
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(Biologia Celular e Molecular)**

RAFAEL SPLENDORE DE BORBA

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ELEMENTOS
RETROTRANSPONÍVEIS DA FAMÍLIA REX DO GENOMA DE ESPÉCIES DO
GÊNERO *Leporinus* SPIX, 1829 (TELEOSTEI: ANOSTOMIDAE)**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular.

Dezembro

2013

RAFAEL SPLENDORE DE BORBA

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ELEMENTOS
RETROTRANSPONÍVEIS DA FAMÍLIA REX DO GENOMA DE ESPÉCIES
DO GÊNERO *Leporinus* SPIX, 1829 (TELEOSTEI: ANOSTOMIDAE)**

Orientadora: Patrícia Pasquali Parise-Maltempi

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular.

**RIO CLARO
2013**

597

B726i

Borba, Rafael Splendore de

Identificação e caracterização de elementos retrotransponíveis da família Rex do genoma de espécies do gênero *Leporinus* SPIX, 1829 (Teleostei: anostomidae) / Rafael Splendore de Borba. - Rio Claro, 2013
61 f. : il., figs., tabs., fots., mapas

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientador: Patricia Pasquali Parise-Maltempi

1. Peixe. 2. Citogenética molecular. 3. DNA repetitivo. 4. Elementos transponíveis. 5. FISH. 6. Characiformes. I. Título.

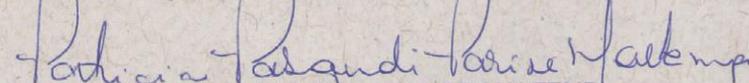
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ELEMENTOS RETROTRANSPONÍVEIS DA FAMÍLIA REX DO GENOMA DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Leporinus* SPIX, 1829 (TELEOSTEI: ANOSTOMIDAE)

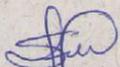
AUTOR: RAFAEL SPLENDORE DE BORBA

ORIENTADORA: Profa. Dra. PATRICIA PASQUALI PARISE MALTEMPI

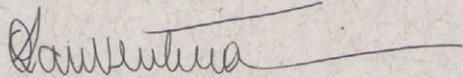
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. PATRICIA PASQUALI PARISE MALTEMPI
Departamento de Biologia / Instituto de Biociências de Rio Claro



Prof. Dr. EDSON LOURENÇO DA SILVA
Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Piauí, IFPI



Profa. Dra. KAREN VENTURA
Universidade de São Paulo, USP, Instituto de Biociências

Data da realização: 09 de dezembro de 2013.

*Dedico este trabalho aos meus pais e
as minhas avós, que sempre me
apoiaram em todas as minhas
escolhas.*

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço aos meus pais, Silvia e Antonio, por todo apoio e confiança que depositaram em mim, por me ensinar o valor da ética, da integridade e da tolerância, e por me mostrar a importância de sempre dar o melhor de si em todas as suas escolhas.

Agradeço a Prof^a Dr^a Patrícia Pasquali Parise-Maltempì pela amizade, paciência e confiança, e principalmente por me ensinar o significado de ser um professor e um orientador que está presente em todas em todas as etapas de nossa formação e ao mesmo tempo nos deixa livres para traçar nossos próprios caminhos dentro de nossa pesquisa.

Ao Prof. Dr. Diogo Cavalcanti Cabral-de-Mello e a Prof^a Dr^a Marielle Cristina Schneider pela amizade e pelo grande apoio intelectual que ofereceram para a finalização deste trabalho.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (2012\01437-0) pelo apoio financeiro cedido para o desenvolvimento do projeto.

Agradeço a todos os amigos do departamento, Bairral, Cris, Cintia, Simone, Thiago, Daniela, Diovani, Octavio, Dioguinho, Keteryne, Carol, Júlia, Matraca, Allison, Tati, Vivi e Amália pela ótima convivência durante todas as semanas de trabalho. Aos amigos que agora estão longe, mas sempre podemos contar para todos os momentos: Josi, Tamaris, Edson e Tati.

Um agradecimento especial as B* do Lab P* Allison, Kethy, Matraca, Tati, Pedrita e Vivi pela amizade que vou levar para sempre, pelas discussões instrutivas, pelas trocas de experiências e pela ampla variedade de assuntos que discutimos todos os dias quando almoçamos juntos.

Agradeço também aos amig@s Pedrita, Clara, Ricota, Larva, Regis, Lu, Gabi, Bauru, Fi, Pira, Bre, Bis e Nery, pela amizade que levamos desde 2007 e vamos levar para sempre, pelas festas, viagens, churrascos, jantas e pequenos outros momentos de descontração que tornam o passar dos dias mais gostoso e agradável.

“Cegueira também é isto, viver num mundo onde se tenha acabado a esperança”

(José Saramago)

RESUMO

A família Anostomidae é um interessante modelo para estudos de elementos repetitivos, principalmente devido à presença de elevado número de segmentos heterocromáticos relacionados a um sistema peculiar de heterogametia feminina, que é restrita a algumas espécies pertencentes ao gênero *Leporinus*. Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo realizar um mapeamento cromossômico dos elementos retrotransponíveis *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* nos cromossomos de seis espécies do gênero *Leporinus*: *L. elongatus*, *L. macrocephalus* e *L. obtusidens*, as quais possuem sistema de cromossomos sexuais, e *L. friderici*, *L. lacustris* e *L. striatus*, a fim de aumentar o conhecimento a respeito da organização do genoma do gênero, observar a relação desses elementos com regiões heterocromáticas importantes e se a distribuição é compatível com a hipótese de uma macroestrutura cariotípica estável para o gênero. A amplificação e o sequenciamento dos elementos *Rex1* e *Rex3*, mostraram diferentes composições referentes ao número de pares de bases destes elementos para as diferentes espécies analisadas, já o elemento *Rex6* não foi identificado no genoma das espécies estudadas. A técnica de FISH utilizando o elemento *Rex1* como sonda resultou em diferentes padrões de distribuição: *Leporinus elongatus*, *L. macrocephalus* e *L. obtusidens* apresentaram clusters isolados na região terminal e as outras espécies apresentaram sinais dispersos em todos os cromossomos e pequenos sinais na posição terminal de alguns cromossomos. O elemento *Rex3* se apresentou acumulado principalmente na posição terminal, em todos os cromossomos de todas as espécies. O cromossomo W de *L. elongatus*, *L. macrocephalus* e *L. obtusidens*, apresenta um sinal positivo de *Rex1* e *Rex3* na posição intersticial do braço longo. Algumas variações de sinais de hibridação foram observadas entre as diferentes espécies. Estes resultados sugerem a ocorrência de diferentes graus de atividade destes elementos durante o processo evolutivo das espécies analisadas. Apesar da macroestrutura cariotípica conservada das espécies de *Leporinus*, nossos resultados mostraram algumas variações nos padrões de hibridação, especialmente entre o grupo constituído por espécies com cromossomos sexuais e aquelas nas quais este sistema não está presente. As marcações idênticas observadas no cromossomo W de *L. elongatus*, *L. macrocephalus* e *L. obtusidens* reforçam a hipóteses da origem comum deste cromossomo nestas espécies.

Palavras-chave: DNA repetitivo, elementos transponíveis, FISH, Characiformes.

ABSTRACT

The Anostomidae family is an interesting model for repetitive elements studies, mainly due the presence of high number of heterochromatic segments related to a peculiar system of female heterogamety, which is restricted to a few species belonging to the *Leporinus* genus. In this way we performed a cytogenetic mapping of retrotransposable elements *Rex1*, *Rex3* and *Rex6* in chromosomes of *Leporinus*: *L. elongatus*, *L. macrocephalus* and *L. obtusidens*, which have sex chromosomes system, and *L. friderici*, *L. lacustris* and *L. striatus*, in order to increase the knowledge of the genomic organization of the genus, observe if these elements are related to heterochromatic regions and whether its distribution is compatible with the hypothesis of a stable macrostructure kept in the karyotype of the genus. Amplification and sequencing of the elements *Rex1* and *Rex3* showed different compositions regarding the number of base pairs of these elements for these species, but the *Rex6* element has not been identified in genome of the species studied. The FISH technique using *Rex1* element as probe resulted different distribution pattern: *Leporinus elongatus*, *L. macrocephalus* and *L. obtusidens* presented clusters isolated in the terminal region and the others species present signals disperse in all chromosomes and some signals on terminal position. The *Rex3* signals are accumulated mainly in terminal position in all chromosomes for all species. The W chromosome of *L. elongatus*, *L. macrocephalus* and *L. obtusidens*, presents *Rex3* signal on interstitial position. Some variations were observed regarding the hybridization signals among species. These results suggest the occurrence of different levels of activity of these elements during the evolutive process of the species analyzed. Despite the quite conserved karyotypic macrostructure of *Leporinus* species, through our results was possible to observe some variation on hybridization signals pattern, specially among the group composed by species with sex chromosomes and that comprised by the species without this differentiated system. The identical markings observed on the W chromosome of *L. elongatus*, *L. macrocephalus* and *L. obtusidens* reinforce the hypothesis of a common origin of this chromosome in these species.

Keywords: Repetitive DNA, transposable elements, FISH, Characiformes.

SUMÁRIO

1.0- INTRODUÇÃO	11
1.1- ELEMENTOS REPETITIVOS DO GENOMA	11
1.2- ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS DO GENOMA	12
1.3- ELEMENTOS RETROTRANSPONÍVEIS DA FAMÍLIA REX	16
1.4- FAMÍLIA ANOSTOMIDAE COMO MODELO DE ESTUDO DE ELEMENTOS REPETITIVOS	21
2.0- OBJETIVOS.....	24
2.1- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3.0- MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1- MATERIAL	25
3.2- MÉTODOS	26
3.2.1- PREPARAÇÃO DE CROMOSSOMOS MITÓTICOS	26
3.2.2- EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO	27
3.2.3- AMPLIFICAÇÃO DO DNA VIA PCR	29
3.2.4- CLONAGEM DOS PRODUTOS DE PCR.....	30
3.2.5- PREPARO DOS MEIOS DE CULTIVO	30
3.2.6- TRANSFORMAÇÃO	31
3.2.7- MANUSEIO DOS CLONES RECOMBINANTES	31
3.2.8- REAÇÃO DE PCR DOS CLONES RECOMBINANTES	32
3.2.9- SEQUENCIAMENTO DAS AMOSTRAS	32
3.2.10- EDIÇÃO E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS	33
3.2.11- HIBRIDAÇÃO IN SITU FLUORESCENTE.....	33
3.2.12- TRATAMENTO DAS LÂMINAS PARA FISH	34
3.2.13- DESNATURAÇÃO DOS CROMOSSOMOS	35
3.2.14- PREPARAÇÃO DAS SONDAS E INCUBAÇÃO DAS LÂMINAS	35
3.2.15- LAVAGENS E DETECÇÃO.....	35
4.0- RESULTADOS.....	37
5.0- CONCLUSÕES FINAIS	58
6.0- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Elementos repetitivos do genoma

Nos organismos eucariotos são encontradas grandes quantidades de segmentos repetitivos de DNA, que foram considerados por muitos anos DNA “lixo” (NOWAK, 1994), mas que nos últimos anos vem sendo destacado com grande importância em inúmeras publicações. Diversos trabalhos têm sugerido que as sequências repetitivas estão envolvidas de maneira crucial em importantes processos evolutivos, como a regulação e reparo de alguns genes (MEDSTRAND et al., 2005; SHAPIRO e STERNBERG, 2005) e a diferenciação de cromossomos sexuais de algumas espécies (STEINEMANN e STEINEMANN, 2005; PARISE-MALTEMPI et al., 2007). Além disso, estas sequências também podem compor estruturas fundamentais dos cromossomos dos eucariotos como centrômeros, telômeros e outras regiões heterocromáticas (SHAPIRO e STERNBERG, 2005).

Os segmentos heterocromáticos dos cromossomos são normalmente ricos em elementos repetitivos que por sua vez são constituídos por sequências de diferentes comprimentos e composições que aparecem repetidas no genoma (CHARLESWORTH et al., 1994). Existe uma grande diversidade de elementos repetitivos encontrados no genoma dos eucariotos de tamanhos que variam de 100pb a 100Mp e são definidos como segmentos de DNA variáveis que podem apresentar até milhares de cópias no genoma. Tais sequências podem ser classificadas como codificadoras, com funções biológicas bem definidas e compostas por centenas ou milhares de cópias, como é o caso das famílias multigênicas ribossomais 45S, o rDNA 5S e as hitonas (MARTINS et al., 2004; GRIFFITHS et al., 2009) ou como não codificadoras. Podem estar organizadas em tandem como ocorre com os DNAs satélites, minissatélites e

microsatélites (CHARLESWORTH et al., 1994) ou podem estar dispersas em todo genoma, como é o caso dos elementos transponíveis (transposons e retrotransposons) (BOHNE et al., 2008).

Os estudos com elementos repetitivos do genoma são extremamente úteis para a compreensão de inúmeras questões de cunho estrutural e evolutivo de diferentes sequências genômicas, como por exemplo, as estruturas centroméricas e teloméricas dos cromossomos, a origem e evolução de cromossomos sexuais e supranumerários e evolução do genoma como um todo (MARTINS et al., 2004).

