



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE BELÉM
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

NAYZA SILVA BARROS

**Mapeamento de sequências repetitivas no cariótipo de *Gymnotus carapo*
(Gymnotiformes, Teleostei) da Área de Proteção Ambiental (APA) da Ilha do Combú,
Belém, Pará**

BELÉM-PA
2023

NAYZA SILVA BARROS

**Mapeamento de sequências repetitivas no cariótipo de *Gymnotus carapo*
(Gymnotiformes, Teleostei) da Área de Proteção Ambiental (APA) da Ilha do Combú,
Belém, Pará**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao colegiado do curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, Modalidade Biologia da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Biologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Cleusa Yoshiko Nagamachi. Laboratório de Citogenética, Instituto de Ciências Biológicas, CEABIO - UFPA

BELÉM-PA
2023

NAYZA SILVA BARROS

**Mapeamento de sequências repetitivas no cariótipo de *Gymnotus carapo*
(Gymnotiformes, Teleostei) da Ilha do Combú, Belém, Pará**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao colegiado do curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, Modalidade Biologia da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Biologia.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Cleusa Yoshiko Nagamachi.
ICB - CEABIO - UFPA

Data de Aprovação:
Conceito:

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª Dr^ª Cleusa Yoshiko Nagamachi.
Orientadora - UFPA

Dr. Willam Oliveira da Silva
Examinador Interno - UFPA

Me. Paula Pinto Rodrigues
Examinador Interno - UFPA

Quem costuma vir de onde eu sou Às vezes
não tem motivos pra seguir
Então levanta e anda, vai, levanta e anda
Vai, levanta e anda
Mas eu sei que vai, que o sonho te traz
Coisas que te faz prosseguir

-Emicida

Aos meus pais, Iranilde e Nazon,
sempre será para vocês

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal do Pará (UFPA) e à Faculdade de Ciências Biológicas, pelo suporte e pela melhor vivência acadêmica possível;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo apoio financeiro à pesquisa;

Aos meus pais, Iranilde Barros e Nazon Barros, por me proporcionarem suporte para que eu pudesse estudar e sempre acreditarem que era possível realizar os meus sonhos;

Aos meus amigos de graduação, Levi, Bruno, Lexi, André, Matheus, Luis e Aisha, pelo companheirismo e por me ajudarem a não desistir durante esses 4 anos;

Às colegas de laboratório, Paula, Ayssa, Noemia, Dona Conci e Ananda pelas risadas e apoio durante a pesquisa;

À minha coorientadora Milla Machado, por me ajudar durante essa trajetória na pesquisa, sempre sendo muito paciente e me mostrando o melhor caminho;

À minha orientadora Cleusa Nagamachi, pesquisadora muito dedicada que me inspira a continuar desenvolvendo pesquisa no Brasil, pelo suporte e confiança;

À todos que me deram suporte e acreditaram no meu potencial.

RESUMO

Gymnotus (Gymnotiformes) é um gênero de peixes elétricos que utilizam descargas de baixa intensidade para comunicação e predação. Esse grupo possui uma grande diversidade cariotípica de número diplóide ($2n$) variando de 34 até 54 cromossomos. As sequências repetitivas são importantes marcadores que podem auxiliar na compreensão da evolução cariotípica das espécies, em especial das crípticas, como o *Gymnotus carapo*. Visando entender a estrutura cariotípica e a evolução do grupo, foram realizados estudos citogenéticos utilizando FISH com sondas snRNA U2, sequências teloméricas, rDNA 5S e rDNA 18S em amostras de *Gymnotus* coletadas na APA da Ilha do Combú, Belém, Pará, Brasil. Os resultados mostram que *Gymnotus carapo* “Combú” possui $2n = 42$ e fórmula cariotípica de 32 m/sm e 10 st/a. A heterocromatina constitutiva ocorre na região centromérica dos cromossomos, com pequenas faixas intersticiais em alguns cromossomos. O rDNA 18S é encontrado em um único par metacêntrico na região proximal do braço longo. O rDNA 5S também é encontrado em um único par metacêntrico na região proximal do braço longo. O snRNA U2 foi evidenciado na região centromérica de um par metacêntrico. As sequências teloméricas ocorrem na região distal de todos os cromossomos, sendo encontradas sequências intersticiais em um par metacêntrico e um par acrocêntrico. Estes resultados mostram que a espécie se encontra em processo de diversificação, evidenciado pelos diversos rearranjos ocorridos, pela diversidade no $2n$ e na marcação dos sinais que ocorre no grupo.

Palavras-Chave: Citogenética; DNA repetitivo; Espécie Críptica; *Gymnotus carapo*.

ABSTRACT

Gymnotus (Gymnotiformes) is a genus of electric fish that use low-intensity discharges for communication and predation. This group has a great karyotypic diversity with a diploid number ($2n$) ranging from 34 to 54 chromosomes. Repetitive sequences are important markers that can help in understanding the karyotypic evolution of species, especially cryptic ones, such as *Gymnotus carapo*. Aiming to understand the karyotypic structure and evolution of the group, cytogenetic studies were carried out using FISH with U2 snRNA probes, telomeric sequences, 5S rDNA and 18S rDNA on *Gymnotus* samples collected in the APA of Ilha do Combú, Belém, Pará, Brazil. The results show that *Gymnotus carapo* “Combú” has $2n = 42$ and a karyotypic formula of $32\ m/sm$ and $10\ st/a$. Constitutive heterochromatin occurs in the centromeric region of chromosomes, with small interstitial bands on some chromosomes. The 18S rDNA is found in a single metacentric pair in the proximal region of the long arm. The 5S rDNA is also found in a single metacentric pair in the proximal region of the long arm. The U2 snRNA was evidenced in the centromeric region of a metacentric pair. Telomeric sequences occur in the distal region of all chromosomes, with interstitial sequences being found in a metacentric pair and an acrocentric pair. These results show that the species is in a process of diversification, evidenced by the various rearrangements that have occurred, the diversity in $2n$ and the marking of signals that occurs in the group.

Keywords: Cytogenetics; repetitive DNA; Cryptic Species; *Gymnotus carapo*.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Ilustração 1 - Distribuição de peixes Gymnotiformes na América Central e do Sul.....	2
Ilustração 2 - Figura representativa do campo eletrostático gerado pelos Gymnotiformes.....	3
Ilustração 3 - A) Localização do rDNA 45S e a conjuntura dos RNAs ribossomais 18S, 5.8S e 28S. B) Localização da família multigênica 5S.....	8
Ilustração 4 - Localização das coordenadas da coleta na Ilha do Combú.....	9
Ilustração 5 - A) Obtenção de citogenética clássica convencional de <i>G. carapo</i> , PA, Combú. B) Bandamento C C) Cromossomos hibridizados com 18S, 5S, U2 e Telomérica.....	15
Tabela 1 – Variação cromossômica no gênero <i>Gymnotus</i>	4
Tabela 2 – Lista dos DNAs repetitivos e os iniciadores utilizados para amplificação e isolamento das sequências repetitivas.....	11
Tabela 3 – Amplificação do rDNA 18S via PCR.....	12
Tabela 4 – Amplificação do rDNA 5S e snRNA U2 via PCR.....	12
Tabela 5 – Amplificação das sequências teloméricas via PCR.....	13

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Ordem Gymnotiformes.....	2
1.2 O Gênero <i>Gymnotus</i>.....	3
1.3 Sequências Repetitivas.....	7
2 METODOLOGIA.....	9
2.1 Amostras Biológicas.....	9
2.2 Citogenética Clássica.....	9
2.2.1 Coloração Convencional.....	9
2.2.2 Bandeamento C.....	9
2.3 Citogenética Molecular.....	10
2.3.1 Extração de DNA.....	10
2.3.2 Isolamento e amplificação dos DNAs repetitivos.....	11
2.3.3 Marcação de sondas.....	13
2.3.4 Hibridização <i>In Situ</i> Fluorescente.....	13
2.4 Obtenção e análise de imagens.....	14
3 RESULTADOS.....	15
4 DISCUSSÃO.....	15
5 CONCLUSÃO.....	18
REFERÊNCIAS.....	17

1. INTRODUÇÃO

Os peixes são vertebrados extremamente diversos, de importante utilização para o entendimento do processo evolutivo como um todo. Dentre esta classificação, os peixes de água doce acumulam uma grande quantidade de mudanças e traços evolutivos específicos, pois aliado ao processo evolutivo já conhecido, há a interação das mudanças geográficas que aconteceram durante a história geológica terrestre (Goldblatt, 1993).

As linhagens das três principais ordens de peixes amazônicos são os Characiformes, Siluriformes e Gymnotiformes. Estas linhagens evolutivas são pertencentes à história de conformação da Gondwana e à mais recente formação da Cordilheira dos Andes (Ribeiro, 2006; Dagosta, De Pinna, 2017). Dessa forma abrangendo uma grande diversidade de características em espécies conhecidas atualmente, mas que perpassou por demasiados eventos evolutivos (Dagosta & Pinna 2018).

