 10 minutos, a 900 rpm.
10. Repetir novamente o item 9.
11. Descartar o material sobrenadante e 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.
12. Acondicionar em frascos microtubos. Nesta etapa, o material poderá ser armazenado em freezer, para posterior utilização.
13. 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.
14. Deixar o material secar ao ar.
15. Corar com solução de Giemsa a 5%, em tampão fosfato pH=6,8 durante 6-8 minutos.

Anexo 4 -Detecção da Heterocromatina Constitutiva: Bandamento-C (SUMNER, 1972).

As lâminas contendo o material celular devem ser tratadas em ácido clorídrico (HCl) 0,2N, à 37°C, durante 6 minutos, lavando-se com água destilada logo em seguida. Em seguida incuba-se a preparação em hidróxido de Bário (Ba(OH)_2) a 5%, recém preparada, a 42°C, durante 1 a 2 minutos. Submergir rapidamente a lâmina em solução de ácido clorídrico 0,2N e lavar com água destilada. Imergir a lâmina em solução salina 2xSSC, a 60°C, durante 40 minutos. Por último, lavar com água destilada, secar ao ar e corar com solução de Giemsa a 2%, em tampão fosfato pH=6,8 durante 15 minutos.

Anexo 5- Extração de DNA método CTAB (MURRAY; THOMPSON, 1980)

Adicionar em um tubo de 1,5 mL 0,2 gramas de fígado juntamente com 240 µl de tampão CTAB (concentração final: 5 % de CTAB; 5 M de NaCl; 0,5 M EDTA; 1 M Tris-HCl pH8), 13 µl de proteinase K (10 mg/ml) e 5 µl de β-mercaptoetanol. Incubar a 60 °C em banho-maria, over night ou até o tecido ser totalmente digerido. Em seguida adicionar 600 µl de clorofórmio e homogeneizar suavemente durante 5 min. Centrifugar por 5 minutos a 8000 rpm. Retirar o sobrenadante e transferir para um tubo novo. Adicionar 600 µL de etanol absoluto e deixar a -20 °C por 1 hora. Centrifugar a 14000 rpm por 15 minutos e descartar o sobrenadante. Lavar o *pellet* com 500 µl de etanol 70 % e centrifugar novamente a 14000 rpm por 2 minutos. Retirar o sobrenadante e deixar o tubo com o DNA secando na estufa a 37 °C. Resuspender o *pellet* com 15µL de H₂O. Adicionar 5 µL de RNase e deixar 2 horas a 37°C. Por fim, deixar 15 minutos a 65°C.

Anexo 6- Marcação das sondas

A sondas repetitivas utilizadas neste estudo foram marcadas pelo método de PCR usando digoxigenina 11 dUTP (Roche Applied Science) ou biotina 16 dUTP (Roche Applied Science). 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 µM de dATP, dGTP e dCTP, 28 µM de dTTP, 12 µM digoxigenina 11 dUTP, 1 µM de *primers*, 2mM MgCl₂ e 0.05 U/µL de *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen®).

Anexo 7- Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH)- Pinkel, et al., 1986.

As lâminas, contendo as preparações cromossômicas, foram lavadas em PBS, por 5 minutos, em temperatura ambiente e desidratadas em uma série de etanol a 70%, 85% e 100%, 5 minutos em cada banho. A seguir, foram tratadas com solução de RNase (100 µg/ml) durante 1 hora, em câmara úmida a 37°C, lavadas duas vezes em solução de 2xSSC, por 10 minutos e em PBS 1X, por 5 minutos. Em seguida a fixação com formaldeído 1% / PBS 1x / MgCl₂ 50mM, por 10 minutos, à temperatura ambiente, lavagem em PBS 1x por 5 minutos e desidratação em série de etanol a 70%, 85% e 100%, 5 minutos cada banho, à temperatura ambiente. As lâminas foram então tratadas com formamida 70% dissolvida em 2xSSC, a 70°C, por 5 minutos e novamente desidratadas em série de etanol a 70%, 85% e 100%, 5 minutos cada banho.

Foram aplicados, sobre as lâminas, cerca de 50 µl da solução de hibridação permanecendo *overnight* a 37°C, em câmara úmida contendo solução de 2xSSC pH 7,0. Decorrido este tempo, as lâminas foram lavadas com solução de formamida 15% em 0,2xSSC pH 7,0 por 20 minutos, a 42°C e, em seguida, lavadas em *Tween* 20, por 5 minutos; incubação em tampão NFDm/Anti-digoxi rodamina ou NFDm/Estreptavidina a 5%, por 1 hora em câmara úmida, a temperatura ambiente. As lâminas foram então lavadas 3 vezes em *Tween* 20, cinco minutos cada. Em seguida a desidratação em série de etanol a 70%, 85% e 100% à temperatura ambiente, 5 minutos em cada banho. Os cromossomos foram então contra corados com DAPI (0,2 µg/ml) diluído em uma solução “*antifade*” (Fluka).