1.2 Elementos transponíveis do genoma

Os elementos transponíveis foram descobertos em 1950, durante um estudo conduzido por Bárbara McClintock, envolvendo grãos coloridos do milho indiano. Essa descoberta, que posteriormente permitiu o isolamento e a caracterização das propriedades genéticas desses elementos no genoma de outros organismos como *Drosophila melanogaster*, *Escherichia coli*, *Caenorhabditis elegans* e *Homo sapiens*, rendeu a McClintock o prêmio Nobel em 1983 (GRIFFITHS et al., 2009; BERG e HOWE, 1989). Podendo apresentar desde poucas até centenas de cópias em todo o genoma (VOLFF, 2006), estes elementos mostram-se presentes na maioria dos organismos, compondo grande parte das sequências moderadamente repetidas de bactérias, fungos, plantas e animais, podendo representar cerca de 50% do genoma de *Homo sapiens* (homem), 60% do genoma de *Zea mays* (milho), 77% de *Rana esculenta* (rã) e 40% de *Mus musculus* (camundongo). Porém, em organismos unicelulares, como *Saccharomyces cerevisiae* (levedura) e *Escherichia coli* (bactéria), estes elementos

representam apenas uma pequena parte do genoma: cerca de 5% e 0,3%, respectivamente (BIÉMONT e VIEIRA, 2006).

Os elementos transponíveis são classificados de acordo com os mecanismos de transposição realizados, o que permite agrupá-los em duas classes: a classe I que compõe os retrotransposons e a classe II que compõe os transposons (KIDWELL, 2000). Os retrotransposons também são subdivididos em duas subclasses: os retrotransposons com longas repetições terminais (LTR) e os sem (CAPY et al., 1998) (Figura 1). Tais elementos utilizam um mecanismo de transposição que se inicia com a transcrição completa do elemento alvo, dando origem a um transcrito de RNA. Esta molécula codifica a enzima transcriptase reversa que inicia uma reação de transcrição reversa na molécula de RNA produzida a partir do DNA alvo inicial, originando uma nova fita de DNA, formando assim um intermediário híbrido DNA/RNA. A enzima integrase insere a sequência produzida em uma nova posição na cadeia completa de DNA (Figura 2). Desde que a cópia original do cromossomo seja mantida no local original, este mecanismo resulta em uma duplicação, tornando-o responsável pelo grande número de cópias de retroelementos no genoma dos organismos hospedeiros (BÖHNE et al., 2008).

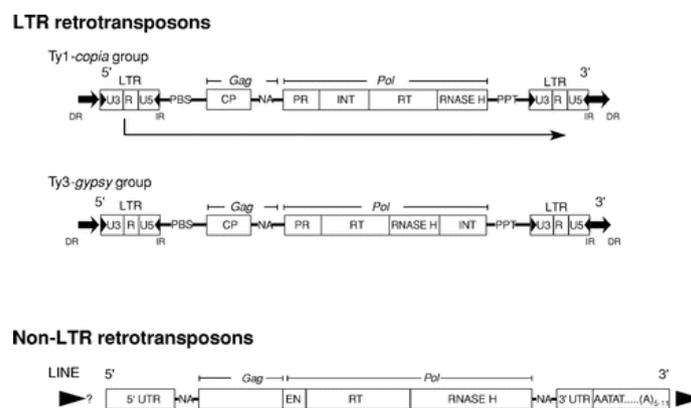


Figura 1: Esquema representando a estrutura de LTR e não-LTR retrotransposons. Kumar e Bennetzen (1999).

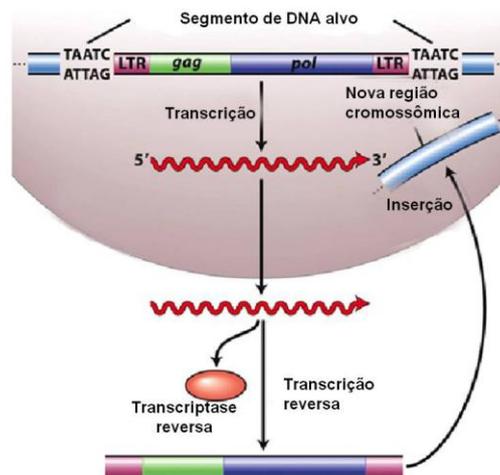


Figura 2: Esquema representando o mecanismo de retrotransposição de DNA. Adaptado de Griffiths 9ª Ed.

Os transposons (classe II) são divididos em subclasses ou famílias de acordo com a similaridade entre as suas sequências, encontram-se dispersos pelo genoma de procariontes e eucariontes, possuem terminações repetidas invertidas e codificam para a enzima transposase (CHARLESWORTH, 1994; FESHOTTE e PRITHMAN, 2007). Os mecanismos de transposição variam entre uma classe e outra de transposons, porém o mecanismo mais conhecido de transposição é mediado pela enzima transposase que retira e reintegra a sequência de DNA alvo a uma nova posição no genoma, e este mecanismo pode ou não ser replicativo (Figura 3). Na transposição replicativa a sequência inicial se mantém no local original enquanto a cópia é inserida em um novo local. Portanto, este mecanismo é acompanhado por um aumento no número de cópias do transposon (CHARLESWORTH, 1994; LEWIN, 2004). Na transposição não-replicativa, não ocorre duplicação da sequência alvo e o elemento transponível se desloca diretamente de um local para outro mantendo suas características.

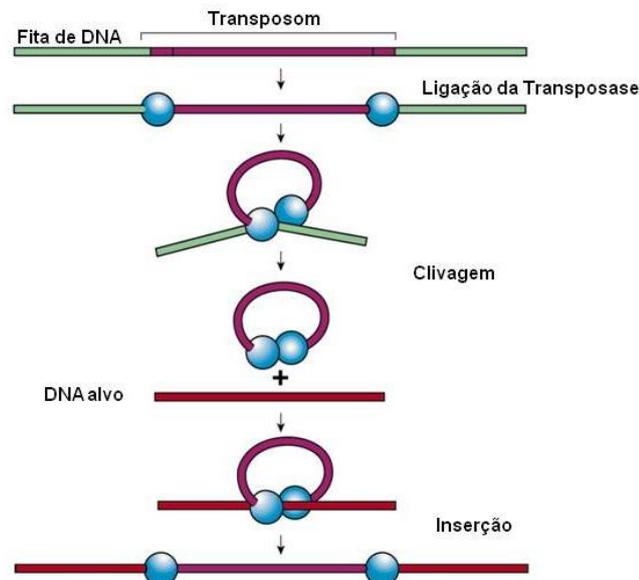


Figura 3: Esquema representando o mecanismo de transposição de DNA. Adaptado de Science (2000).

Os transposons e os retrotransposons podem influenciar a trajetória evolutiva do organismo hospedeiro de três maneiras distintas: 1) causando alterações na função dos genes através da inserção; 2) induzindo rearranjos cromossômicos; 3) permitindo a emergência de novos genes ou novas sequências regulatórias (FESCHOTTE e PRITHAM, 2007), podendo estar associados com eventos de especiação (BÖHNE et al., 2008). Tendo isso em vista, os elementos transponíveis podem ser considerados um dos principais promotores da diversidade genômica e biológica dos vertebrados em geral, possuindo um importante papel nos eventos de especiação e de microevolução. Estudos também apontam que os vertebrados apresentam inseridos em seu genoma diferentes classes de elementos transponíveis. Isso ocorre essencialmente devido a

evolução diferencial das famílias de elementos transponíveis, com cenários evolutivos que vão desde a completa extinção destes elementos do genoma como a introdução de uma linhagem específica de elementos transponíveis (BÖHNE et al., 2008).

Em alguns organismos estes elementos podem se acumular em regiões terminais, pericentroméricas e em outras regiões heterocromáticas dos cromossomos, onde a taxa de recombinação é reduzida. Dessa forma, as altas taxas de recombinação no genoma parecem estar negativamente correlacionadas com a distribuição dos elementos transponíveis (KIDWELL, 2005). Os retrotransposons também podem mediar rearranjos cromossômicos como deleções, inversões, translocações, duplicações e ampliações (OSOUF-COSTAZ, 2004). Assim estes elementos podem ser empregados como importantes marcadores para mapeamento cromossômico.

1.3 Elementos retrotransponíveis da família *Rex*

Uma importante classe de elemento retrotransponível que tem sido alvo de vários estudos em diversos grupos são os elementos da família *Rex* (*Rex1*, *Rex3* e *Rex6*). Por exemplo, Volff et al. (2000) revelou que o elemento *Rex1* esteve frequentemente ativo durante a evolução do genoma dos peixes, e pode ser identificado em todos os ancestrais de Acanthopterygii e as sequências apresentam um alto grau de similaridade entre os grupos estudados, mesmo estes sendo filogeneticamente distantes.

Também foi relatado por Mazzuchelli (2008) que as sequências de elementos da família *Rex* (*Rex 1* e *Rex 3*) em Ciclídeos (Perciformes) apresentaram uma grande similaridade com as sequências de outras espécies de peixes distribuídas em outras ordens, como Cyprinodontiformes e Tetraodontiformes. Tais resultados concordam com

estudos previamente publicados que demonstraram que estes elementos se encontram amplamente distribuídos no genoma dos peixes (VOLFF et al., 2000; OZOUF-COASTAZ et al., 2004). Neste mesmo trabalho, Mazzuchelli (2008) também observou um alto grau de conservação nas sequências do elemento *Rex6* que apresentaram interessante similaridade entre peixes e outros grupos, como répteis, *Geochelone pardalis*, plantas, *Arabidopsis lyrata*, *Zostera marina*, micro-organismos, *Prunus necrotic*, primatas, *Lepilemur dorsalis*, e com a espécie humana, *Homo sapiens*.

Em outro trabalho também envolvendo os mesmos elementos retrotransponíveis *Rex1e Rex3*, Osouf-Costaz et al. (2004), mostraram que os valores de Ω (razão entre as substituições sinônimas e não sinônimas) foram, geralmente, maiores que um, o que indica que os genes responsáveis pelo processo de transcrição reversa destes elementos podem ter evoluído através da seleção “purificadora”, e que ambos os retrotransposons estiveram ativos durante a evolução das espécies da família Nototheniidae (endêmica do Oceano Austral). Com estes resultados os autores sugerem ainda que estes elementos permanecem ativos no genoma de peixes antárticos recentes, e devido ao grau de identidade interespecífica entre as cópias de nucleotídeos, a divergência ocorrida entre as espécies estudadas não é tão antiga (OSOUF-COSTAZ et al., 2004).

Os elementos retrotransponíveis da família *Rex* tem sido empregados em estudos de mapeamento cromossômico de diversos grupos de peixes, como representantes das famílias Cichlidae (MAZZUCHELLI e MARTINS, 2009; VALENTE et al., 2010, TEIXEIRA et al., 2009; GROSS et al., 2010; FANTINATTI et al., 2012), Tetraodontidae (DA SILVA et al., 2002; BOUNEAU et al., 2003; FISCHER et al., 2004), Nototheniidae, Artedidraconidae, Bathydraconidae, Bovichtidae (OSOUF-COSTAZ et al., 2004), Loricariidae (FERREIRA et al. 2010) e outros grupos (Tabela

1). Apesar desta quantidade de informação, os estudos relacionados a estes elementos ainda estão se iniciando na fauna de peixes, tendo em vista a enorme diversidade de espécies que compõem esse grupo.

Tabela 1: Padrões de distribuição cromossômica dos elementos *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* em peixes: clusters dispersos (D), sinais pericentroméricos (P), sinais subterminais (S).