Os peixes neotropicais são responsáveis por 13% da biodiversidade de vertebrados sendo os que apresentam a maior taxa de variação genética (Lowe-McConnell, 1999; Agostinho *et al.*, 2005), garantindo à América do Sul uma concentração de pool genético muito grande, sendo facilmente encontrado variações cariotípicas distintas nas espécies. Segundo Lewinsohn e Prado (2002), apenas 10% de espécies da fauna, flora e de microorganismos da biodiversidade do Brasil são conhecidas, apresentando um grande número de espécies a serem descobertas. Nesse sentido, a utilização de marcadores genéticos nessas famílias, possibilitam uma melhor caracterização do cariótipo das espécies e auxiliam no entendimento do processo evolutivo de cada espécie.

O avanço das técnicas de citogenética molecular têm possibilitado uma ampliação da compreensão da evolução e organização do genoma em peixes, permitindo-nos obter informações mais detalhadas sobre vários aspectos das questões evolutivas. Com a citogenética é possível constatar a ocorrência de espécies crípticas, que seriam espécies morfologicamente indistinguíveis, mas geneticamente são incompatíveis, como se propõe em *Gymnotus carapo* (Milhomem *et al.*, 2008; Nagamachi *et al.*, 2010; da Silva *et al.*, 2019; Machado *et al.*, 2022). Estes resultados demonstram a importância da citogenética como ferramenta auxiliar para uma melhor

compreensão da variabilidade cromossômica, como demonstrado em *G. carapo* (Fernandes- Matioli *et al.*, 1998; Milhomem *et al.*, 2008; Utsunomia *et al.*, 2018).

1.2. Ordem Gymnotiformes

A ordem Gymnotiformes representa um grupo de peixes neotropicais que abrange 276 espécies distribuídas em cinco famílias válidas que habitam desde os Pampas da Argentina até Chiapas no México (Tagliacollo *et al.*, 2016): Gymnotidae, Hypopomidae, Rhamphichthyidae, Sternopygidae e Apterontidae (Alves-Gomes *et al.*, 1995; Albert & Campos-da-Paz, 1998; Albert & Crampton, 2005; Tagliacollo *et al.*, 2016; Fricke, R. *et al.*, 2023).

Geralmente habitam riachos, pântanos, áreas costeiras e córregos, ricos em plantas aquáticas e com baixa luminosidade. Os gêneros *Gymnotus* e *Brachyhypopomus* comumente se encontram em planícies aluviais (Albert and Crampton, 2001; Crampton, 1996, 1998; Tagliacollo *et al.*, 2016).

Figura 1 - Distribuição de peixes Gymnotiformes na América Central e do Sul.



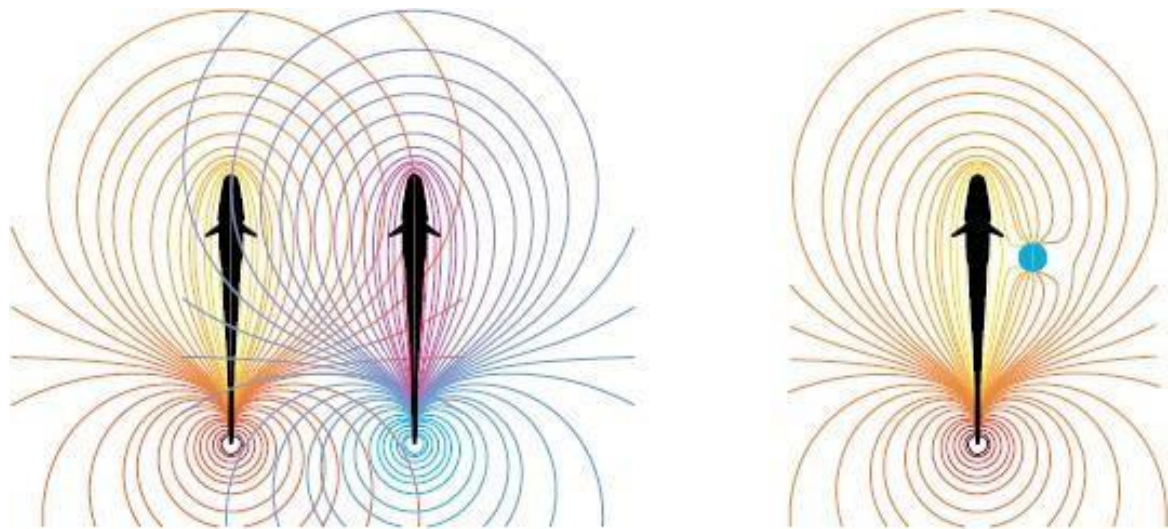
Fonte : Albert & Campos-da-Paz (1998).

Os Gymnotiformes apresentam a capacidade de gerar e utilizar campos elétricos, tanto para eletrolocalização de objetos e outros organismos, quanto para a interação social, através de órgãos elétricos (OES) e de eletroreceptores (formado por células musculares diferenciadas) que se encontram distribuídos pelo corpo (Albert and Crampton, 2005b; Von Der Emde, 2013). Além disso, possuem órgãos eletroreceptores sensoriais que percebem diferenças de voltagens no ambiente externo (Caputi *et al.*, 2005).

O corpo dos Gymnotiformes é especializado e em associação com a eletro-recepção (Albert,

2001), são morfologicamente diferenciados por possuírem o corpo delgado e comprimido (na maioria das espécies) ou cilíndrico (Gymnotidae), nadadeira anal bastante desenvolvida, com mais de 100 raios que lhes permitem nadar para frente e para trás através de movimentos ondulatórios, nadadeira caudal reduzida ou ausente (Apteronotidae) e ausência de nadadeira dorsal (Albert and Crampton, 2005).

Figura 2 - Figura representativa do campo eletrostático gerado pelos Gymnotiformes.



Fonte: Krahe (2004). Nature Reviews Neuroscience

1.3 O Gênero *Gymnotus*

Gymnotus é um gênero monofilético de ampla distribuição na América do Sul, com maior ocorrência na Bacia Amazônica, podendo também ser encontrado em assembléias simpátricas, composto por grupos de espécies não monofiléticas (Albert *et al.*, 2005). Apesar da simpatria, as espécies podem não se reproduzir devido a barreiras pós-zigóticas, pré-zigóticas e isolamento causado pelas formas da onda elétrica que são espécie-específicas, colaborando para o processo de especiação (Crampton *et al.*, 2011; Crampton, 2006).

São descritas 50 espécies atualmente e se caracteriza como o gênero mais especioso da ordem (Ferraris Jr. *et al.*, 2017; Craig *et al.*, 2018a, 2018b; Campos da Paz and de Santana, 2019; Fricke *et al.*, 2023). São utilizados como isca viva na pesca esportiva, sendo a mais escolhida pelas espécies de peixes consideradas nobres, como os piscívoros de grande porte,

principalmente o dourado (*Salminus maxillosus*) e até peixes onívoros como os Brycons sp. (piracanjuba, matrinxã) (Ushizima & Bock, 2000).

A citogenética de peixes constitui-se em um campo de estudo que tem fornecido informações importantes a respeito da evolução cariotípica e compreensão da fixação de rearranjos cromossômicos. Além disso, tem contribuído para o maior conhecimento da diversidade ictiológica auxiliando na citotaxonomia do grupo e na identificação de espécies crípticas (Bertollo, Moreira-Filho, Takahashi 1978; Milhomem et al., 2008; Nagamachi *et al.*, 2010). Os dados citogenéticos do gênero mostram uma grande variação cromossômica entre $2n= 34$ até $2n= 54$ cromossomos (Tabela 1).

Tabela 1- Variação cromossômica no gênero *Gymnotus*

Espécie	2n	FC	NOR	rDNA 18S	rDNA 5S	Tc1/mariner	U2 snDNA	Referência
<i>Gymnotus arapaima</i>	44	24m/sm+ 20st/a	19p	19p	-	-	-	Milhomem <i>et al.</i> (2012b)
<i>Gymnotus bahianus</i>	♀36	30m/sm+ 6st	7p int	7p int	9p int	-	-	Almeida <i>et al.</i> (2015)
<i>Gymnotus bahianus</i>	♂37	32m/sm+ 5st	7p int	7p int	9p int	-	-	Almeida <i>et al.</i> (2015)
<i>Gymnotus carapo</i>	54	54m/sm	-	-	-	-	-	Foresti <i>et al.</i> (1984)
<i>Gymnotus carapo</i>	52	50m/sm+ 2st/a	-	-	-	-	-	Foresti <i>et al.</i> (1984)
<i>Gymnotus carapo</i>	48	34m/sm+ 14st/a	-	-	-	-	-	Foresti <i>et al.</i> (1984)
<i>Gymnotus carapo</i>	42	32m/sm+ 10st/a	-	1 par	7 pares	-	-	Claro (2008)
<i>Gymnotus carapo</i>	54	52m/sm+ 2st/a	1p	-	-	-	-	Fernandes-Matioli <i>et al.</i> (1998)
<i>Gymnotus carapo</i>	42	30m/sm+ 12st/a	20p	-	-	-	-	Milhomem <i>et al.</i> (2007)
<i>Gymnotus carapo</i>	40	28m/sm+ 12st/a	20p	-	-	-	-	Milhomem <i>et al.</i> (2008)
<i>Gymnotus carapo</i>	42	36m/sm+ 6st/a	-	-	3q	-	1q	Utsunomia <i>et al.</i> (2014)
<i>Gymnotus carapo</i>	42	-	-	-	-	-	-	Utsunomia <i>et al.</i> (2018)
<i>Gymnotus cf. carapo</i>	54	50m/sm+ 4st/a	1p int	1p int	15 pares	-	-	Scacchetti <i>et al.</i> (2011a)