Ordem	Família	Espécies	Elemento retrotransponível	Localização cromossômica	Referências
Characiformes	Anostomidae	<i>Leporinus elongatus</i>	<i>Rex1 - Rex3</i>	S*	Presente trabalho
		<i>Leporinus frederici</i>	<i>Rex1 - Rex3</i>	D-S	Presente trabalho
		<i>Leporinus lacustris</i>	<i>Rex1 - Rex3</i>	D-S	Presente trabalho
		<i>Leporinus macrocephalus</i>	<i>Rex1 - Rex3</i>	S*	Presente trabalho
		<i>Leporinus obtusidens</i>	<i>Rex1 - Rex3</i>	S*	Presente trabalho
		<i>Leporinus striatus</i>	<i>Rex1 - Rex3</i>	D-S	Presente trabalho
	Bryconinae	<i>Brycon amazonicus</i>	<i>Rex1 - Rex3</i>	D	Silva (2012)
		<i>Brycon orbignyianus</i>	<i>Rex1 - Rex3</i>	D	Silva (2012)
	Erythrinidae	<i>Erythrinus erythrinus</i>	<i>Rex3</i>	D	Cioffi et al. (2010)
	Prochilodontidae	<i>Prochilodus lineatus</i>	<i>Rex1</i>	S-P	Voltoilin (2012)
<i>Prochilodus nigricans</i>		<i>Rex1</i>	S-P	Voltoilin (2012)	
Gymnotiformes	Sternopygidae	<i>Eigenmannia</i> sp.1	<i>Rex1 - Rex3</i>	D	Sene (2011)
		<i>Eigenmannia</i> sp.2	<i>Rex1 - Rex3</i>	D	Sene (2011)
		<i>Eigenmannia</i> cf. <i>trilineata</i>	<i>Rex1 - Rex3</i>	D	Sene (2011)
		<i>Eigenmannia virescens</i>	<i>Rex1 - Rex3</i>	D	Sene (2011)
Perciformes	Artedidraconidae	<i>Artedidraaco shackletoni</i>	<i>Rex1 - Rex3</i>	D	Ozouf-Costaz et al. (2004)
	Bathydraconidae	<i>Gymnodraco acuticeps</i>	<i>Rex1 - Rex3</i>	D	Ozouf-Costaz et al. (2004)
		<i>Gymnodraco victori</i>	<i>Rex1 - Rex3</i>	D	Ozouf-Costaz et al. (2004)
	Bovichtidae	<i>Bovichtus angustifrons</i>	<i>Rex1 - Rex3</i>	D	Ozouf-Costaz et al. (2004)
	Channichthyidae	<i>Chionodraco hamatus</i>	<i>Rex1 - Rex3</i>	D	Ozouf-Costaz et al. (2004)
		<i>Neopagetopsis ionah</i>	<i>Rex1 - Rex3</i>	D	Ozouf-Costaz et al. (2004)
	Cichlidae	<i>Oreochromis niloticus</i>	<i>Rex1-Rex3-Rex6</i>	P**	Valente et al. (2011)
		<i>Haplochromis obliquidens</i>	<i>Rex1-Rex3-Rex6</i>	P ⁺	Valente et al. (2011)
		<i>Hemichromis bimaculatus</i>	<i>Rex1-Rex3-Rex6</i>	P	Valente et al. (2011)
		<i>Melanochromis auratus</i>	<i>Rex1-Rex3-Rex6</i>	P	Valente et al. (2011)
		<i>Astronotus ocellatus</i>	<i>Rex1-Rex3-Rex6</i>	P-S	Valente et al. (2011), Mazuchelli e Martins (2009), Schneider et al. (2013)
		<i>Satanoperca jurupari</i>	<i>Rex1-Rex3-Rex6</i>	P [#]	Valente et al. (2011)
		<i>Heros efasciatus</i>	<i>Rex1-Rex3-Rex6</i>	P	Valente et al. (2011)
		<i>Chaetobranchius flavescens</i>	<i>Rex1-Rex3-Rex6</i>	P	Valente et al. (2011)
		<i>Astronotus ocellatus</i>	<i>Rex1-Rex3-Rex6</i>	P	Mazuchelli e Martins (2009)
<i>Astatotilapia latifasciata</i>		<i>Rex1 - Rex3</i>	P-D	Fantinatti et al. (2012)	
<i>Cichla kelberi</i>		<i>Rex1-Rex3-Rex6</i>	P	Teixeira et al. (2009)	
<i>Symphysodon aequifasciatus</i>		<i>Rex3</i>	P	Gross et al. 2010	
<i>Symphysodon discus</i>		<i>Rex3</i>	P-S-D	Gross et al. 2010, Schneider et al. (2013)	
<i>Symphysodon haraldi</i>	<i>Rex3</i>	P	Gross et al. 2010		

Cont. Tabela 1: Padrões de distribuição cromossômica dos elementos <i>Rex1</i> , <i>Rex3</i> e <i>Rex6</i> em peixes: clusters dispersos (D), sinais pericentroméricos (P), sinais subterminais (S).					
Ordem	Família	Espécie	Elemento retrotransponível	Localização cromossômica	Referências
Perciformes	Chicliidae	<i>Cichla monoculus</i>	<i>Rex1-Rex3-Rex6</i>	S-D	Schneider et al. (2013)
		<i>Geophagos proximus</i>	<i>Rex1-Rex3-Rex6</i>	S-D	Schneider et al. (2013)
		<i>Pterophyllum scalare</i>	<i>Rex1-Rex3-Rex6</i>	S-D	Schneider et al. (2013)
Perciformes	Nototheniidae	<i>Dissostichus mawsoni</i>	<i>Rex1 - Rex3</i>	D	Ozouf-Costaz et al. (2004)
		<i>Notothenia coriiceps</i>	<i>Rex1 - Rex3</i>	D	Ozouf-Costaz et al. (2004)
		<i>Patagonotothen tessellata</i>	<i>Rex1 - Rex3</i>	D	Ozouf-Costaz et al. (2004)
		<i>Trematomus bernacchii</i>	<i>Rex1 - Rex3</i>	D	Ozouf-Costaz et al. (2004)
		<i>Trematomus hansonii</i>	<i>Rex1 - Rex3</i>	D	Ozouf-Costaz et al. (2004)
		<i>Trematomus newnesi</i>	<i>Rex1 - Rex3</i>	D	Ozouf-Costaz et al. (2004)
		<i>Trematomus pennellii</i>	<i>Rex1 - Rex3</i>	D	Ozouf-Costaz et al. (2004)
		<i>Hisonotus leucofrenatus</i>	<i>Rex1 - Rex3</i>	D	Ferreira et al. (2011)
Siluriformes	Loricariidae	<i>Parotocinclus maculicauda</i>	<i>Rex1 - Rex3</i>	D	Ferreira et al. (2011)
		<i>Parotocinclus tietensis</i>	<i>Rex1 - Rex3</i>	D	Ferreira et al. (2011)
		<i>Harttia kronei</i>	<i>Rex1-Rex3-Rex6</i>	D	Blanco (2012)
		<i>Harttia longipinna</i>	<i>Rex1-Rex3-Rex6</i>	D	Blanco (2012)
		<i>Harttia gracilis</i>	<i>Rex1-Rex3-Rex6</i>	D	Blanco (2012)
		<i>Harttia punctata</i>	<i>Rex1-Rex3-Rex6</i>	D	Blanco (2012)
		<i>Harttia loricariformis</i>	<i>Rex1-Rex3-Rex6</i>	D	Blanco (2012)
		<i>Harttia torrenticula</i>	<i>Rex1-Rex3-Rex6</i>	D	Blanco (2012)
		<i>Harttia carvalhoi</i>	<i>Rex1-Rex3-Rex6</i>	D	Blanco (2012)
		<i>Hypostomus ancistroides</i>	<i>Rex1</i>	D	Pansonato-Alves (2013)
		<i>Hypostomus nigromaculatus</i>	<i>Rex1</i>	D	Pansonato-Alves (2013)
		<i>Hypostomus strigaticeps</i>	<i>Rex1</i>	D	Pansonato-Alves (2013)
		Pimelodidae	<i>Steindachneridion melanoderdatum</i>	<i>Rex3</i>	S
Tetraodontiformes	Tetraodontidae	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	<i>Rex1 - Rex3</i>	S-P	Silva et al. (2002) Bouneau et al. (2003) Fischer et al. (2004)

* sinal intersticial no cromossomo W.
** no segundo par de cromossomos o elemento *Rex1* é disperso no braço q.
+ no primeiro par de cromossomos o elemento *Rex1* é disperso no braço q.
terceiro e 23º par possuem sinais terminais e intersticiais.

1.4 Família Anostomidae como modelo de estudo de elementos repetitivos

Os anostomídeos são caracterizados por possuírem o corpo normalmente alongado, nadadeira anal curta (com menos de 10 raios ramificados, com exceção de *Abramites*), membranas branquiais unidas ao istmo, narina anterior formando um tubo, uma única série de dentes, com três ou quatro dentes, em cada pré-maxilar ou dentário e ausência de dentes no maxilar e no palato (GÉRY, 1977). A família é composta por cerca de 150 espécies alocadas em 12 gêneros, e se apresenta distribuída na América do Sul e Central, sendo que no Brasil, existem representantes em todas as bacias hidrográficas (GÉRY, 1977; GARAVELLO e BRITISKI, 2003).

A estrutura cariotípica da família é bastante conservada, com um total de 41 espécies estudadas citogeneticamente até momento, o número diplóide de 54 cromossomos dos tipos meta e submetacêntricos e um sistema de NOR simples se mantém constante para todas as espécies. O gênero *Leporinus* possui cerca de 90 espécies descritas e é um dos mais estudados do ponto de vista citogenético, com 25 espécies já cariotipadas. As espécies do gênero também apresentam um sistema peculiar de heterogametia feminina que é restrito a sete espécies (GALETTI et al., 1995). Tal sistema é caracterizado pela presença de cromossomos sexuais do tipo ZZ/ZW nas espécies *L. elongatus* (VALENCIENNES, 1847), *L. macrocephalus* (GARAVELLO e BRITISKI, 1988), *L. obtusidens* (VALENCIENNES, 1849), *L. reinhardti* (LÜTKEN, 1875), *L. silvestrii* (BOULENGER, 1902), *L. conirostris* (STEINDACHNER, 1875) e *L. trifasciatus* (STEINDACHNER, 1876), nas quais o cromossomo W é quase que totalmente heterocromático (GALETTI e FORESTI, 1986; PARISE-MALTEMPI et al., 2007). Tais características tornam tanto o gênero *Leporinus* quanto a família Anostomidae interessantes modelos para estudos de elementos repetitivos.

Nakayama et al. (1994), por exemplo, isolaram dois elementos repetitivos da espécie *L. elongatus* e um destes elementos foi utilizado como sonda que hibridou especificamente o cromossomo W de fêmeas desta espécie. No entanto, três indivíduos ZW não tiveram seus cromossomos W marcados pela sonda, sugerindo que estes cromossomos sexuais atípicos teriam perdido essas regiões satélites através de eventos de recombinação entre os cromossomos Z e W. Koehler et al. (1997) isolaram um DNA satélite de 483pb de indivíduos de *L. obtusidens* que foi hibridado em cromossomos de outros indivíduos da mesma espécie, bem como em cromossomos de indivíduos de *L. elongatus*. Com esses resultados, foi detectado um polimorfismo, além das marcações obtidas revelarem a presença deste DNA satélite na região pericentromérica de um único par de cromossomos em ambas as espécies, tornando-o um possível marcador para o gênero.

Com o uso de técnicas de digestão enzimática, Parise-Maltempo et al. (2007) isolaram do genoma de *L. elongatus* um elemento repetitivo de aproximadamente 650pb denominado *LeSpeI*. Utilizando a técnica de hibridação *in situ* com sondas destas sequências em indivíduos da mesma espécie, neste mesmo trabalho foi observado que esta sequência estava presente nos cromossomos sexuais e autossomos, o que levou os autores a proporem um possível sistema sexual múltiplo do tipo Z1Z1Z2Z2/Z1W1Z2W2, sugerindo que a espécie ainda está em processo evolutivo de diferenciação dos cromossomos sexuais. Estas mesmas sequências foram úteis na discriminação de híbridos específicos de *L. macrocephalus* e *L. elongatus* em sistemas de piscicultura (HASHIMOTO et al., 2009) e foram também identificadas nas espécies *L. macrocephalus* e *L. obtusidens* outras espécies do gênero por Marreta et al. (2012).

Outros estudos envolvendo sequências repetitivas e sondas produzidas a partir do cromossomo W microdissectado, foram conduzidos em espécies da família para fins de mapeamento cromossômico e estudos sobre a evolução do sistema cromossômico sexual, investigação a relação deste tipo de sequência com a NOR e ainda a caracterização de um possível elemento transponível no genoma de espécies da família (PARISE-MALTEMPI et al., 2013; SILVA et al. 2012, 2013).

O alto conteúdo heterocromático que esta presente tanto nos autossomos quanto nos cromossomos sexuais de espécies de *Leporinus* (GALETTI et al., 1991; GALETTI et al., 1995) evidencia a presença de um grande número de sequências repetitivas no genoma desses peixes, o que caracteriza esse grupo um interessante modelo também para o estudo de elementos transponíveis. Desta forma, o presente trabalho visou a identificação e o mapeamento cromossômico dos elementos retrotransponíveis *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* em cromossomos de espécies do gênero *Leporinus*, a fim de aumentar o conhecimento a respeito da organização do genoma do gênero, observar se estes elementos estão relacionados a regiões heterocromáticas e se a sua distribuição é compatível com a hipótese de uma macroestrutura estável mantida no cariótipo do gênero.

2.0 OBJETIVO

O trabalho teve como objetivo identificar os elementos retrotransponíveis *Rex1*, *Rex3* e *Rex6*, no genoma de espécies do gênero *Leporinus* e mapear estes elementos nos cromossomos destas espécies.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar segmentos de DNA correspondentes aos elementos retrotransponíveis *Rex1*, *Rex3* e *Rex6*, no genoma de espécies do gênero *Leporinus*;
- Observar os graus de similaridade dos segmentos isolados;
- Realizar o mapeamento cromossômico destes elementos.

3.2 Métodos

3.2.1 Preparação de cromossomos mitóticos

As preparações cromossômicas foram realizadas a partir da porção anterior do rim dos animais seguindo a metodologia descrita por Foresti et al. (1981). O procedimento consistiu em injetar intra-abdominalmente, entre as nadadeiras peitorais e ventrais, solução aquosa de colchicina (0,025%) na proporção de 1 mL/ 100 g de peso do animal e deixar os peixes em aquário bem aerado por 50 minutos. Após este período, os animais foram sacrificados para a retirada do rim que foi dissociado em solução de KCl (0,075M) com o auxílio de pinças de dissecação e pipeta Pasteur, até a obtenção de uma solução homogênea. A solução foi então transferida para um tubo de centrífuga e deixada por 21 minutos em uma estufa a 37°C. Após este tempo, o material foi pré-fixado com 7 gotas de fixador gelado (metanol/ácido acético na proporção 3:1, respectivamente) por cinco minutos a temperatura ambiente e, seqüencialmente, foram adicionados 6 mL de fixador, com agitação da mistura e o tubo levado à centrífuga na velocidade de 900 rpm por 10 minutos.

Em seguida, o sobrenadante foi retirado e o precipitado ressuspendido em 7 mL de fixador, sendo a mistura centrifugada por 10 minutos a 900 -1000 rpm. Este passo foi repetido por duas vezes para que houvesse uma completa fixação e lavagem das células em suspensão. O material foi então armazenado em freezer a -20°C.

Para a análise cromossômica, algumas gotas da preparação foram pingadas sobre lâminas de microscopia. Após a secagem total das lâminas, estas foram coradas com

solução de Giemsa 5% por 10 minutos, as quais foram lavadas e secas ao ar para análise do material.

3.2.2 Extração de DNA genômico

O DNA total foi obtido utilizando-se amostras de músculo e/ou fígado e empregando a técnica de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (SAMBROOK e RUSSELL, 2001). Para isso, as amostras de tecidos foram colocadas em tubos eppendorf juntamente com a solução de lise (composta por 300 μ L de TNE 1X; 30 μ L de Tris-HCl 1M pH = 8,0; 20 μ L de SDS 10% e 25 μ L de Proteinase K/ 20mg/mL recém preparada. Os tubos foram submetidos à brusca agitação (vórtex) por 15 segundos cada.

Após estes procedimentos, os tubos foram mantidos em estufa a 37°C overnight, em seguida receberam 8 μ L de solução aquosa de RNase na concentração de 10 mg/mL e permaneceram em estufa na mesma temperatura por mais 1 hora, sendo agitados a cada 30 minutos. Transcorrido esse tempo, foram adicionados aos tubos com os tecidos completamente digeridos, 400 μ L de uma mistura de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25: 24: 1), utilizando-se a capela.

Mais uma vez o material foi submetido a uma brusca agitação por 30 segundos e, em seguida, centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos. Os tubos foram retirados da centrífuga com cuidado para não misturar as fases e o sobrenadante (fase alcoólica contendo DNA) foi transferido para um novo tubo devidamente identificado. Então, 60 μ L de acetato de sódio 3M (pH= 5,3) foram adicionados e o tubo foi invertido lentamente para a completa mistura do sal com a solução.

Posteriormente, mais 600 μL de etanol absoluto gelado foram acrescentados aos tubos, os quais foram invertidos como no passo anterior. Os tubos foram mantidos no freezer por 30 minutos e centrifugados a 14.000 rpm por 30 minutos para a completa retirada da mistura etanol e acetato de sódio. Em seguida o sobrenadante foi descartado, certificando-se que o precipitado de DNA continuou aderido à parede do tubo.

Os tubos receberam 150 μL de solução de etanol 70% a temperatura ambiente e foram novamente levados à centrífuga para agitação a 14.000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente, como na etapa anterior, para que o precipitado de DNA continuasse aderido à parede do tubo. Esse passo foi repetido mais uma vez para garantir a retirada de todo o sal adicionado ao DNA.

A partir daí, os tubos foram colocados abertos sobre folhas de papel absorventes em estufa a 37°C por 30 minutos para secagem do DNA. Após esse período, o DNA foi ressuspenso com 100 μL de água ultrapura autoclavada, por meio de agitação delicada do tubo para desprendimento total do DNA aderido à parede do tubo. O material foi levado para a estufa a 37°C por 30 minutos e, posteriormente, transferido para a geladeira (4°C) overnight. O armazenamento do mesmo foi feito em freezer (-20°C) para conservação por longo prazo.

A integridade do DNA extraído foi aferida baseando-se no padrão eletroforético gerado após corrida em gel de agarose na concentração de 1%, corado com 2 μL SYBR Safe (10.000X) (Invitrogen®), em 1 μL tampão de corrida blue juice (10X) e visualizado em um transiluminador de luz ultravioleta.

3.2.3 Amplificação do DNA via PCR

Foram realizados diversos testes de amplificação das sequências de DNA que correspondem aos elementos retrotransponíveis *Rex1*, *Rex3* e *Rex6*, até a obtenção de resultados favoráveis. A tabela 2 traz as particularidades dos conjuntos de primers, bem como os protocolos de amplificação.

Tabela 2. Primers e protocolo adotado nas reações para obtenção de sequências de *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* no genoma de diferentes espécies de *Leporinus*.

Nome	Primer	Volume	Programas
<i>Rex1</i>	F - AGCA AGCT AGAG AGTG CTGG	-6,25 µL mix PCR*;	1 - 95°C → 5'
	R - ACAG AGCG TGTG TGTT GTCC	-5,25 µL água;	2 - 95°C → 40''
<i>Rex3</i>	F - CGG TGA YAA AGG GCA GCC CTG	-0,5 µL Primer F;	3 - 55°C → 45''
	R - TGG CAG ACN GGG GTG GTG GT	-0,5 µL Primer R;	4 - 72°C → 5'
<i>Rex6</i>	F - TAA AGC ATA CAT GGA GCG CCAC	-1,0 µL DNA	5 - 72°C → 5'
	R - GGT CCT CTA CCA GAG GCC TGGG		

*Na solução de MIX PCR Qiagen estão contidas os reagentes Taq DNA polimerase 5U, tampão da enzima 10X, MgCl₂ 1,5mM e dDNTP (dideoxinucleotídeo trifosfato) 200µM.

O conjunto de primers utilizado foi o descrito por Volff et al. (1999, 2000), porém foram desenhadas sequências de primers específicos do elemento *Rex1* para o gênero *Leporinus* a partir das sequências descritas por Volff et al. (1999, 2000) utilizando a ferramenta OligoPerfect™ Designer (<http://tools.invitrogen.com>).

Os resultados das reações em cadeia da polimerase (PCR) foram visualizados em gel de agarose a 1,5% corados com SYBR safe (10.000X) (Invitrogen®), em 1 µL

tampão de corrida blue juice (10X), visualizados em transiluminador de luz ultravioleta. Os produtos foram estocados em freezer a -20°C.

3.2.4 Clonagem dos produtos de PCR

Os produtos de PCR foram clonados com o Kit Pgem-T (Promega). A reação de ligação foi realizada para cada produto a ser clonado. Para isso foi preparada uma reação que consistiu em colocar em um microtubo 5,0 µL de água ultrapura, 1 µL do tampão de reação 10x, 1,0 µL de plasmídeo Pgem-T (50ng), 5 µL do DNA amplificado e 1,0 µL de T4 DNA ligase. Essa preparação foi incubada a 4°C por um período de 12 a 16 horas.

3.2.5 Preparo dos meios de cultivo

Para o preparo do meio sólido foram diluídos 8 g Peptona, 8 g NaCl e 4 g Extrato de levedura em 800 mL de água, o pH da solução foi ajustado a 7 e foram adicionados a mistura 12 g de Agar. A mistura foi então autoclavada, e posteriormente deixada em fluxo laminar para esfriar. Ainda no fluxo laminar foi acrescentado à mistura o antibiótico Ampicilina (100 mg/mL) em uma proporção de 2 µL de antibiótico para cada mL de meio. Por fim foram montadas placas de meio com capacidade de 50mL.

Para o preparo do meio LB líquido foram diluídos 8 g Peptona, 8 g NaCl e 4 g Extrato de levedura em 800 mL de água, o pH da solução foi ajustado a 7. A mistura foi então autoclavada, e posteriormente o meio pronto foi mantido a 4°C em uma garrafa lacrada até a utilização.

3.2.6 Transformação

Nessa etapa foram pipetados em um microtubo 50 μL de células competentes de *Escherichia coli* linhagem Jm109 (Promega) e 10 μL do produto de ligação. Essa mistura foi agitada suavemente. As células foram incubadas no gelo por 30 minutos e submetidas a um choque térmico por exatos 40 segundos no banho-maria a 42°C e colocadas no gelo por 2 minutos.

A partir deste momento, foram adicionados 950 μL de meio SOC em cada tubo. Este foi levado ao shaker a 225 rpm, a 37°C por uma hora. Neste intervalo placas de cultivo foram preparadas adicionando-se 30 μL de X-Gal e 30 μL de isopropil- β -galactose (IPTG). As células transformadas foram plaqueadas no meio seletivo e incubadas a 37°C por 12-16h.

3.2.7 Manuseio dos clones recombinantes

As colônias de bactérias que receberam o inserto (colônias brancas) foram identificadas e selecionadas para uma nova cultura. Para isso, foram distribuídas alíquotas de 5mL de LB líquido que foi preparado somado a 10 μL de ampicilina (100 mg/mL).

As colônias recombinantes foram retiradas da placa com ponteiros estéreis e inoculadas no novo meio e incubadas a 37°C overnight sob agitação de 220 rpm. Após incubação, foram adicionados 300 μL de glicerol 100% em tubos criogênicos e 500 μL do meio cultivado. Os tubos foram identificados e conservados em freezer - 80°C.

3.2.8 Reação de PCR dos clones recombinantes

Foram realizadas reações de PCR a partir dos clones recombinantes isolados, com a intenção de amplificar o vetor contendo o inserto. A tabela 3 traz as particularidades dos conjuntos de primers, bem como os protocolos de amplificação.

Tabela 3. Primers e protocolo adotado nas reações para obtenção das sequências contendo o inserto.

Nome	Primer	Volume	Programa
M13	F- GTA AAA CGA CGG CCA G R- CAG GAA ACA GCT ATG AC	-6,25 µL mix PCR*;	1- 95°C → 2'
		-5,25 µL água;	2- 94°C → 45''
		-0,5 µL Primer F;	3- 50°C → 45''
		-0,5 µL Primer R;	4- 72°C → 1' 30''
		-1,0 µL meio líquido contendo os clones.	5- 72°C → 5''
			} 35x

*Na solução de MIX PCR Qiagen estão contidas os reagentes Taq DNA polimerase 5U, tampão da enzima 10X, MgCl₂ 1,5mM e dNTP (dideoxynucleotídeo trifosfato) 200µM.

Os resultados das reações em cadeia da polimerase (PCR) foram visualizados em gel de agarose a 1,5% corados com SYBR safe (10.000X) (Invitrogen®), em 1 µL tampão de corrida blue juice (10X), visualizados em transiluminador de luz ultravioleta. Os produtos foram estocados em freezer a -20°C.

3.2.9 Sequenciamento das amostras

Para o sequenciamento, foram utilizadas as amostras que possuíam por volta de 50 ng de DNA/µL. Estas amostras passaram pelo tratamento com a enzima ExoSAP-IT (GE Healthcare) que consistiu em adicionar em um microtubo 10 µL de produto de

PCR, 2 μ L da enzima ExoSAP e 2 μ L de água ultrapura autoclavada. Os tubos foram então levados ao termociclador em um ciclo de 1 hora a 37°C e 15 minutos a 80°C. As amostras foram mantidas no freezer (-20°C) e o DNA purificado foi enviado para seqüenciamento na empresa MacroGen Inc. em Seul- Coréia.

3.2.10 Edição e análise das sequências

As sequências foram editadas utilizando o programa *Pregap4* onde foram geradas sequências consenso. As sequências correspondentes a fragmentos do vetor foram retiradas das sequências consenso utilizando a ferramenta online de edição VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/>).

O alinhamento das sequências foi realizado com a ferramenta ClustalW (HIGGINS e SHARP, 1988) e os valores de scores determinados, foram utilizados para verificar a diferença da composição das sequências de *Leporinus*. Os níveis de similaridade entre as sequências isoladas das espécies de *Leporinus* e sequências disponíveis no GenBank foram determinados pela ferramenta BLAST - Basic Local Alignment Search Tool (ALTSCHUL et al., 1990), disponível no National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

3.2.11 Hibridação *in situ* fluorescente

A técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) foi conduzida utilizando sondas de produtos de PCR de clones dos três elementos estudados. As sondas foram marcadas pela técnica de marcação por *nick translation*, utilizando o composto biotina-14-dATP (Invitrogen). Para a marcação foi preparada uma reação contendo: 2 μ L de NT buffer, 2,78 μ L de H₂O miliq autoclavada, 2 μ L de cada dNTP (A, C e G), 0,7 μ L de dTTP, 0,52 μ L de Biotina-16-dUTP, 3 μ L de DNA polimerase I (Invitrogen) e 5 μ L de

produto de PCR, a reação foi mantida a 16°C por 90 min e 65°C por 10min. A sonda foi então precipitada adicionando-se 1 mL de etanol 100% gelado e 2 µL de acetato de sódio e mantida por 2 h a -80°C, depois o conteúdo foi centrifugado a 1110 rpm por 30min e o sobrenadante foi descartado. Foi então adicionado ao pelet 1 mL de etanol 70%, a centrifugação foi repetida, o sobrenadante foi descartado e os tubos deixados para secar. Os pelets foram dissolvidos em 10 µL de H₂O miliq autoclavada e o material foi mantido a -20°C.

Os experimentos de FISH foram realizados segundo a metodologia de Pinkel et al. (1986) com algumas modificações nos tempos de desnaturação e lavagens pós hibridação descritas por Silva et al. 2012.

3.2.12 Tratamento das lâminas para FISH

As preparações cromossômicas foram colocadas sobre lâminas previamente limpas, as quais foram mantidas em estufa a 37°C por pelo menos 4 horas para total fixação do material. Para dar procedimento às técnicas de hibridação *in situ* fluorescente as lâminas foram tratadas com solução de pepsina e RNase com o intuito de proporcionar um meio adequado para a hibridação.