Tabela 1- Variação cromossômica no gênero *Gymnotus*
(Continuação)

Espécie	2n	FC	NOR	rDNA 18S	rDNA 5S	Tc1/mari ner	U2 snDNA	Referência
<i>Gymnotus carapo</i> 'Catalão'	40	30m/sm+ 10st	-	19p term	8q int, 11q int	-	-	da Silva <i>et al.</i> (2014)
<i>Gymnotus carapo</i> 'Maranhão'	42	30m/sm+ 12st/4a	-	20p term	1 prox, 6q dist, 7p term, 10p prox, 17p term, 18p term, 19p term + 7 pares	-	-	da Silva (2015, 2019)
<i>Gymnotus capanema</i>	34	20m/sm+ 14st/a	15p	15p	-	-	-	Milhomem <i>et al.</i> (2012a)
<i>Gymnotus capanema</i>	34	20m/sm+ 14st/a	-	-	-	-	-	Utsunomia <i>et al.</i> (2018)
<i>Gymnotus coatesi</i>	50	24m/sm+ 26st/a	4, 5, 9, 13, 18,22	21 sítios	17q int	-	-	Machado <i>et al.</i> (2017)
<i>Gymnotus coropinae</i>	♀50	28m/sm+ 22st/a	-	18p term	15q term	-	-	da Silva <i>et al.</i> (2014)
<i>Gymnotus coropinae</i>	♂49	26m/sm+ 23st/a	-	18p term	15q term	-	-	da Silva <i>et al.</i> (2014)
<i>Gymnotus cuia</i>	54	-	-	-	-	-	-	Utsunomia <i>et al.</i> (2018)
<i>Gymnotus inaequilabiatus</i>	52	50m/sm+ 2st/a	23p	-	-	-	-	Fernandes-Matioli <i>et al.</i> (1998)
<i>Gymnotus inaequilabiatus</i>	54	52m/sm+ 2st/a	1p int	1p int	17 pares	-	-	Scacchetti <i>et al.</i> (2011a)
<i>Gymnotus inaequilabiatus</i>	54	52m/sm+ 2st/a	-	-	13 pares	-	5q	Utsunomia <i>et al.</i> (2014)
<i>Gymnotus javari</i>	50	20m/sm+ 30st/a	-	-	14q	-	11p	Utsunomia <i>et al.</i> (2014)
<i>Gymnotus jonasi</i>	52	12m/sm+ 40st/a	9q, 10q,11p	9q, 10q, 11p	-	-	-	Milhomem <i>et al.</i> (2012b)
<i>Gymnotus mamiraua</i>	54	50m/sm+ 4st/a	24p	24p	-	-	-	Milhomem <i>et al.</i> (2012b)
<i>Gymnotus mamiraua</i>	54	38m/sm+ 16st/a	-	21p int	16 pares	16 pares	-	da Silva <i>et al.</i> (2016, 2019)
<i>Gymnotus pantanal</i>	40	14m/sm+ 26st/a	1q term, 9q term	-	-	-	-	Fernandes <i>et al.</i> (2005)
<i>Gymnotus pantanal</i>	♀40	14m/sm+ 26st/a	16p term	-	-	-	-	Margarido <i>et al.</i> (2007)
<i>Gymnotus pantanal</i>	♂39	15m/sm+ 24st/a	16p term	-	3 per, 5 per	-	-	Silva <i>et al.</i> (2011)
<i>Gymnotus pantanal</i>	♀40	14m/sm+ 26st/a	16p	16p	3 per, 5 per	-	-	de Sousa <i>et al.</i> 2017

Tabela 1- Variação cromossômica no gênero *Gymnotus* (Continuação)

Espécie	2n	FC	NOR	rDNA 18S	rDNA 5S	Tc1/mari ner	U2 snDNA	Referência
<i>Gymnotus pantanal</i>	♂39	15m/sm+ 24st/a	16p	16p	3 per, 5 per	-	-	de Sousa <i>et al.</i> 2017
<i>Gymnotus pantanal</i>	♀40	14m/sm+ 26st/a	-	-	2q, 4q	-	8,9,10, 11, 12, 13, 14, 15, 18, X1	Utsunomia <i>et al.</i> (2014)
<i>Gymnotus pantanal</i>	♂39	15m/sm+ 24st/a	-	-	2q, 4q	-	8,9,10, 11, 12, 13, 14, 15, 18, X1	Utsunomia <i>et al.</i> (2014)
<i>Gymnotus pantanal</i>	♀40	-	-	-	-	-	-	Utsunomia <i>et al.</i> (2018)
<i>Gymnotus pantanal</i>	♂39	-	-	-	-	-	-	Utsunomia <i>et al.</i> (2018)
<i>Gymnotus pantanal</i>	♀40	14m/sm+ 26st/a	-	-	-	-	-	Braga <i>et al.</i> (2021)
<i>Gymnotus pantanal</i>	♂39	15m/sm+ 24st/a	-	-	-	-	-	Braga <i>et al.</i> (2021)
<i>Gymnotus pantherinus</i>	52	46m/sm+ 6st/a	3	-	-	-	-	Fernandes- Matioli <i>et al.</i> (1998)
<i>Gymnotus pantherinus</i>	52	50m/sm+ 2st	1p int	1p int	3p 3 5p	-	-	Scacchetti <i>et al.</i> (2011a)
<i>Gymnotus pantherinus</i>	52	50m/sm+ 2st	-	-	3p e 5p	-	4p	Utsunomia <i>et al.</i> (2014)
<i>Gymnotus paraguensis</i>	54	52m/sm+ 2st	27p prox	-	-	-	-	Margarido <i>et al.</i> (2007)
<i>Gymnotus paraguensis</i>	54	52m/sm+ 2st	-	-	19 pares per	-	-	da Silva <i>et al.</i> (2011)
<i>Gymnotus paraguensis</i>	54	50m/sm+ 4st	1p	-	-	-	-	Lacerda and Maistro (2007)
<i>Gymnotus paraguensis</i>	54	50m/sm+ 4st	1p int	17 pares	-	-	-	de Sousa <i>et al.</i> (2017)
<i>Gymnotus paraguensis</i>	54	48m/sm +6st/a	-	-	-	-	-	Braga <i>et al.</i> (2021)
<i>Gymnotus cf. pedanopterus</i>	50	42m/sm+ 8st/a	-	23p	24q int	-	-	da Silva (2015, 2019)
<i>Gymnotus cf. stenoleucus</i>	48	20m/sm+ 28st/a	-	-	-	-	-	da Silva (2015)
<i>Gymnotus sylvius</i>	40	38m/sm+ 2st/a	18p	-	-	-	-	Fernandes- Matioli <i>et al.</i> (1998)
<i>Gymnotus sylvius</i>	40	30m/sm+ 10st/a	-	-	-	-	-	Albert <i>et al.</i> (1999)
<i>Gymnotus sylvius</i>	40	38m/sm+ 2st/a	-	1 par	1 par	-	-	Claro <i>et al.</i> (2008)

Tabela 1- Variação cromossômica no gênero *Gymnotus*
(Continuação)

Espécie	2n	FC	NOR	rDNA 18S	rDNA 5S	Tc1/mari ner	U2 snDNA	Referência
<i>Gymnotus sylvius</i>	40	36m/sm+ 4st/a	19p term	-	-	-	-	Lacerda and Maistro (2007)
<i>Gymnotus sylvius</i>	40	36m/sm+ 4st/a	20p term	-	-	-	-	Margarido <i>et al.</i> (2007)
<i>Gymnotus sylvius</i>	40	34m/sm+ 6st	2p int	2p int	5q int	-	-	Scacchetti <i>et al.</i> (2011a)
<i>Gymnotus sylvius</i>	40	36m/sm+ 4st/a	20p	20p	4 peri	-	-	de Sousa <i>et al.</i> 2017
<i>Gymnotus sylvius</i>	40	34m/sm+ 6st	-	-	4q	-	1q	Utsunomia <i>et al.</i> (2014)
<i>Gymnotus sylvius</i>	40	-	-	-	-	-	-	Utsunomia <i>et al.</i> (2018)
<i>Gymnotus sylvius</i>	40	36m/sm +4st/a	-	-	-	-	-	Braga <i>et al.</i> (2021)
<i>Gymnotus sp.</i>	40	14m/sm+ 26st/a	16p term	-	-	-	-	Silva and Margarido (2005)
<i>Gymnotus sp.</i>	39	15m/sm+ 24st/a	16p term	-	-	-	-	Silva and Margarido (2005)
<i>Gymnotus sp.</i>	50	26m/sm+ 24 st/a	19p term	-	-	-	-	Lacerda and Maistro (2007)
<i>Gymnotus sp.</i> 'Negro'	♀50	22m/sm+ 28st	-	18p term	3p int, 15q int	-	-	da Silva <i>et al.</i> (2014)
<i>Gymnotus sp.</i> 'Negro'	♂50	21m/sm+ 29st	-	18p term	3p int, 15q int	-	-	da Silva <i>et al.</i> (2014)
<i>Gymnotus cf.</i> <i>stenoleucus</i>	48	26m/sm+ 22a	-	14q int	1p int	-	-	da Silva (2019)
<i>Gymnotus ucamara</i>	44	28m/sm+ 16st/a	-	18p	13q, 20p term	-	-	da Silva (2015, 2019)

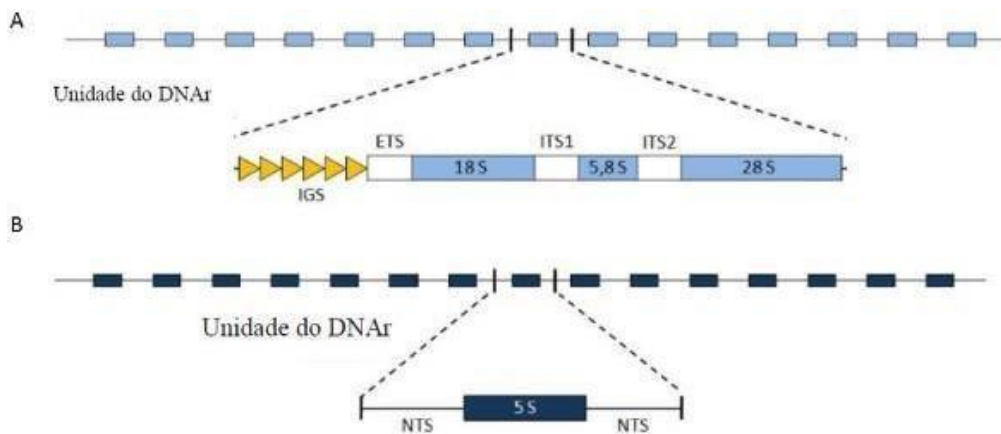
*p- braço curto do cromossomo; q- braço longo do cromossomo; int- região intersticial; peri- região pericentromérica; term- região terminal; m/sm- metacêntrico/submetacêntrico; st/a- shtelocêntrico/acrocêntrico; FC- Fórmula Cariotípica; NOR- Região Organizadora de Nucléolo; rDNA- DNA ribossomal; sp.- Espécie ainda não identificada.

1.1 Sequências Repetitivas

Os DNAs repetitivos são sequências de DNA que se repetem constantemente, formando grandes frações no genoma das células eucarióticas. Podem ser classificados como sequências codificantes, ao qual representam famílias multigênicas que codificam proteínas e RNAs importantes. Além disso, podem ser categorizados como não-codificantes que abrangem sequências *in tandem*, como minissatélites, microssatélites, DNAs satélites e sequências dispersas, como os transposons e retrotransposons (Charlesworth *et al.*, 1994).

Dentre as famílias multigênicas, as sequências de genes que transcrevem os RNAs ribossomais são conservadas evolutivamente com muita eficiência e nos eucariotos estão organizadas em dois grupos configurados *in tandem*. O maior conjunto é o DNAr 45S, o qual compõe genes que transcrevem os RNAs ribossomais 18S, 5.8S e 28S. Estes genes são separados por espaçadores intergênicos transcritos internos (ITS), os clusters de DNAr 45S separados por espaçadores transcritos externos (ETS) e por espaçadores intergênicos (IGS) e estão em regiões organizadoras de nucléolos (NORs). Outro conjunto conhecido é o RNAr 5S, são conservados e espaçados por sequências não transcritas (NTS) e não está envolvido na formação de NORs (Martins *et al.*, 2011; Eickbush & Eickbush, 2007) (Figura 1).

Figura 3 - A) Localização do DNAr 45S e a conjuntura dos RNAs ribossomais 18S, 5.8S e 28S. B) Localização da família multigênica 5



Além disso, existe a família multigênica snRNA U(n), que participa do complexo RNA-proteína. O snRNA U2 participa da formação do spliceossomo, atuando no processo de maturação do mRNA (Colgan *et al.*, 1998). O gene U2 em específico é altamente conservado no genoma de eucariotos, no entanto, as famílias multigênicas podem manter outra estratégia para conservar suas sequências, podendo a sua localização ser observado em diferentes cromossomos do gênero *Gymnotus* (Matera *et al.*, 1990; Utsunomia *et al.*, 2014).

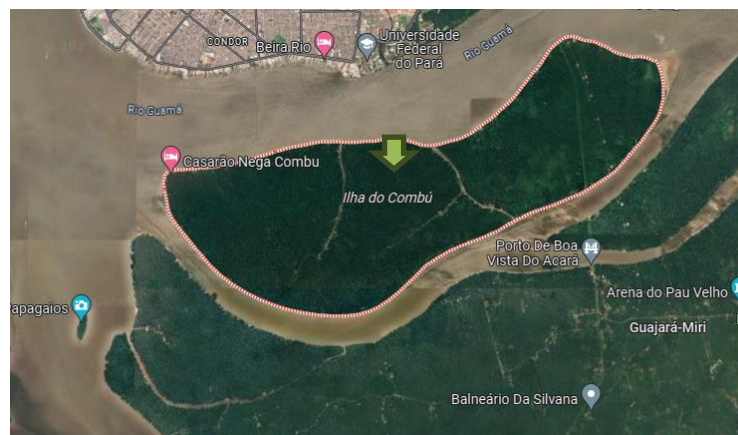
As marcações das sequências repetitivas ajudam a entender melhor os rearranjos que ocorrem entre espécies e também a mapear a diversidade cromossômica presente (Utsunomia *etal.*, 2014). Ainda há muito o que compreender sobre essas sequências repetitivas no genoma de peixes, principalmente no gênero *Gymnotus*, tendo em vista que este grupo é extremamente diversificado e que está em constante mudança cromossômica.

2 - METODOLOGIA

2.1 Amostras Biológicas

Foram utilizadas amostras previamente armazenadas no Laboratório de Citogenética Animal, no Centro de Estudos Avançados da Biodiversidade (CEABIO/UFGA), com coordenadas 1°29'25.1"S 48°27'09.7"W e armazenadas com o número P3327 como coleção zoológica.

Figura 4 – Localização das coordenadas da coleta na Ilha do Combú.



Fonte: Google Maps

Foram analisados quatro espécimes de *Gymnotus carapo*, caracterizados como 3 machos e 1 fêmea, provenientes da Área de Proteção Ambiental (APA) da ilha do Combú, Belém, Pará, Brasil.

2.2 Citogenética Clássica

2.2.1 Coloração convencional

A coloração convencional foi realizada com Giemsa a 5% diluído em tampão fosfato pH 6,8, durante 10 minutos. Em seguida, a lâmina foi lavada com água destilada e deixada secar em temperatura ambiente.

2.2.2 Bandeamento C

Para a caracterização do padrão de heterocromatina constitutiva foi utilizada a técnica de bandeamento C, segundo Sumner (1972), com adaptações. A lâmina contendo o material citológico foi colocada em solução de ácido clorídrico (HCl) 0,2 N durante 15 minutos, lavada

com água destilada e deixada secar a temperatura ambiente. Em seguida foi incubada em solução de hidróxido de Bário a 5% ($\text{Ba}(\text{OH})_2$) a 60°C durante 1 minuto e passada rapidamente em solução de HCl 0,1N.

Posteriormente, foi colocada em solução salina de 2xSSC a 60°C por 15 minutos. Por fim, a lâmina foi corada com Wright 3:1 durante 10 minutos.

Metáfases submetidas às técnicas de citogenética clássica foram capturadas pelo software Nis Elements em microscópio Olympus BX41 e com câmera digital CCD 1300QDS.

2.3 Citogenética Molecular

2.3.1 Extração de DNA

O DNA total foi extraído de fragmentos de tecido epitelial da nadadeira dorsal, utilizando o kit Pure Link Genomic DNA MiniKit (Invitrogen) segundo as instruções do fabricante ou utilizando o método de fenol-clorofórmio descrito por Sambrook & Russel (2001), com modificações.

Para tanto, adicionou-se a um tubo de 1,5 mL 0,02 g do tecido muscular e 500 μL de tampão de lise (8 mL de Tris-HCl 1M pH 8,0, 1 mL NaCl 0,3 M, 2 mL EDTA 0,5M e 20 mL de SDS 10% e água para completar 100 mL) de acordo com Estoup *et al.* (1993) e houve o acréscimo de uréia

4M segundo Asahida *et al.* (1996). Em seguida foi acrescentado 15 μL de proteinase K (10 mg/mL) e as amostras foram incubadas a 60 °C por aproximadamente 1 hora com agitação. Posteriormente as amostras foram incubadas 37 °C acrescentando-se 15 μL de RNase (10 mg/mL).