Para o tratamento com pepsina incubou-se as lâminas por 10 minutos em uma solução contendo 99 mL de água destilada, 1 mL de HCl 1M e 50 µL de pepsina 10%. Em seguida, as lâminas foram lavadas duas vezes, por 2 minutos cada lavagem, em 2xSSC e incubadas em 100 µL de RNase (5 µL de solução aquosa de RNase 10 mg/mL mais 995 µL de 2xSSC) a 37°C por 1 hora em câmara úmida. Após a incubação, outras três lavagens, de 5 minutos cada, em 2xSSC foram efetuadas. Um último ciclo de lavagem foi realizado em Triton (100ml 20xSSC, 250 µL de Triton e 400 ml de H₂O) por 5

minutos em temperatura ambiente, uma única vez. As lâminas foram desidratadas em série etílica 70, 90 e 100% por 5 minutos em temperatura ambiente.

3.2.13 Desnaturação dos cromossomos

As lâminas previamente tratadas foram submetidas ao processo de desnaturação dos cromossomos que consistiu em um banho em formamida 70% a 70°C (70 mL de formamida PA em 30mL de 2xSSC). As lâminas foram mantidas nessa solução por 1 minuto e 45 segundos, variando de acordo com a qualidade das preparações citogenéticas. Em seguida, o material foi desidratado em série etílica (gelada a -20°C) 70, 90 e 100% por cinco minutos cada. Após esse procedimento o material foi mantido em temperatura ambiente para secagem. Enquanto as lâminas eram submetidas à série etílica, as sondas foram desnaturadas.

3.2.14 Preparação das sondas e incubação das lâminas

Para a preparação das sondas, 2 µL da sonda marcada e concentrada foram misturados a 10 µL do tampão de hibridação (formamida 50% em 2xSSC e sulfato dextrano 10%) por lâmina em um tubo e a desnaturação foi realizada em termociclador a 95°C por 10 minutos. Ao final da desnaturação, os tubos foram colocados imediatamente em gelo enquanto as lâminas secavam. A solução de hibridação de cada tubo foi colocada sobre a lâmina com os cromossomos desnaturados, coberta com lamínula e mantida overnight a 37°C em câmara úmida.

3.2.15 Lavagens e detecção

Após o tempo de hibridação, as lâminas foram submetidas aos processos de lavagem e detecção dos sinais utilizando anticorpos específicos. Para isso as lamínulas foram retiradas com cuidado e o material lavado duas vezes, 5 minutos cada, com

solução de estringência (50 mL de formamida PA em 50 mL de 2xSSC) a 45°C. Em seguida as lâminas foram lavadas duas vezes com 1xSSC a 45°C por também 5 minutos cada. Outra lavagem de 5 minutos foi realizada com 4xT (20 mL de 20xSSC, 5 µL de Triton e 75 mL de água) em temperatura ambiente.

Após as lavagens, 30 µL de tampão de bloqueio (1mL de 2xSSC, 10 µL de Triton e 0,05 g de leite em pó desnatado) foram adicionados sobre cada lâmina que foram cobertas com lamínula ou filme plástico por 5 minutos a temperatura ambiente.

Para detecção e amplificação do sinal das sondas, cada lâmina contendo 6 µL de Avidina-FITC (1:100) e 24 µL de tampão de bloqueio foi mantida em estufa a 37°C por 30 minutos. As lâminas foram lavadas por 2 minutos com 2xSSC a 45°C sob agitação (shaker). Duas outras lavagens de 2 minutos cada com 4xT a 45°C também sob agitação (shaker) foram realizadas.

Após esses procedimentos, cada lâmina foi incubada com 2 µL de Anti-avidina biotinilada e 38µL de tampão de bloqueio por 30 minutos a 37°C. O processo de lavagem nesta etapa foi o mesmo descrito acima.

Mais um ciclo de amplificação do sinal com Avidina-FITC foi realizado seguido pelos mesmos procedimentos de lavagem. Ao final, as lâminas foram também montadas com 15 µL de solução de DAPI+antifading, cobertas com lamínula e guardadas, no escuro, em geladeira.

Os cromossomos foram observados em um microscópio Olympus BX51 acoplado a um modelo de câmera digital Olympus D71 e as imagens foram capturadas pelo software DP control.

4.0 RESULTADOS

Os resultados obtidos permitiram a elaboração de um artigo científico que encontra-se configurado nas normas da revista em que foi aceito para publicação (Mobile Genetic Elements - ISSN: 2159-256X).

Chromosome mapping of retrotransposable elements *Rex1* and *Rex3* in *Leporinus Spix, 1829* species (Characiformes: Anostomidae) and its relationships among heterochromatic segments and W sex chromosome.

Rafael Splendore de Borba¹ Edson Lourenço da Silva²; Patrícia Pasquali Parise-Maltempi^{1*}

¹ Instituto de Biociências, UNESP Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Rio Claro, Departamento de Biologia, Laboratório de Citogenética. Av. 24 A, 1515. CEP: 13506-900. Rio Claro, SP, Brazil.

² Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Piauí, Picos, PI, Brazil.

*Author to whom correspondence should be addressed: Patricia Pasquali Parise-Maltempi. E-mail address: parise@rc.unesp.br Telephone: +55 19 3526-4148 Address: Instituto de Biociências, UNESP Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Rio Claro, Departamento de Biologia, Laboratório de Citogenética. Av. 24 A, 1515. CEP: 13506-900. Rio Claro, SP, Brazil

Key words: Transposable elements, mobile DNA, repetitive sequences, sex chromosome, FISH.

Abstract

The family Anostomidae is an interesting model for studies of repetitive elements, mainly because of the presence of high numbers of heterochromatic segments related to a peculiar system of female heterogamety, which is restricted to a few species of *Leporinus* genus. Thus, cytogenetic mapping of the retrotransposable elements *Rex1*, *Rex3*, and *Rex6* was performed in six *Leporinus* species, to elucidate the genomic organization of this genus. The sequencing of the *Rex1* and *Rex3* elements detected different base pair compositions in these elements among species, whereas the *Rex6* element was not identified in the genomes of these species. FISH analysis using *Rex1* detected different distribution patterns, *L. elongatus*, *L. macrocephalus*, and *L. obtusidens* had clusters in the terminal regions, whereas the signals were dispersed throughout all of the chromosomes with some signals in the terminal position in other species. The *Rex3* signals were found mainly in the terminal positions in all the chromosomes of all species. The W chromosomes of *L. elongatus*, *L. macrocephalus*, and *L. obtusidens* contained the *Rex1* and *Rex3* signal in an interstitial position. These results suggest the emergence of different activity levels for these elements during the evolution of the species analyzed. Despite the conserved karyotype macrostructure species *Leporinus* often discussed, our results show some variation in hybridization patterns, particularly between the species with specific patterns in their sex chromosomes and species without this differentiated system.

Introduction

Large portions of eukaryote genomes comprise repetitive DNA sequences. These sequences may be related to specific functions and structures, such as ribosomal DNA synthesis, segregation of centromeric regions, and the protection of telomeric regions. These sequences may have been produced by changes in the genome, which affected evolutionary trajectories and led to the production of regulatory and coding segments.^{1, 2} Repetitive sequences can be organized into two classes: tandem repeats, such as satellites, minisatellites, and microsatellites; and repeats dispersed throughout the genome as transposable elements.³ Transposable elements can move around the genome in two ways: sequence excision mediated by a transposase enzyme (transposons) or via intermediate RNA produced by reverse transcriptase (retrotransposons).⁴

Transposable elements have important roles in genomic diversity and evolution,⁵ and these elements may affect the evolutionary trajectory of the host organism in different ways, such as causing changes in gene functions via insertions and inducing chromosome rearrangements.⁶ From a cytogenetic perspective, these elements may accumulate in specific sites in chromosomes, such as terminal, pericentromeric, and other heterochromatic regions where the recombination rate is reduced,⁷ or in small euchromatic segments, such as those found in *Drosophila melanogaster* chromosomes.⁸ Thus, these elements may be associated with mechanisms that lead to speciation events,⁴ which confirms that these elements have very important roles in the genomic and biological diversity of vertebrates.

The retrotransposable elements in the *Rex* family have been studied widely in some fish groups, including Cichlidae,⁹⁻¹⁴ Tetraodontidae,¹⁵⁻¹⁷ Nototheniidae, Artedidraconidae, Bathydraconidae, Bovichtidae,¹⁸ and Loricariidae.¹⁹ The *Rex* family elements have a high diversity of chromosome locations in previously studied fish

species, and it has been hypothesized that they may have roles in genome differentiation and evolution.^{9-17, 20} However, the characteristics and dynamics of these fish retroelements, which occur mainly in the order Characiformes (a large fish order), still need to be elucidated.

The family Anostomidae is considered to be an interesting model for studies of repetitive elements. Cytogenetic studies of several species in this family have detected a conserved karyotypic structure in the 41 species that have already been karyotyped. The diploid number of 54 comprises metacentric and submetacentric chromosomes, and the karyotypes of most species carry a single NOR bearing pair.²¹⁻²⁴ The genus *Leporinus* has been well studied and 25 of the 87 species in this genus have been karyotyped. The presence of a peculiar sex chromosome system with female heterogamety is restricted to a few species in this genus, i.e., *L. elongatus*, *L. macrocephalus*, *L. obtusidens*, *L. reinhardtii*, *L. silvetrij*, *L. conirostris*, and *L. trifasciatus*.²⁵ Recent studies of *Leporinus* have isolated, characterized, and correlated repetitive elements in these species to study the evolution of sex chromosomes, as well as to discriminate hybrid species.²⁶⁻³² Other studies have shown that repetitive sequences such as 5S rDNA may have different distributions among *Leporinus* species with or without heteromorphic sex chromosomes.³³

The high heterochromatic content in the chromosomes of *Leporinus* species, especially the sex chromosomes, demonstrates the presence of high numbers of repetitive sequences in the genomes of these species.^{28-32, 34} In the present study, cytogenetic mapping of the retrotransposable elements *Rex1*, *Rex3*, and *Rex6* was performed in the chromosomes of *Leporinus* species to elucidate the activity and dispersion levels of these elements in genome of this genus. This analysis determined whether these elements are related to the heterochromatic regions of autosomes and

sex chromosomes and whether their distributions are compatible with the hypothetical maintenance of a stable macrostructure in the karyotype of this genus.

Results

Isolation of *Rex1*, *Rex3*, and *Rex6* elements, and sequence analysis

The amplification and sequencing of *Rex1* and *Rex3* elements detected sequences with different base pair numbers among *Leporinus* species. The sequence alignment detected a high similarity among the sequences that corresponded to the *Rex1* element, where the scores ranged from 97.93% to 100.0%. However, the *Rex3* sequences were more variable among species, with scores ranging from 48.12% to 100.0%. The similarity levels of *Rex1* with others sequences in Gen Bank were 79-83% and *Rex3* were 83-88%. The amplified segments corresponded to the coding domains of the reverse transcriptase gene, as expected for sequences corresponding to retrotransposons. The base pair numbers and similarity levels for each species are shown in table 1.

Sequencing of the amplified fragments generated using the *Rex6* primer set in different PCR conditions, showed that these fragments did not correspond to the *Rex6* element. The sequences contained 1019 base pairs and their maximum shared identity was with fragments of a chromosome 13 clone from *Mus musculus* (accession number: AC034285.6).

Chromosome mapping of the *Rex1* element

Fluorescent in situ hybridization analysis (FISH) using the PCR fragments of the *Rex1* element as a probe detected different mapping patterns in the study species. *L. elongatus* (fig. 1a), *L. macrocephalus* (fig. 1b), and *L. obtusidens* (fig. 1c) had isolated clusters in the terminal regions of most chromosomes, although the W chromosome

contained signals in the interstitial region of the long arm. *L. elongatus* had an interstitial cluster in the W1 chromosome (fig. 1a). In *L. friderici* (fig. 1d), *L. lacustris* (fig. 1e), and *L. striatus* (fig. 1f), the majority of the clusters were dispersed throughout all of the chromosomes and some of the signals were in terminal positions in male and female specimens.

Chromosome mapping of the *Rex3* element

The results obtained using the PCR fragments of *Rex3* as a probe detected the same mapping pattern in all species (fig. 2). The clusters were isolated in the terminal regions of all chromosomes and some clusters were dispersed in the short and long arms of male and female specimens. In *L. elongatus*, *L. macrocephalus*, and *L. obtusidens*, the W chromosome had signals in terminal positions and the interstitial regions of the long arms.

Discussion

The analysis of *Rex1* and *Rex3* generated sequences of 456-500 base pairs and 411-429 base pairs, respectively, which were similar to these sequences in other fish groups from the Antarctic,¹⁸ and cichlid fishes.¹⁰ This was confirmed by the BLASTn analysis where the *Rex1* and *Rex3* sequences shared high similarity with those of other fish groups, which demonstrates that these elements are fairly well conserved in different families. Previous researchers have suggested that the *Rex6* element may have been lost or diverged greatly, depending on the rate of host evolution. The loss of *Rex6* elements has been reported in Antarctic fishes,¹⁸ and may have occurred in *Leporinus* species because none were identified in the species analyzed in the present study.