Após a digestão total do tecido foram feitas lavagens sucessivas com fenol-clorofórmio (1:1) e clorofórmio. O DNA foi separado das proteínas por precipitação salina com centrifugação a 14000 rpm e o sobrenadante foi precipitado com 600 μL de isopropanol 100% gelado também com o auxílio de centrifugação. Ao final, o DNA precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70% com centrifugação a 14000 rpm e hidratado com aproximadamente 100 μL de água milli-Q, dependendo do tamanho do pellet formado.

A integridade e a quantidade das amostras de DNA obtidas foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1% imerso em tampão TAE 1X (Tris-Ácido acético-EDTA), corado com corante GelRed (0,1 $\mu\text{L}/\text{mL}$) (Sambrook & Russell, 2001) e visualizado em

transiluminador (Hoefler UV-25), sob luz ultravioleta. A quantidade e a qualidade do DNA obtido foram também avaliadas em espectrofotômetro (Nano Drop ND-1000 Spectrophotometer -Thermo Fisher Scientific), por meio da comparação de absorbância a 260-280 nm.

2.3.2 Isolamento e amplificação dos DNAs repetitivos

As seqüências de DNAs repetitivos de interesse para o mapeamento cromossômico foram isoladas e amplificadas por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando iniciadores descritos na literatura (Tabela 2).

Tabela 2- Lista dos DNAs repetitivos e os iniciadores utilizados para amplificação e isolamento de seqüências repetitivas.

DNA repetitivo	Iniciadores	Referências
rDNA 18S	F:5'CCGCTTTGGTGACTCTTGAT R:5'CCGAGGACCTCACTAAACCA	Silva <i>et al.</i> 2011
rDNA 5S	F:5' -GCC ACA CCA CCC TGA ACA C-3' R:5' -GCC TAC GAC ACC TGG TAT TC-3'	Martins & Galetti Jr.1999
snRNA U2	F:5' -TCT CGG CCT (AT)(AT)T GGC TAA R:5' -G(AC)G GTA (GC)TG CAA TAC CGG	Colgan <i>et al.</i> , 1998
Telomérico	TTAGGG	Dahse <i>et al.</i> , 1997; Meeker <i>et al.</i> , 2002

=

As sondas de rDNA 18S, rDNA 5S e snRNA U2 e das seqüências teloméricas foram obtidas a partir da amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR - Saiki *et al.* 1988), a mesma concentração dos reagentes foram mantidas, porém sem a presença de DNA molde para as seqüências teloméricas, devido à característica de auto anelamento de dupla fita dos primers.

As reações foram processadas em termociclador e os primers utilizados para a amplificação destas seqüências alvos, bem como os perfis dos ciclos de amplificação foram os seguintes (Tabelas 3, 4 e 5).

Tabela 3 – Amplificação do rDNA 18S via PCR

Reagentes	Volume	Ciclos	rDNA 18S
-----------	--------	--------	----------

		Temperatura		Tempo
H ₂ O	15,45 µL	1. Desnaturação inicial	95°C	5 min
Tampão (10x)	2,5 µL			
		2. Desnaturação com temperatura	95°C	40 seg
fix dNTPs(8mM)	1,5 µL			
Primer F	1,5 µL	3. Anelamento	55°C	40 seg
Primer R	1,5 µL			
		4. Elongação	72°C	2 min
NA (100ng/µL)	1 µL			
		5. Repetições	30 x	
MgCl ₂ (50mM)	1,25 µL			
Taq polimerase	0,3 µL	6. Extensão final	72°C	5 min
Volume final	25 µL			
		7. Holding	4°C	-

mM: milímetros; **ng:** nanogramas; **µL:** microlitros; **min:** minutos; **seg:** segundos; **°C:** graus Celsius.

Tabela 4 – Amplificação do rDNA 5S e snRNA U2 via PCR.

Reagentes	Volume	Ciclos	rDNA 5S		snRNA u2	
			Temp (°C)	Tempo	Temp (°C)	Tempo
H ₂ O	7,15 µL	1. Desnaturação inicial	94	1'	95	5'
Tampão (10x)	1,5 µL					
dNTPs (1mM)	3,0 µL	2. Desnaturação com temperatura	94	1'	95	45"
Primer F	0,6 µL					
Primer R	0,6 µL	3. Anelamento	57	1'	52	45"
DNA (100ng/ µL)	1 µL					
		4. Elongação	72	1'	72	1'30"
MgCl ₂ (50mM)	1 µL					
Taq polimerase	0,15	5. Extensão final	30x		35x	
Volume final	15 µL					
		6. Holding	4		4	-

mM: milímetros; **ng:** nanogramas; **µL:** microlitros; **min:** minutos; **seg:** segundos; **°C:** graus Celsius.

Tabela 5 - Amplificação das sequências teloméricas via PCR.

Reagentes	Volume	Ciclos	Telomérica		mM:
			Temperatura	Tempo	
H ₂ O	8,15 µL	1. Desnaturação	94° C	1'	
Tampão (10x)	1,5 µL	2. Anelamento	55° C	3"	
dNTPs (1mM)	3,0 µL	3. Extensão	72° C	1'	
Primer F	0,6 µL	Repetições 1-3	10x		
Primer R	0,6 µL	4. Desnaturação	94° C	1'	
MgCl ₂ (50mM)	1 µL	5. Anelamento	60° C	30"	
Taq polimerase	0,15	6. Extensão	72° C	1'30"	
Volume final	15 µL	Repetições 4-6	30x		
		7. Extensão final	72° C	5'	
		8. Holding	4° C		

milímetros; ng: nanogramas; µL: microlitros; min: minutos; seg: segundos; °C: graus Celsius.

Os produtos de PCR foram submetidos a Eletroforese em gel de agarose 1% para verificação da amplificação da sequência desejada.

2.3.3 Marcação das sondas

As sondas foram construídas e marcadas também através de: 1) PCR utilizando a incorporação de dUTP biotilado (Invitrogen) seguindo os protocolos de amplificação por PCR para cada uma das sequências; 2) Nick-translation usando o kit Bionick (Invitrogen) para marcação com biotina e Dig-nick (Roche) para as marcações com digoxigenina.

2.3.4 Hibridização *In Situ* Fluorescente

A hibridização das sondas nos cromossomos metafásicos foram realizadas segundo a técnica descrita por Pinkel *et al.* (1986), com modificações.

As lâminas de FISH foram tratadas em solução de Pepsina (1%) durante 10 minutos a temperatura ambiente, 37°C. Em seguida, lavadas 2 vezes em solução salina concentrada (2xSSC) por 10 minutos cada, também a temperatura ambiente. A seguir, as lâminas foram submetidas à uma série alcoólica para desidratar, nesta ordem: álcool 70% por 2 vezes durante 2 minutos cada, álcool 90% por 2 vezes durante 2 minutos cada; e álcool 100% por 1 vez durante 1 minuto. Então, as lâminas foram envelhecidas durante 1 hora em estufa a 60°C.

Em solução de Formamida 70%, as lâminas com preparação metafásica foram desnaturadas por 55 segundos a 65°C, e posteriormente imersas em álcool 70% gelado durante 4 minutos. Após, as lâminas foram submetidas à uma série alcóolica, na seguinte ordem: álcool 70% por 1 vez durante 2 minutos; álcool 90% por 2 vezes durante 2 minutos cada; e álcool 100% 1 vez durante 1 minuto. Em seguida, foram adicionados 2µl de sonda em 10µl de tampão de hibridização 77%, e então foram desnaturadas em termociclador a 70°C por 15 minutos e posteriormente despejada sobre o material cromossômico. Finalmente, a lâmina foi coberta com lamínula e mantida em câmara úmida em estufa a 37°C por 24 horas.

Adiante, as lâminas foram levadas a lavagem de estringência em banho Maria a temperatura de 42°C (77% de estringência). No banho Maria as lâminas foram imersas em solução de Formamida 50% durante 5 minutos, e colocadas imediatamente em solução de 2xSSC por 5 minutos e por fim colocadas em solução de 4xTween por 5 minutos.

Os sinais de hibridização foram detectados com anti-digoxigenina-FITC ou avidina-CY3. Foi adicionado 0,2µl de anti-digoxigenina-FITC ou 0,4µl avidina-CY3 em 100µl de 4xTween. A solução de detecção foi despejada sobre as lâminas, e então cobertas com parafilme e mantidas em câmara escura por 35 minutos a 37°C. Em seguida, as lâminas foram lavadas em solução de 4xTween por 5 minutos em temperatura ambiente. Finalmente, foi despejado 7µl de DAPI com antifade sobre a lâmina, que imediatamente foi coberta com lamínula, selada com esmalte transparente e armazenada em caixa apropriada.

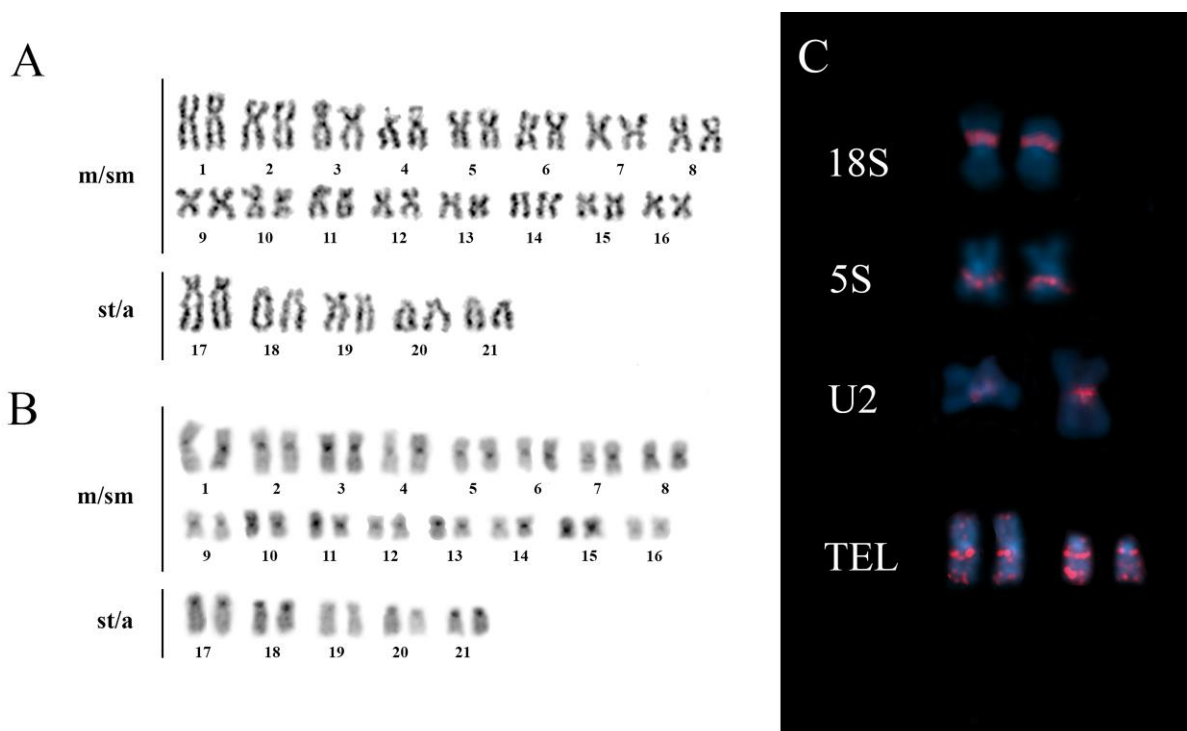
2.4 Obtenção e análise de imagens

As imagens de metáfases submetidas a técnicas de bandeamentos cromossômicos foram obtidas através de microscópio Olympus BX41, com câmera digital CCD 1300QDS utilizando software GenAis (Applied Spectral Imaging). As imagens de metáfases submetidas a técnicas fluorescentes foram obtidas utilizando o software Nis-Elements em microscópio de fluorescência Nikon H550. Os cariótipos foram montados seguindo a classificação da morfologia cromossômica proposta por Levan *et al.* (1964) com adaptações: metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a). A montagem e edição das imagens foi realizada utilizando software Adobe Photoshop CS23.

3. RESULTADOS

Gymnotus carapo “Combú” possui $2n = 42$ e fórmula cariotípica de 32 m/sm e 10 st/a. A heterocromatina constitutiva ocorre na região centromérica dos cromossomos, com pequenas faixas intersticiais em alguns cromossomos. O rDNA 18S é encontrado em um único par metacêntrico na região proximal do braço longo. O rDNA 5S também é encontrado em um único par metacêntrico na região proximal do braço longo. O snRNA U2 marca na região centromérica de um par metacêntrico. As sequências teloméricas ocorrem na região distal de todos os cromossomos, porém, foram encontradas sequências intersticiais em um par metacêntrico e um par acrocêntrico.

Figura 5 - A) Obtenção de citogenética clássica convencional de *G. carapo*, PA, Combú. B) Bandamento C) Cromossomos hibridizados com 18S, 5S, U2 e Telomérica.



m/sm = Metacêntrico/submetacêntrico; st/a = subtelocêntrico/acrocêntrico.

4. DISCUSSÃO

Devido à complexidade genética da família Gymnotidae, foi estabelecida uma subdivisão em seis clados: clado *Electrophorus*, clado G1, clado *Pantherinus*, clado G2, clado *cylindricus* e clado *carapo* (Lovejoy *et al.*, 2010). A espécie presente, *Gymnotus carapo*

pertence ao clado *carapo* e confirma a abundante plasticidade e diversidade do gênero.

A fórmula cariotípica de $2n = 42$, com a conformação 32 m/sm e 10 st/a encontrada para o espécime do “Combú” apresenta o mesmo $2n$ encontrado por Milhomem et al. (2008), porém com a fórmula cariotípica diferente (30 m/sm e 12 st/a). *Gymnotus carapo* “Combú” ($2n=42$, FC 32 m/sm, 10 st/a) ocorre em uma ilha próximo ao Rio Guamá, onde ocorre *G. carapo* “São Miguel do Guamá” ($2n=42$, FC 30 m/sm e 12 st/a) (Milhomem et al., 2008). No mesmo estudo, a população de Almeirim apresenta a fórmula cariotípica diferente, porém, apresenta um par de ITS diferente da encontrada na população do Combú, com duas marcações ITS. Logo, a existência de ITS na população do Combú pode ser um indicativo de polimorfismo na população evidenciando um rearranjo cromossômico ou a caracterização de uma espécie críptica no complexo de espécies *Gymnotus carapo*. Em Gymnotidae, as regiões organizadoras de nucléolo (NOR) encontram, em sua maioria, localizados em um único par cromossômico com exceção de *G. jonsi* (Milhomem et al., 2012), *G. pantanal* (Fernandes et al., 2005), *G. coatesi* (Machado et al. 2017) e em um citótipo de *E. electricus* (Fonteles et al. 2008). Milhomem et al. (2013) demonstraram por pintura cromossômica o par portador da NOR de *G. carapo* em associação com sondas de rDNA 18S, que dentro do clado *G. carapo* o cromossomo portador da NOR é considerado uma sinapomorfia.

A hibridização *in situ* do gene ribossômico 18S corroborou dados previamente obtidos para coloração por nitrato de prata (Fernandes-Matioli, 1996), confirmando a existência de apenas um único locus para essa família gênica em *G. carapo*. Nesse sentido, a maioria das marcações se concentram na região distal do cromossomo e na espécie do Combú, está na forma interticial, possivelmente derivado de um rearranjo do tipo inversão.

A caracterização das sequências de rDNA 5S na família Gymnotidae vem sendo explorada em recentes trabalhos (Scacchetti et al., 2011; da Silva et al, 2011, 2014a, 2015, 2019; Utsunomia et al., 2014; Almeida et al., 2015; da Silva et al., 2016; Machado et al. 2017, da Silva et al. 2019), onde se observa uma grande variação de número e distribuição dessas sequências, desde um único par até 19 pares. Da Silva et al. (2016) também observaram que as espécies localizadas na base da filogenia possuem a tendência de ter apenas um ou dois pares, como observado em *G. javari* (Utsunomia et al., 2014), *G. coropinae*, *Gymnotus* sp. ‘Negro’ (da Silva et al., 2014), *G. cf. stenoleucus*, *G. cf. pedanopterus* (da Silva, 2015) e *G. coatesi* (Machado et al. 2017) e um aumento no número de pares, observados no clado *carapo*. Ainda assim, no presente estudo foi observado um único par metacêntrico, um número diferente dos encontrados para essa espécie na Bacia Amazônica, que geralmente se apresentam em mais de

um par. Essas sequências também foram associadas à transposons (Claro, 2008; da Silva *et al.*, 2011) e regiões regulatórias (Scacchetti *et al.*, 2012), além de serem marcadores biogeográficos (da Silva *et al.*, 2019, da Silva *et al.*, 2021).

A localização da sonda snRNA U2 na região centromérica de um par metacêntrico é análoga à encontrada por Utsunomia *et al.* (2014) e contribui com a teoria de que cromossomos portadores de snRNA são conservados no gênero *Gymnotus*, sendo um marcador citogenético útil para entender as interações cromossômicas do gênero.

De acordo com os resultados é evidente a presença de sequências teloméricas intersticiais (ITSs), podendo ser classificadas em dois tipos: ITS heterocromático (het-ITS) e ITS curto (s-ITS). Fica evidente que a evolução cromossômica nesta espécie está ocorrendo por rearranjos cromossômicos, como inversões, translocações, fusões e fissões fazendo mudanças na conjuntura do cariótipo.

O par metacêntrico encontrado com pontos intersticiais próximos aos centrômeros sugerem a possibilidade de ser um rearranjo cromossômico do tipo Fusão Robertsoniana (Rb), em que dois cromossomos acrocêntricos sofrem fusão originando um metacêntrico sem perda de sequências teloméricas. Por fim, no par acrocêntrico, há a possibilidade de inversões em ambos os cromossomos.