The chromosomal mapping of retrotransposable elements in fish has demonstrated their remarkable diversity..²⁰ In the present study, the *Leporinus* species

had different hybridization signals with dispersed clusters and signals in the terminal regions. These patterns were similar to those observed in the Bryconinae,²⁵ Erythrinidae,³⁶ Sternopygidae,³⁷ Artedidraconidae,¹⁸ Bathydraconidae,¹⁸ Bovichtidae,¹⁸ Channichthyidae,¹⁸ Nototheniidae,¹⁸ Loricariidae,¹⁹ Pimelodidae,³⁸ and Tetraodontidae.¹⁷ Species in the family Cichlidae are exceptional because the *Rex* elements are frequently distributed in the pericentromeric regions.⁹⁻¹⁴

In particular, *Rex1* had different chromosome locations in *Leporinus* species. *Leporinus elongatus*, *L. macrocephalus*, and *L. obtusidens* had isolated signals in terminal positions in all chromosomes. In other species, there was hybridization with clusters in the short and long arms of all chromosomes. It is known that the distribution patterns of transposable elements are nonrandom and are related to the specific characteristics of different sites in the genome.⁵ Specific distribution patterns have also been observed in *Drosophila*, where some euchromatic regions have been replaced by retrotransposable elements.³⁹ Furthermore, a correlation between chromosome rearrangement and retrotransposon activity was reported by Ozouf-Costaz et al.¹⁸ in notothenioid species. Thus, the differences in the *Rex1* hybridization sites in *Leporinus* species may be related to small rearrangements in specific regions of their genomes.

The distributions of *Rex3* elements were similar to those of *Rex1* in *L. elongatus*, *L. macrocephalus*, and *L. obtusidens*. These similar patterns suggest the compartmentalization of sequences in the terminal positions of the chromosomes in these species. Thus, it is likely that similar evolutionary mechanisms account for the distribution of these elements in *Leporinus* species and those in other fish families, such as Cichlidae,^{10, 11} and Nototheniidae.¹⁸ In *L. friderici*, *L. lacustris*, *L. obtusidens*, and *L. striatus*, the *Rex3* elements were present as isolated signals in terminal positions in the short and long arms of chromosomes.

Many studies of Anostomidae species have highlighted the correlations between heterochromatic regions in chromosomes and repetitive sequences.^{28, 30-32} Many repetitive sequences have been isolated from heterochromatic segments, mainly in *Leporinus* species, such as those present in the W chromosome, pericentromeric positions, and NOR regions.²⁶⁻³² In the present study, retrotransposable elements in the *Rex* family were also abundant in other heterochromatic regions in *Leporinus* chromosomes, such as terminal positions and some interstitial segments. This distribution reflects the pattern expected for transposable elements distribution described by Kidwell,⁷ related to a low rate of recombination. *L. friderici* and *L. striatus* possessed a few signals in the euchromatic regions of chromosomes. Other studies have suggested that transposable elements can accumulate in euchromatic segments, such as those found in *Drosophila melanogaster* where 3.8% of the euchromatic genome comprises transposable elements.⁴⁰

The presence of specific signals for retrotransposable elements in sex chromosomes has been poorly reported in fish. Ozouf-Costaz et al.¹⁸ identified *Rex3* element hybridization signals in an interstitial position in the short arm of the Y-chromosome of *Chionodraco hamatus* (Channichthyidae). The interstitial markers in this chromosome may indicate the activity of fusion rearrangement mechanisms during the differentiation of this family.⁴¹ The interesting localizations of *Rex1* and *Rex3* elements in the W chromosomes of *Leporinus elongatus*, *L. macrocephalus*, and *L. obtusidens* may be related to the suppression of recombination during the sex chromosome differentiation process, due mainly to an increase in heterochromatic segments. Suppression is a critical component of this process and there is a natural bias toward the accumulation of repetitive elements.³

An increase in heterochromatic segments because of the differentiation of W chromosomes in *Leporinus* was proposed by Galetti and Foresti.⁴² These researchers

suggested that the heterochromatin concentration had a specific role in the differentiation of sex chromosomes, thereby indicating a common origin of the chromosomal sex system found in different species of *Leporinus*. Recent studies have supported a hypothesis based on repetitive sequences related to the W chromosome,^{28, 30-32} where these sequences are related strictly to species with W chromosomes. Another study demonstrated synteny among the W chromosomes of *Leporinus* species, which supports the hypothesis of a common origin for this chromosome.⁴³ In the present study, the similar distribution patterns of the *Rex1* and *Rex3* elements in the sex chromosomes of three *Leporinus* species, i.e., *L. elongatus*, *L. macrocephalus*, and *L. obtusidens*, also supports the hypothesis of a common origin of the W chromosome in *Leporinus* species.

The karyotypic macrostructures of *Leporinus* species have been studied many times and a fairly high level of conservation has been reported,^{25,27,34,44} however our results show variations in the hybridization signal patterns, particularly between species with sex chromosomes and species without this differentiated system. The retroelements analyzed in the present study reflected the same patterns observed in other repetitive elements,^{28, 30} reinforced that heterochromatic regions of the sex chromosomes had distinct differences among autosomes of the *Leporinus* species.

Material and Methods

Material

Fish material, chromosome preparation, and DNA extraction

Six *Leporinus* species were analyzed in this study: *L. elongatus* (Valenciennes, 1849) from Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais (CEPTA), Pirassununga, São Paulo state; *L. obtusidens* (Valenciennes, 1847) from Leme fish farm, São Paulo state; and *L. macrocephalus* (Garavello and Britiski, 1988),

L. striatus (Kner, 1858), *L. lacustris* (Amaral Campos, 1945), and *L. friderici* (Bloch, 1794) were collected from the Paraguay River basin, Mato Grosso State-Brazil. In total, 12 specimens were analyzed (one male and one female of each species). The chromosomal preparations were obtained using kidney cells, as described by Foresti et al.⁴⁵ Genomic DNA was extracted from the liver using the phenol-chloroform-isoamyl alcohol technique.⁴⁶ The specimens were collected in accordance with collection license issued by Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (19833-1), and the material was processed according to Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (016/04 – CEEA).

Methods

Isolation of *Rex1*, *Rex3*, and *Rex6* elements

PCR of the *Rex1*, *Rex3*, and *Rex6* elements used a reaction mixture with a volume of 13.5 μ L, which contained 6.25 μ L of PCR Mix (Qiagen), 5.25 μ L of Milli-Q water, 0.5 μ L primer F (10 μ M), 0.5 μ L of primer R (10 μ M), and 1.0 μ L of template DNA (200 ng). PCR was performed in a thermocycler (Eppendorf Mastercycler) with the following cycling conditions: initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 34 cycles at 95°C for 40 s, annealing at 55°C for 40 s, and chain elongation at 72°C for 5 min, with a final extension at 72°C for 5 min.

Specific primers were designed based on the partial sequences of *Rex1* in *L. elongatus*, which were obtained using the primer set *Rex1F* - 5' TTC TCC AGT GCC TTC AAC ACC and *Rex1R* - 5' TCC CTC AGC AGA AAG AGT CTG CTC.^{47, 48} This set was used in the PCR reaction and was subsequently sequenced by MacroGen, Korea. The sequence was used to design a specific primer for *Leporinus* with the tool OligoPerfect™ Designer (<http://tools.invitrogen.com>), which produced the following sequences: *Rex1EL* - F 5' AGCA AGCT AGAG AGTG CTGG and *Rex1EL* - R 5'

ACAG AGCG TGTG TGTT GTCC. *Rex3* and *Rex6* amplification used the following primer sets: *Rex3F* - 5' CGG TGA YAA AGG GCA GCC CTG and *Rex3R* - 5' TGG CAG ACN GGG GTG GTG GT, and *Rex6F* - 5' TAA AGC ATA CAT GGA GCG CCAC and *Rex6R* - 5' GGT CCT CTA CCA GAG GCC TGGG.^{47, 48}

Cloning, sequencing, and sequence analysis

The amplified DNA was cloned with a Pgem-T kit (Promega) and used to transform competent *Escherichia coli* (Jm109, Promega) cells. Clones containing the digested DNA fragments were stored before nucleotide sequencing and used as probes in the chromosomal FISH experiments. The DNA fragments were purified using ExoSAP-IT enzyme and sequenced (MacroGen In, Korea). The sequences were edited using the Pregep4 program, aligned with CLUSTALW,⁴⁹ in DAMBE5,⁵⁰ and analyzed with the BLASTn tool,⁵¹ via the National Center for Biotechnology Information (NCBI) website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) to determine the similarities among sequences.

FISH and chromosome analysis

The FISH analyses were based on the method of Pinkel et al.⁵² with several modifications proposed by Silva et al.³¹ where the retrotransposable elements *Rex1* and *Rex3* were used as the probes. The probes were labeled via nick translation with biotin-14-dATP (Invitrogen) to facilitate chromosomal mapping.

The hybridization signals were detected using appropriate antibody sets based on anti-avidin, which was followed by the application of avidin-FITC to enhance the signals of the biotin-labeled probes. The chromosomes were counterstained with DAPI, mounted with antifade solution, and observed using an Olympus BX51 microscope coupled to an Olympus digital camera (model D71). The chromosome images were captured using the DP Controller program.

Acknowledgements

The authors are grateful to Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - 2012/01437-0) for financial support. to Bioedit® by helping with the English language. They also thank to Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) for providing the collection license (19833-1).

References

1. Volf JN: Turning junk into gold: domestication of transposable elements and the creation of new genes in eukaryotes. *Bioessays*, 2006; 28:913–922.
2. Bourque G, Leong B, Vega VB, Chen X, Lee YL, Srinivasan KG, Chew JL, Ruan Y, Wei CH, Ng HH, Liu ET: Evolution of the mammalian transcription factor binding repertoire via transposable elements. *Genome Res*, 2008; 18:1752-1762.
3. Charlesworth B, Snlegowski P, Stephan W: The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature*, 1994; 371: 215-220.
4. Böhne A, Brunet F, Galiana-Arnoux D, Schultheis C, Volf JN: Transposable elements as drivers of genomic and biological diversity in vertebrates. *Chromosom Res*, 2008; 16: 203-215.
5. Kidwell MG, Lisch DR: Transposable elements and host genome evolution. *Trends Ecol Evol*, 2000; 15: 95-99.
6. Feschotte C, Pritham EJ: DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. *Ann rev genet*, 2007; 41: 331-368.
7. Kidwell MG: Transposable elements, in Gregory, T. (ed): *The Evolution of the genome*. Elsevier Academic Press, Burlington, MA, 2005; p.165-223.
8. Bartolome C, Maside X, Charlesworth B: On the abundance and distribution of transposable elements in the genome of *Drosophila melanogaster*. *Mol Biol Evol*, 2002; 19:926-937.

9. Mazzuchelli J, Martins C: Genomic organization of repetitive DNAs in the cichlid fish *Astronotus ocellatus*. *Genetica*, 2009; 136: 461-469.
10. Teixeira WG, Ferreira IA, Cabral-de-Mello DC, Mazzuchelli J, Valente GT, Pinhal D, Poletto AB, Venere PC, MARTINS C: Organization of Repeated DNA Elements in the Genome of the Cichlid Fish *Cichla kelberi* and Its Contributions to the Knowledge of Fish Genomes. *Cytogenet Genome Res*, 2009; 125: 224-234.
11. Valente GT, Mazzuchelli J, Ferreira IA, Poletto AB, Fantinatti BEA, Martins C: Cytogenetic mapping of the retroelements Rex1, Rex3 and Rex6 among cichlid fish: new insights on the chromosomal distribution of transposable elements. *Cytogenet Genome Res*, 2010; 133: 34-42.
12. Gross MC, Schneider CH, Valente GT, Porto JIR, Martins C, Feldberg E: Comparative cytogenetic analysis of the genus *Symphysodon* (Discus Fishes, Cichlidae): chromosomal characteristics of retrotransposons and minor ribosomal DNA. *Cytogenet Genome Res*, 2010; 127(1), 43-53.
13. Fantinatti BEA, Mazzuchelli J, Valente GT, Cabral-de-Mello DC, MARTINS C: Genomic content and new insights on the origin of the B chromosome of the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata*. *Genetica* ('s-Gravenhage), 2012; 139: 1273-1282.
14. Schneider CH, Gross MC, Terencio ML, Carmo EJ, Martins C, Feldberg E: Evolutionary dynamics of retrotransposable elements *Rex1*, *Rex3* and *Rex6* in neotropical cichlid genomes. *BCM Evol Biol*, 2013; 13: 152.
15. Da Silva C, Hadji H, Ozouf-Costaz C, Nicaud S, Jaillon O; Remarkable compartmentalization of transposable elements and pseudogenes in the heterochromatin of the *Tetraodon nigroviridis* genome. *Proc Natl Acad Sci*, 2002; 99: 1636-1641.
16. Bouneau L, Fischer C, Ozouf-Costaz C, Froschauer A, Jaillon O, Coutanceau JP, Körting C, Weissenbach J, Bernot A, Volf JN: An active non-LTR retrotransposon with tandem structure in the compact genome of the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Genome Res*, 2003; 13: 1686-1695.
17. Fischer C, Bouneau L, Coutanceau JP, Weissenbach J, Volf JN, Ozouf-Costaz C: Global heterochromatic colocalization of transposable elements with minisatellites in

the compact genome of the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Gene*, 2004; 336: 175-183.

18. Ozouf-Costaz C, Brandt J, Korting C, Pisano E, Bonillo C, Coutanceau JP, Volff JN: Genome dynamics and chromosomal localization of the non-LTR retrotransposons Rex1 and Rex3 in Antarctic fish. *Antarct Sci*, 2004; 16: 51-57.

19. Ferreira DC, Oliveira C, Foresti F: Chromosome mapping of the retrotransposable elements Rex1 and Rex3 in three fish species in the subfamily Hypoptomatinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). *Cytogenet Genome Res*, 2011; 132: 64-70.

20. Ferreira DC, Porto-Foresti F, Oliveira C, Foresti F: Transposable elements as a potential source for understanding the fish genome. *Mob Genet Elem*, 2011; 1(2): 112-117.

21. Galetti PM, Foresti F, Bertollo LAC, Moreira-Filho O: Heteromorphic sex chromosome in three species of the genus *Leporinus* (Pices, Anostomidae). *Cytogenet Cell Genet*, 1981; 29: 138-142.

22. Galetti PM, Foresti F, Bertollo LAC, Moreira-Filho O: Characterization of eight species of Anostomidae (Cypriniformes) fish on the basis of the nucleolar organizing region. *Caryologia*, 1984; 37(4): 401-406.

23. Molina WF, Galetti Jr PM: Early replication banding in *Leporinus* species (Osteichthyes, Characiformes) bearing differentiated sex chromosomes (ZW) *Genetica*, 2007; 130: 153-160.

24. Silva EL: Estudo da organização estrutural de elementos repetitivos isolados do genoma de *Leporinus elongatus* em diferentes espécies da família Anostomidae (Teleostei, Characiformes) Ph D. Dissertation, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2012.

25. Galetti PM, Lima NRW, Venere PC: A monophyletic ZW sex chromosome system in *Leporinus* (Anostomidae, Characiformes). *Cytologia*, 1995; 60: 375-382.

26. Nakayama I, Foresti F, Tewari R, Scharl M, Chourrout D: Sex chromosome polymorphism and heterogametic males revealed by two cloned DNA probes in the ZWZZ fish *Leporinus elongatus*. *Chromosoma*, 1994; 103: 31-39.

27. Koehler MR, Haaf T, Guttenbach M, Scharl M, Schmid T: Cytogenetics of the genus *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). II. Molecular cytogenetics, organization and evolutionary conservation of a chromosome-specific satellite DNA from *Leporinus obtusidens*. *Chromosom Res*, 1997; 5: 325-31.
28. Parise-Maltempi PP, Martins C, Oliveira C, Foresti F: Identification of a new repetitive element in the sex chromosomes of *Leporinus elongatus* (Teleostei: Characiformes: Anostomidae): new insights into the sex chromosomes of *Leporinus*. *Cytogenet Genome Res*, 2007; 116: 218-223.
29. Hashimoto DT, Parise-Maltempi PP, Laudicina A, Bortolozzi J, Senhorini JA, Foresti F, Porto-Foresti F: Repetitive DNA probe linked to sex chromosomes in hybrids between Neotropical fish *Leporinus macrocephalus* and *Leporinus elongatus* (Characiformes, Anostomidae). *Cytogenet Genome Res*, 2009; 124: 151-157.
30. Marreta ME, Faldoni FLC, Parise-Maltempi PP: Cytogenetic mapping of the W chromosome in the genus *Leporinus* (Teleostei, Anostomidae) using a highly repetitive DNA sequence. *J Fish Biol*, 2012; 80: 630-637.
31. Silva EL, Borba RS, Parise-Maltempi PP: Chromosome mapping of repetitive sequences in Anostomidae species: implications for genomic and sex chromosome evolution. *Mol Cytogenet*, 2012; 5: 1-8.
32. Silva EL, Busso AF, Parise-Maltempi: Characterization and genome organization of a repetitive element associated with the nucleolar organizer region in *Leporinus elongatus* (Anostomidae: Characiformes). *Cytogenet Genome Res*, 2013; 129: 22-28.
33. Ferreira IA, Oliveira C, Venere PC, Galletti PM, Martins: 5S rDNA variation and its phylogenetic inference in the genus *Leporinus* (Characiformes: Anostomidae). *Genetica*, 2007; 129: 253-257.
34. Galetti PM, César ACG, Venere PC: Heterochromatin and NORs variability in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Caryologia*, 1991; 44: 287-292.
35. Silva JR: Isolamento e caracterização de elementos transponíveis em espécies do gênero *Brycon* (Characidae, Bryconinae). Ph D. Dissertation, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2012.

36. Cioffi MB, Martins C, Vicari MR, Rebordinos L, Bertollo LAC: Differentiation of the XY Sex Chromosomes in the Fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae): Unusual Accumulation of Repetitive Sequences on the X Chromosome. *Sex Dev*, 2010; 4:176-185.
37. Sene VF: Citogenética molecular e caracterização cromossômica no gênero *Eigenmannia* (Teleostei, Gymnotiformes, Sternopygidae). Ph D. Dissertation, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2011.
38. Matoso DA, Val VMFA, Fonseca VM, Silva M, Moraes-Neto A, Almeida MC, Vicari MR, Moreira-Filho O, Artoni RF: Chromosomal polymorphism in *Steindachneridion melanoderdatum* Garavello, 2005 (Siluriformes, Pimelodidae): a reappraisal the existence of sex chromosome system in the species. *Rev Fish Biol Fisher*, 2005; 21:497-508.
39. Busseau I, Chaboissier MC, Pélisson A, Bucheton A: I factors in *Drosophila melanogaster*. transposition under control. *Genetica*, 1994; 93: 101-116.
40. Kaminker JS, Bergman CM, Kronmiller B, Carlson J, Svirskas R, Patel S, Frise E, Wheeler DA, Lewis SE, Rubin GM, Ashburner M, Celniker SE: The transposable elements of the *Drosophila melanogaster* euchromatin: a genomics perspective. *Genome Biol*, 2002; 3(12):research0084.1-0084.20.
41. Pisano E, Ozouf-Costaz C: Chromosome change and the evolution in the Antarctic fish suborder Notothenioidei. *Antarct Sci*, 2000; 12: 334-342.
42. Galetti PM, Foresti F: Evolution of the ZZ/ZW system in *Leporinus* (Pisces, Anostomidae): the role of constitutive heterochromatin. *Cytogenet Cell Genet*, 1986; 43: 43-46.
43. Parise-Maltempi PP, Silva EL, Rens W, Dearden F, O'brien PCM, Trifonov V, Ferguson-Smith MA: Comparative analysis of sex chromosomes in *Leporinus* species (Teleostei, Characiformes) using chromosome painting. *BMC Genetics (Online)*, 2013; 14: 60, doi:10.1186/1471-2156-14-60.
44. Galetti PM, Mestriner CA, Venere PC, Foresti F: Heterochromatin and karyotype reorganization in fish of the family Anostomidae (Characiformes). *Cytogenet Cell Genet*, 1991; 56: 116-121.

45. Foresti F, Oliveira C, Almeida-Toledo LF: A method for chromosome preparations from large specimens of fishes using in vitro shortterm treatment with colchicine. *Experientia*, 1993; 49: 810-813.
46. Sambrook J, Russel DW: *Molecular cloning. A laboratory manual.* (Cold New York: Spring Harbor Laboratory Press. Third Edition, 2001.
47. Volff JN, Körting C, Sweeney K, Scharl M: The non-LTR retrotransposon Rex3 from the fish *Xiphophorus* is widespread among teleosts. *Mol Biol Evol*, 1999; 16(11): 1427-1438.
48. Volff JN, Körting C, Scharl M: Multiple lineages of the non-LTR retrotransposon Rex1 with varying success in invading fish genomes. *Mol Biol Evol*, 2000; 17: 1673-1684.
49. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ: Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 1994; 22:4673-4680.
50. Xia, X: DAMBE5: A comprehensive software package for data analysis in molecular biology and evolution. *Mol Biol Evol*, 2013; doi:10.1093/molbev/mst064.
51. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ: Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 1990; 215: 403-410.
52. Pinkel D, Straume T, Gray JW: Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci*, 1986; 83: 2934-2938.

Table 1. Base pair number and similarity levels of *Rex1* and *Rex3* in *Leporinus* species

Specie	Retrotransposable element	Base pair	Similarity level
<i>L. elongatus</i>	<i>Rex1</i>	498	79% - <i>Pterophyllum scalare</i> (JX576338.1)
	<i>Rex3</i>	411	88% - <i>Dissostichus mawsoni</i> (AY331110.1)
<i>L. friderici</i>	<i>Rex1</i>	482	82%- <i>Pterophyllum scalare</i> (JX576338.1)
	<i>Rex3</i>	429	83% - <i>Cichla monoculus</i> (KF131684.1)
<i>L. lacustris</i>	<i>Rex1</i>	483	82%- <i>Pterophyllum scalare</i> (JX576338.1)
	<i>Rex3</i>	426	88% - <i>Dissostichus mawsoni</i> (AY331110.1)
<i>L. obtusidens</i>	<i>Rex1</i>	477	82%- <i>Pterophyllum scalare</i> (JX576338.1)
	<i>Rex3</i>	426	88% - <i>Notothenia coriiceps</i> (AY331103.1)
<i>L. macrocephalus</i>	<i>Rex1</i>	500	80%- <i>Pterophyllum scalare</i> (JX576338.1)
	<i>Rex3</i>	429	88% - <i>Dissostichus mawsoni</i> (AY331110.1)
<i>L. striatus</i>	<i>Rex1</i>	456	83%- <i>Pterophyllum scalare</i> (JX576338.1)
	<i>Rex3</i>	426	88% - <i>Dissostichus mawsoni</i> (AY331110.1)

Figure 1

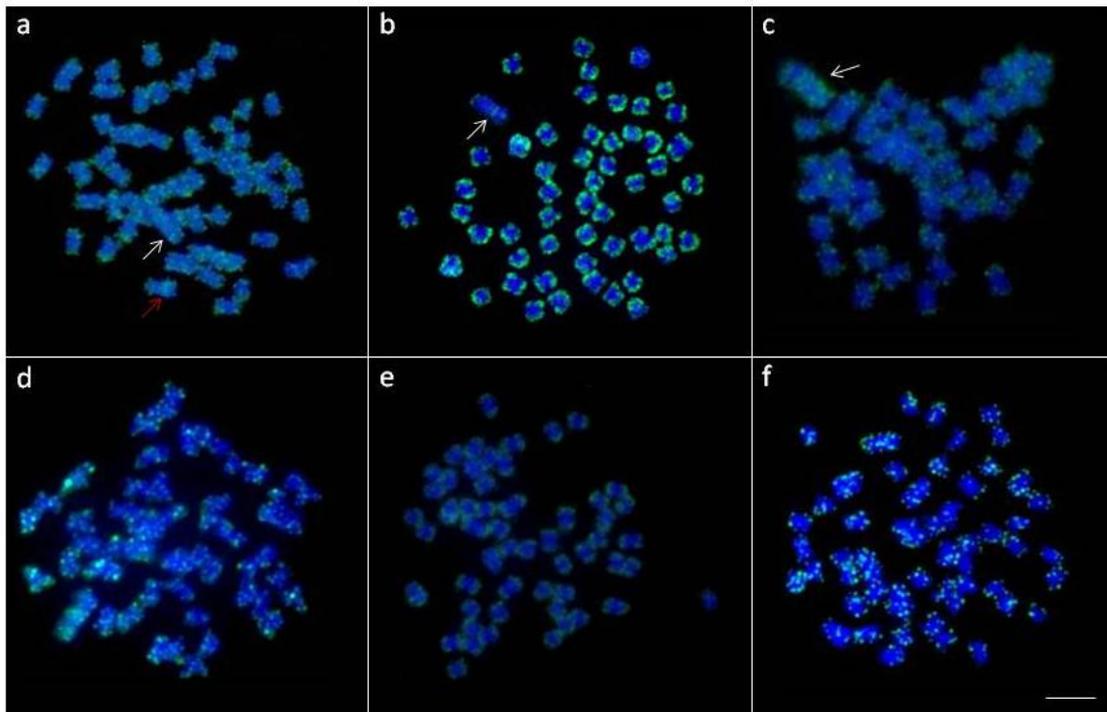


Figure 2

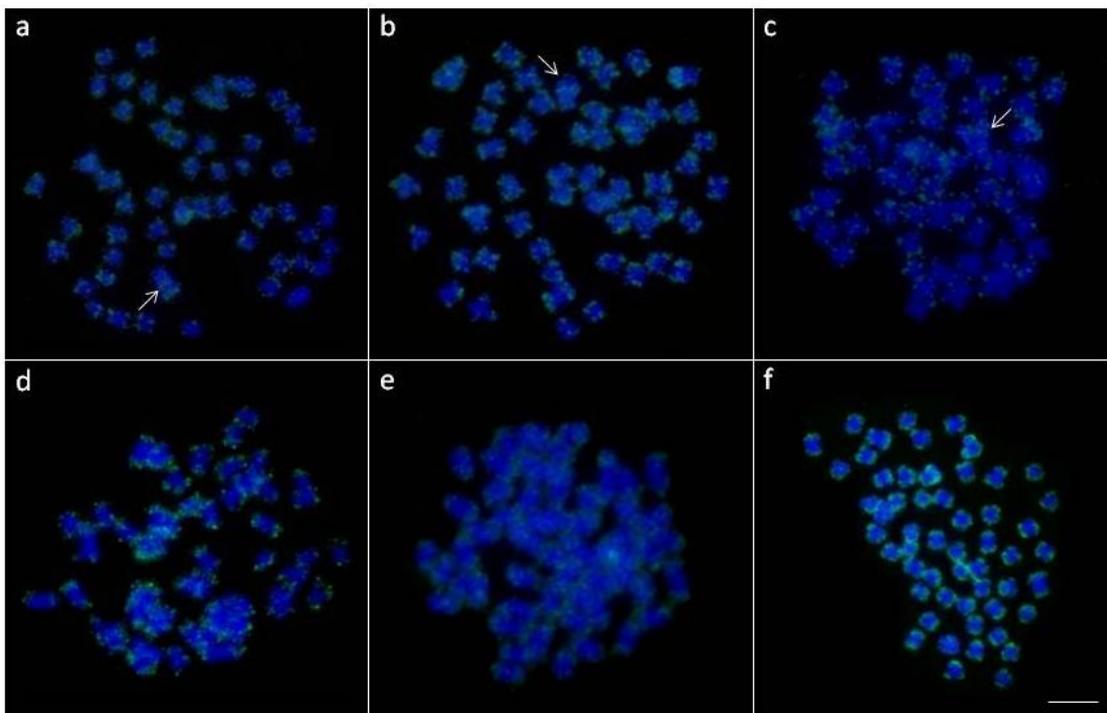


Figure 1: Chromosome mapping of *Rex1* element in metaphases of female specimens of *Leporinus elongatus* (a), *L. macrocephalus* (b), *L. obtusidens* (c), *L. friderici* (d), *L. lacustris* (e) and *L. striatus* (f). The arrows indicate the W chromosome, red arrow indicate W1 chromosome. Bar = 10 μ m.