Os dados citogenéticos disponíveis para o gênero *Gymnotus* reforçam a existência de ampla e interessante variação cariotípica neste grupo. O estudo por meio de citogenética molecular permitiu a obtenção de informações de interesse para a melhor compreensão da estrutura cariotípica e esclarecimentos acerca do processo evolutivo envolvendo esse gênero.

5. CONCLUSÃO

O gênero *Gymnotus* apresenta uma intensa plasticidade cariotípica, apresentando uma característica críptica dentro do conjunto de espécies encontradas na Amazônia Oriental. A presença de sítios teloméricos intersticiais e novos dados para sequências repetitivas de rDNA 18S, rDNA 5S e snRNA U2 demonstram que a espécie *Gymnotus carapo* “Combú” apresenta características cariotípicas diferentes das observadas em outras populações de “*Gymnotus carapo*” reforçando a existência de uma espécies críptica em potencial.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINHO, A. A., THOMAZ, S. M.; GOMES, L. C. Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n.1, p. 70-78. Jul. 2005.
- ALBERT, J.S. ; CAMPOS-DA-PAZ , R. Systematics of Gymnotiformes with diagnoses of 58 clades: A review of available data. **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**, Porto Alegre: EDIPUCRS, p. 419- 446, 1998.
- ALBERT, J. S. ; CRAMPTON, W. Five new species of *Gymnotus* (Teleostei: Gymnotiformes) from an upper amazon floodplain, with descriptions of electric organ discharges and ecology. **Ichthyological Exploration Freshwaters**, Alemanha, v. 12, n. 9, p. 241- 266, out. 2001.
- ALBERT, J. S. Species diversity and phylogenetic systematics of American knifefishes (Gymnotiformes, Teleostei). **Misc. Publ. Mus. Zool.** University of Michigan, n. 190, p. 1- 129, nov. 2001.
- ALBERT, J. S. *et al.* Phylogenetic systematics and historical biogeography of the Neotropical electric fish *Gymnotus* (Teleostei: Gymnotidae). **Systematics and Biodiversity**, v. 2, n. 4, p. 375–417, abr. 2005.
- ALMEIDA, J. S. *et al.* A Unique Sex Chromosome System in the Knifefish *Gymnotus bahianus* with Inferences About Chromosomal Evolution of Gymnotidae. **Journal of Heredity**, v. 106, n. 2, p. 177–183, 16 jan. 2015.
- ALVES-GOMES, J. A.; GUILLERMO O.; HAYGOOD M.; HEILIGENBERG W.; MEYER A. Phylogenetic analysis of the South American electric fish (order Gymnotiformes) and the evolution of their electrogenic system: a synthesis based on morphology, electrophysiology, and mitochondrial sequence data. **Molecular Biology and Evolution**, v. 2, p. 298-318, mar.1995.
- ASAHIDA, T. *et al.* Tissue Preservation and Total DNA Extraction form Fish Stored at Ambient Temperature Using Buffers Containing High Concentration of Urea. **Fisheries**

science, v. 62, n. 5, p. 727–730, jan. 1996.

BRAGA ,G.S.F *et al.* *Gymnotus paraguensis*, a Good Example of Phenotypic Plasticity in the Pantanal Biome, Brazil. **Zebrafish**, v. 18, n. 2, p. 162-173, abr. 2021.

BERTOLLO, L. A. C.; TAKAHASHI, C.S.; MOREIRA-FILHO O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Braz J Genet**, v. 1, p. 103- 120, 1978.

CAMPOS-DA-PAZ, R.; SANTANA, C. D. DE. A New Species of the Electric Knifefish *Gymnotus* Linnaeus (Gymnotiformes: Gymnotidae) from Northeastern Brazil. **Copeia**, v. 107, n. 1, p. 144, 14 mar. 2019.

CAPUTI A. A.; CARLSON B.A.; MACADAR O. Electric organs and their control. **Electroreception**. Springer Handbook of Auditory Research, New York, v. 21, p. 410-452, 2005.

CHARLESWORTH, B.; SNIEGOWSKI, P.; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, v. 371, n. 6494, p. 215–220, set. 1994.

CLARO, Felipe Lourenço. *Gymnotus carapo e Gymnotus sylvius (Teleostei: Gymnotidae)*: Uma abordagem citogenética- Molecular. Dissertação de Mestrado. 2008. Universidade de São Paulo, São Paulo, dez. 2008.

COLGAN, D. J. *et al.* Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. **Australian Journal of Zoology**, v. 46, n. 5, p. 419, 1998.

CRAIG, J. M. *et al.* Revision of Banded Knifefishes of the *Gymnotus carapo* and *G. tigre* clades (Gymnotidae Gymnotiformes) from the Southern Neotropics. **Zootaxa**, v. 4379, n. 1, 13 fev. 2018a.

CRAIG, J. M. *et al.* Revision of *Gymnotus* (Gymnotiformes: Gymnotidae) from the Upper Madeira Basin of Bolivia and Peru, with descriptions of two new species. **Zootaxa**, v. 4413, n. 1, 20 abr. 2018b.

CRAMPTON, W. Gymnotiform fish: an important component of Amazonian floodplain fish communities. **Journal of Fish Biology**, v. 48, n. 2, p. 298–301, fev. 1996.

CRAMPTON, W. G. R. Effects of anoxia on the distribution, respiratory strategies and electric signal diversity of gymnotiform fishes. **Journal of Fish Biology**, v. 53, n. sA, p. 307–330, dez. 1998.

CRAMPTON, W. G. R.; THORSEN, D. H.; ALBERT, J. S. Three New Species from a Diverse, Sympatric Assemblage of the Electric Fish *Gymnotus* (Gymnotiformes: Gymnotidae) in the Lowland Amazon Basin, with Notes on Ecology. **Copeia**, v. 2005, n. 1, p. 82–99, fev. 2005.

CRAMPTON, W. G. R. Evolution of electric signal diversity in gymnotiform fishes. II. signal design. In: LADICH, F. *Et al.*, **Communication in Fishes**. U.S.A.:Science Publishers, 2006. Cap. 23, p. 697–731.

CRAMPTON, W. G. R.; LOVEJOY, N. R.; WADDELL, J. C. Reproductive character displacement and signal ontogeny in a sympatric assemblage of electric fishes. **Evolution**, v. 65, n. 6, p. 1650–1666, 4 mar. 2011.

DAGOSTA, F. C. P.; PINNA, M. DE. Biogeography of Amazonian fishes: deconstructing river basins as biogeographic units. **Neotropical Ichthyology**, v. 15, n. 3, 28 set. 2017.

DAGOSTA, F. C. P.; PINNA, M. C. C. DE. A history of the biogeography of Amazonian fishes. **Neotropical Ichthyology**, v. 16, n. 3, 11 out. 2018.

DAHSE, R.; FIEDLER, W.; ERNSTG. Telomeres and telomerase: biological and clinical importance. **Clinical Chemistry**, v. 43, n. 5, p. 708–714, maio 1997.

DA SILVA *et al.* Physical Mapping of 5S rDNA in Two Species of Knifefishes: *Gymnotus pantanal* and *Gymnotus paraguensis* (Gymnotiformes). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 134, n. 4, p. 303–307, 3 jun. 2011.

DA SILVA, M. *et al.* New Approach Data in Electric Fish (Teleostei: Gymnotus): Sex Chromosome Evolution and Repetitive DNA. **Zebrafish**, v. 11, n. 6, p. 528–535, dez. 2014.

- DA SILVA, M. **Análise biogeográfica do gênero *Gymnotus* (Gymnotiformes, Gymnotidae), por meio de marcadores citogenéticos e moleculares.** 2015. Tese de Doutorado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2015.
- DA SILVA, M. *et al.* Evolutionary Dynamics of 5S rDNA and Recurrent Association of Transposable Elements in Electric Fish of the Family Gymnotidae (Gymnotiformes): The Case of *Gymnotus mamiraua*. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 149, n. 4, p. 297–303, 1 jan. 2016.
- DA SILVA, M. *et al.* Karyotypic Diversity and Evolutionary Trends in Neotropical Electric Fish of the Genus *Gymnotus* (Gymnotiformes: Gymnotidae). **Zebrafish**, v. 16, n. 3, p. 308–320, jun. 2019.
- DA SILVA, M. *et al.* Composition and Nature of Heterochromatin in the Electrical Fish (Knifefishes) *Gymnotus* (Gymnotiformes: Gymnotidae). **IntechOpen**, 14 jul. 2021.
- DE SOUSA *et al.* Cytogenetic and Molecular Data Support the Occurrence of Three *Gymnotus* Species (Gymnotiformes: Gymnotidae) Used as Live Bait in Corumbá, Brazil: Implications for Conservation and Management of Professional Fishing. **Zebrafish**, v. 14, n. 2, p. 177–186, 1 abr. 2017.
- EICKBUSH, T. H.; EICKBUSH, D. G. Finely Orchestrated Movements: Evolution of the Ribosomal RNA Genes. **Genetics**, v. 175, n. 2, p. 477–485, 1 fev. 2007.
- ESTOUP, A. *et al.* (CT)_n and (GT)_n microsatellites: a new class of genetic markers for *Salmo trutta* L. (brown trout). **Heredity**, v. 71, n. 5, p. 488–496, nov. 1993.
- FERNANDES-MATIOLI, F. M. C. **Análises citogenéticas e dos padrões de descargas dos órgãos elétricos (DOEs) no gênero *Gymnotus* (Pisces, Gymnotidae).** Tese de Mestrado. Instituto de Biociências, USP, 1996.
- FERNANDES-MATIOLI, F. M. C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. and TOLEDO-FILHO, S. A. Natural Triploidy in the neotropical species *Gymnotus carapo* (Pisces, Gymnotiformes). **Caryologia**, v.51, p.319-322, 1998.