Figure 2: Chromosome mapping of *Rex3* element in metaphases of female specimens of *Leporinus elongatus* (a), *L. macrocephalus* (b), *L. obtusidens* (c), *L. friderici* (d), *L. lacustris* (e) and *L. striatus* (f). The arrows indicate the W chromosome. Bar = 10 μ m.

5.0 CONCLUSÕES FINAIS

- O estudo de elementos retrotransponíveis apontou muitas variações na composição molecular dos cromossomos dos peixes do gênero *Leporinus*;
- Estes elementos se apresentam relacionados com diferentes regiões heterocromáticas, e em algumas regiões eucromáticas;
- Marcações específicas foram identificadas no grupo que possui cromossomos sexuais do tipo W;
- As sequências dos elementos da família *Rex* apresentaram variações entre as espécies analisadas.

6.0 REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.

BLANCO, D.R. Estudos citogenéticos clássicos e moleculares em espécies do gênero *Harttia* (Siluriformes, Loricariidae), com enfoque no papel dos DNAs repetitivos na evolução cariotípica do grupo. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2012.

BERG, D.E.; HOWE, M.M. **Mobile DNA**. American Society for Microbiology, Washington, DC. 1989.

BIÉMONT, C.; VIEIRA, C. Genetics: Junk DNA as an evolutionary force. **Nature**, v.443, p.521-524, 2006.

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.

BOUNEAU, L.; FISCHER, C.; OZOUF-COSTAZ, C.; FROSCHAUER, A.; JAILLON, O.; COUTANCEAU, J.P.; KÖRTING, C.; WEISSENBACH, J.; BERNOT, A.; VOLFF, J.N. An active non-LTR retrotransposon with tandem structure in the compact genome of the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. **Genome Research**, v. 13, p. 1686-1695, 2003.

CAPY, P.; BAZIN, C.; HIGUET, D.; LANGRIN, T. **Dynamics and Evolution of Transposable Elements**. Austin, TX: Springer-Verlag. 1998.

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

CIOFFI MB, MARTINS C, VICARI MR, REBORDINOS L, BERTOLLO LAC, 2010. Differentiation of the XY Sex Chromosomes in the Fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae): Unusual Accumulation of Repetitive Sequences on the X Chromosome. **Sexual Development**, v.4, p. 176-185, 2010.

DA SILVA, C.; HADJI, H.; OZOUF-COSTAZ, C.; NICAUD, S.; JAILLON, O. Remarkable compartmentalization of transposable elements and pseudogenes in the heterochromatin of the *Tetraodon nigroviridis* genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, p. 1636-1641, 2002.

FANTINATTI, B.E.A.; MAZZUCHELLI, J.; VALENTE, G.T.; CABRAL-DE-MELLO, D.C.; MARTINS, C. Genomic content and new insights on the origin of the B chromosome of the cichlid fish *Astatotilapia latifasciata*. **Genetica** ('s-Gravenhage), v. 139, p. 1273-1282, 2012.

FERREIRA, D.C.; OLIVEIRA, C.; FORESTI F. Chromosome mapping of the retrotransposable elements Rex1 and Rex3 in three fish species in the subfamily Hypoptomatinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). **Cytogenetic and Genome Research**, 2010 DOI: 10.1159/000319620

FESCHOTTE, C.; PRITHAM, E.J. DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. **Annual Review of Genetics**, v.41, p.331-368, 2007.

FISCHER, C.; BOUNEAU, L.; COUTENCEAU, J.P.; WEISSENBACH, J.; VOLLF, J.N.; OZOUF-COSTAZ, C. Global heterochromatic colocalization of transposable elements with minisatellites in the compact genome of the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. **Gene**, v.336, p. 175-183, 2004.

GALETTI, P.M.; FORESTI, F. Evolution of the ZZ/ZW system in *Leporinus* (Pisces, Anostomidae): the role of constitutive heterochromatin. **Cytogenetic and Cell Genetic**, v. 43, p. 43-46, 1986.

GALETTI, P.M.; LIMA, N.R.W.; VENERE, P.C. A monophyletic ZW sex chromosome system in *Leporinus* (Anostomidae, Characiformes). **Cytologia**, v. 60, p. 375-382, 1995.

GALETTI, P.M.; MESTRINER, C.A.; VENERE, P.C.; FORESTI, F. Heterochromatin and karyotype reorganization in fish of the family Anostomidae (Characiformes). **Cytogenetics and Cell Genetics**, v.56, p.116-121, 1991.

GARAVELLO, J. C. & BRITSKI, A. Family Anostomidae (Headstanders). In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O. & FERRARIS JUNIOR, C. J. (Eds.) **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p. 71-84.

GÉRY, J. **Characoids of the World**. Neptune City: T.F.H. Publications, p. 672, 1977.

GRIFFTHIS, A.J.F.; WESSLER, S.R.; LEWONTIN, R.C.; CARROLL, S.B. **Intrudução à genética**. 9ª ed, 2009.

GROSS, M.C.; SCHNEIDER, C.; VALENTE, G.T.; PORTO, J.; MARTINS, C.; FELDBERG, E. Comparative cytogenetic analysis of the genus *Symphysodon* (discus fishes, Cichlidae): chromosomal characteristics of retrotransposons and minor ribosomal DNA. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 127, p. 43-53, 2009.

HASHIMOTO, D.T.; PARISE-MALTEMPI, P.P.; LAUDICINA, A.; BORTOLOZZI, J.; SENHORINI, J.A.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. Repetitive DNA probe linked to sex chromosomes in hybrids between Neotropical fish *Leporinus macrocephalus* and *Leporinus elongatus* (Characiformes, Anostomidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 124, p. 151-157, 2009.

HIGGINS, D.G.; SHARP, P.M. CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. **Gene**, v. 73, p. 237-244, 1988.

KIDWELL, M.G. Transposable elements, in Gregory, T. (ed): **The Evolution of the genome** Elsevier Academic Press, Burlington, MA, p. 165-223, 2005.

KIDWELL, M.G.; LISCH, D.R. Transposable elements and host genome evolution. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 15, p. 95-99, 2000.

KOEHLER, M. R.; HAAF, T.; GUTTENBACH, M.; SCHARTL, M. & SCHMID, T. Cytogenetics of the genus *Leporinus* (Pisces, Anostomidae). II. Molecular cytogenetics, organization and evolutionary conservation of a chromosome-specific satellite DNA from *Leporinus obtusidens*. **Chromosome Research**, v. 5, p. 325-31. 1997.

LEWIN, B. **Retrovirus and retroposons**. In: Genes VIII. Carlson G. Ed: Pearson Prentice Hall. NJ.p.493-509, 2004.

MARRETA, M.E.; FALDONI, F.L.C.; PARISE-MALTEMPI, P.P. Cytogenetic mapping of the W chromosome in the genus *Leporinus* (Teleostei, Anostomidae) using a highly repetitive DNA sequence. **Journal of Fish Biology**, v. 80, p. 630- 637, 2012.

MARTINS, C.; OLIVEIRA, C.; WASKO, A.P.; WRIGHT, J.M. Physical mapping of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) genome by fluorescent in situ hybridization of repetitive DNAs to metaphase chromosomes - A review. **Aquaculture**, v. 231, p. 37-49, 2004.

MAZZUCHELLI, J. Identificação e caracterização de sequências repetidas de DNA no genoma do ciclídeo *Astronotus ocellatus*. **Dissertação de mestrado**. Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, p. 67, 2008.

MAZZUCHELLI, J.; MARTINS, C. Genomic organization of repetitive DNAs in the cichlid fish *Astronotus ocellatus*. **Genetica**, v. 136, p. 461-469, 2009.

MEDSTRAND, P.; VAN DE LAGEMAAT, L.N.; DUNN, C.A.; LANDRY, J.-R.; SVENBACK, D.; MAGER, D.L. Impact of transposable elements on the evolution of mammalian gene regulation. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 110, p. 342-352, 2005.

NAKAYAMA, I.; FORESTI, F.; TEWARI, R.; SCHARTL, M. & CHOURROUT, D. Sex chromosome polymorphism and heterogametic males revealed by two cloned DNA probes in the ZW/ZZ fish *Leporinus elongatus*. **Chromosoma**, v. 103, p. 31-39. 1994.

NOWAK, R. Mining treasures from “junk DNA”. **Science**, v. 263, p. 608-610, 1994.

OZOUF-COSTAZ, C.; BRANDT, J.; KORTING, C.; PISANO, E.; BONILLO, C.; COUTANCEAU, J. P.; VOLFF, J-N. Genome dynamics and chromosomal localization

of the non-LTR retrotransposons *Rex1* and *Rex3* in Antarctic fish. **Antarctic Science**, v. 16, p. 51-57, 2004.

PARISE-MALTEMPI, P.P.; MARTINS, C.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Identification of a new repetitive element in the sex chromosomes of *Leporinus elongatus* (Teleostei: Characiformes: Anostomidae): new insights into the sex chromosomes of Leporinus. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 116, p. 218–223. 2007.

PARISE-MALTEMPI, P.P.; SILVA, E.L.; RENS, W.; DEARDEN, F.; O'BRIEN, P.C.M.; TRIFONOV, V.; FERGUSON-SMITH, M.A. Comparative analysis of sex chromosomes in *Leporinus* species (Teleostei, Characiformes) using chromosome painting. **BMC Genetics (Online)**, v. 14, p. 60, 2013.

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

SCHNEIDER, C.H; GROSS, M.C; TERCENIO, M.L; CARMO, E.J.; MARTINS, C.; FELDBERG E. Evolutionary dynamics of retrotransposable elements *Rex1*, *Rex3* and *Rex6* in neotropical cichlid genomes. **BCM Evolutionary Biology**, v. 13, p. 152, 2013.

SHAPIRO, J.A.; STERNBERG, R.V. Why repetitive DNA is essential to genome function. **Biological Reviews**, v. 80, p. 1-24, 2005.

SILVA, E.L.; BORBA, R.S.; PARISE-MLATEMPI, P.P. Chromosome mapping of repetitive sequences in Anostomidae species: implications for genomic and sex chromosome evolution. **Molecular Cytogenetics**, v. 5, p. 1-8, 2012.

SILVA, E.L.; BUSSO, A.F.; PARISE-MALTEMPI, P.P. Characterization and genome organization of a repetitive element associated with the nucleolar organizer region in *Leporinus elongatus* (Anostomidae: Characiformes). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 129, p. 22-28, 2013.

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

VALENTE, G.T.; MAZZUCHELLI, J.; FERREIRA, I.A.; POLETTO, A.B.; FANTINATTI, B.E.A.; MARTINS, C. Cytogenetic mapping of the retroelements *Rex1*, *Rex3* and *Rex6* among cichlid fish: new insights on the chromosomal distribution of transposable elements. **Cytogenetic and Genome Research (Printed ed.)**, v. 133, p. 34-42, 2010.

VOLFF, J.N.; KÖRTING, C.; SCHARTL, M. Multiple lineages of the non-LTR retrotransposon *Rex1* with varying success in invading fish genomes. **Molecular Biology and Evolution**, v. 17, p. 1673-1684, 2000.

VOLFF, J.N.; KÖRTING, C.; SWEENEY, K.; SCHARTL, M. The non-LTR retrotransposon *Rex3* from the fish *Xiphophorus* is widespread among teleosts. **Molecular Biology and Evolution**, v.16, n. 11, p. 1427-1438, 1999.

VOLFF, J-N. Turning junk into gold: domestication of transposable elements and the creation of new genes in eukaryotes. **BioEssays**, v.28, p.913-922, 2006.

VOTOLIN, T.A. Origem, Herança e Estrutura dos Cromossomos Supranumerários no Gênero *Prochilodus* (Characiformes, Prochilodontidae). **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2012.