FERNANDES F. M. C. *et al.* A new *Gymnotus* (Teleostei: Gymnotiformes: Gymnotidae) from the Pantanal Matogrossense of Brazil and adjacent drainages: continued documentation of a cryptic fauna. **Zootaxa**, v. 933, n. 1, p. 1-14, abr. 2005.

FERRARIS JR, C. J.; DE SANTANA, C. D.; VARI, R. P. Checklist of Gymnotiformes (Osteichthyes: Ostariophysi) and catalogue of primary types. **Neotropical Ichthyology**, v. 15, n. 1, 2017.

FONTELES, S. B. A. *et al.* Cytogenetic characterization of the strongly electric Amazonian eel, *Electrophorus electricus* (Teleostei, Gymnotiformes), from the Brazilian rivers Amazon and Araguaia. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 1, p. 227-230, jan. 2008.

FORESTI, F.; DE ALMEIDA TOLEDO, L. F.; DE ALMEIDA TOLEDO, S. Chromosome Studies in *Gymnotus Carapo* and *Gymnotus Sp.* (Pisces, Gymnotidae). **Caryologia**, v. 37, n. 1-2, p. 141–146, jan. 1984.

FRICKE, R., ESCHMEYER, W. N. & FONG, J. D. Eschmeyer's Catalog of Fishes: Genera/species by family/subfamily. **California Academy of Sciences**, nov. 2023.

Disponível em:

<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>.

Acesso em: 4 dez. 2023.

GOLDBLATT, P. **Biological relationships between Africa and South America**. New Haven, Connecticut, EUA: Yale University Press, 1. Ed. 1993. 630 p.

KRAHE, R.; GABBIANI, F. Burst firing in sensory systems. **Nature Review Neuroscience**, v. 5, n. 1, p. 13–23, jan. 2004.

LACERDA M. C. V., & MAISTRO E. L. Cytogenetic analysis of three sympatric *Gymnotus* species (Teleostei: Gymnotidae) from the Fundo Stream, MG, Brazil. **Cytologia**, V. 72, N. 1, P. 89-93, jan. 2007.

LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A. A Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, v. 52, n. 2, p. 201–220. set. 2009.

LEWINSOHN, T.; PRADO, P.I. **Biodiversidade Brasileira: Síntese do estado atual do conhecimento**. v. 1, São Paulo: Contexto, 2002

LOVEJOY, N. R. *et al.* Phylogeny, biogeography, and electric signal evolution of Neotropical knifefishes of the genus *Gymnotus* (Osteichthyes: Gymnotidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 54, n. 1, p. 278–290, jan. 2010.

LOWE-McCONNELL, R. H. **Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais**. v. 03, São Paulo, EdUSP, 1999.

MACHADO, M.A. *et al.* *Gymnotus coatesi* (Gymnotiformes): A Case of Colocation of Multiple Sites of 18S rDNA with Telomeric Sequences. **Zebrafish**, v. 14, n. 5, p. 459-463, jan. 2017.

MARGARIDO, V. P.; BELLAFRONTE, E.; MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetic analysis of three sympatric *Gymnotus* (Gymnotiformes, Gymnotidae) species verifies invasive species in the Upper Paraná River basin, Brazil. **Journal of Fish Biology**, v. 70, p. 155–164, abr. 2007.

MARTINS, C.; GALETTI JR, P. M. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in Leporinus fish (Anostomidae, Characiformes). **Chromosome Research**, v. 7, n. 5, p. 363–367, 1999.

MARTINS C.; CABRAL-DE-MELLO DC, VALENTE G.T.; MAZZUCHELLI, J., OLIVEIRA S.G; PINHAL, D. **Animal genomes under the focus of cytogenetics**. New Hampshire: Nova Science Publisher, 2011. 57 p.

MATERA, A. G.; WEINER, A. M.; SCHMID C. W. Structure and evolution of the U2 small nuclear RNA multigene family in primates: Gene amplification under natural selection? **Molecular and Cellular Biology**, v. 10, n. 11, p. 5876-5882, nov. 1990.

MEEKER A. K. *et al.* Telomere length assessment in human archival tissues. **Am J Pathol**, v. 160, n. 4, p. 1259-67, 2002.

MILHOMEM, S.S.R. *et al.* Chromosomal evidence for a putative cryptic species in the *Gymnotus carapo* species-complex (Gymnotiformes, Gymnotidae). **BMC Genetics**, v. 9, n.

75, nov. 2008.

MILHOMEM, S. S. R. *et al.* *Gymnotus capanema*, a new species of electric knife fish (Gymnotiformes, Gymnotidae) from eastern Amazonia, with comments on an unusual karyotype. **Journal of Fish Biology**, v. 80, n. 4, p. 802–815, fev. 2012a.

MILHOMEM, S. S. R. *et al.* Chromosomal and electric signal diversity in three sympatric electric knifefish species (*Gymnotus*, Gymnotidae) from the Central Amazon Floodplain. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 22, n. 2, p. 485-497, out. 2012b.

MILHOMEM, S. S. R. *et al.* Are NORs always located on homeologous chromosomes? A FISH investigation with rDNA and whole chromosome probes in *Gymnotus* fishes (Gymnotiformes). **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e55608-e55608, fev. 2013.

NAGAMACHI, C.Y. *et al.* Multiple rearrangements in cryptic species of electric knifefish, *Gymnotus carapo* (Gymnotidae, Gymnotiformes) revealed by chromosomepainting. **BMC Genetics**, v. 11, n. 1, p. 2-9, abr. 2010.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 9, p. 2934–2938, 1 maio 1986.

RIBEIRO, A. C. Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. **Neotropical Ichthyology**, v. 4, n. 2, p. 225–246, jun. 2006.

SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J., HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B., ERLICH, H.A. Primer - direct enzymatic amplification of de DNA with thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, n. 4839, p. 487-491, 1988.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, p. 2-5, 2001.

SCACCHETTI, P. C. *et al.* Karyotypic diversity in four species of the genus *Gymnotus*

Linnaeus, 1758 (Teleostei, Gymnotiformes, Gymnotidae): physical mapping of ribosomal genes and telomeric sequences. **Comparative cytogenetics**, v. 5, n. 3, p. 223, 2011.

SILVA, M. *et al.* Physical Mapping of 5S rDNA in Two Species of Knifefishes: *Gymnotus pantanal* and *Gymnotus paraguensis* (Gymnotiformes). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 134, n. 4, p. 303-307, jun. 2011.

SILVA, E. B.; MARGARIDO, V. P. An $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$ multiple sex chromosome system in a new species of the genus *Gymnotus* (Pisces, Gymnotiformes). **Environmental Biology of Fishes**, v. 73, n. 3, p. 293-297, jul. 2005.

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, v. 75, n. 1, p. 304–306, nov. 1972.

TAGLIACOLLO, V. A. *et al.* Model-based total evidence phylogeny of Neotropical electric knifefishes (Teleostei, Gymnotiformes). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 95, p. 20–33, 1 fev. 2016.

USHIZIMA, T.T.; BOCK, C.L. Definição de Características Sexuais Secundárias em *Gymnotus aff. Carapo* (Teleostei, Gymnotidae). Influência da Indução Hormonal como Técnica de Preparação Artificial. In: USHIZIMA, Thiago Tetsuo. **Relatório do Estágio Curricular Supervisionado**. 2000. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Zootecnia) - Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2000.

UTSUNOMIA, R. *et al.* Comparative Chromosome Mapping of U2 snRNA and 5S rRNA Genes in *Gymnotus* Species (Gymnotiformes, Gymnotidae): Evolutionary Dynamics and Sex Chromosome Linkage in *G. pantanal*. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 142, n. 4, p. 286–292, 2014.

UTSUNOMIA, R. *et al.* Particular Chromosomal Distribution of Microsatellites in Five Species of the Genus *Gymnotus* (Teleostei, Gymnotiformes). **Zebrafish**, v. 15, n. 4, p. 398–403, 1 ago. 2018.

VARI, R. P. e. MALABARBA, L. R. Neotropical Ichthyology: An Overview. **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 1998. 603 p.

VON DER EMDE, G., 2013. **Electroreception**. Neurosciences-From Molecule to Behavior:

A University Textbook, 2013. p. 409–425.

YANG, F. *et al.* A comparative study of karyotypes of muntjacs by chromosome painting. **Chromosoma**, v. 103, n. 9, p. 642–652, maio 1995.