

UNIVERSIDADE ESTADUAL “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS -
CAMPUS BAURU DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MICHEL OCTÁVIO FIORENÇO CAPANA

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE *Psalidodon anisitsi*
(Teleostei; Characiformes)**

Trabalho de conclusão de Curso
apresentado à Universidade Estadual
Paulista (UNESP), como parte das
exigências para a obtenção do título de
Bacharel em Ciência Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo
Utsunomia

BAURU

2024

Fiorenço Capana, Michel Octávio.
CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE *Psalidodon*
anisitsi (Teleostei; Characiformes) / Michel
Octávio Fiorenço Capana. - Bauru, 2024 22 f. :
il.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado
Ciências Biológicas)-Universidade Estadual
Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências, Bauru
Orientador: Ricardo Utsunomia

1. Citogenética de peixes. 2. cromossomos. 3.
As51. I. Universidade Estadual Paulista.
Faculdade de Ciências. II. Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricardo Utsunomia

(Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências, Bauru, SP)

Prof. Dr. Rogério Caetano da Costa

(Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências, Bauru, SP)

Dr. Caio Augusto Gomes Goes

(Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências, Bauru, SP)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e aos meus pais, Roberto e Giceli, que me apoiaram sempre, e fizeram o possível e o impossível para me ajudar, sempre presentes e me incentivando. Desde a minha infância, com paciência e amor, me deram todo o suporte e me prepararam para os desafios que eu viria a enfrentar, sempre de cabeça erguida, com a ajuda de Deus e a certeza da vitória. Vocês são meus heróis e quem eu mais admiro e sempre vou ter como exemplo, agradeço imensamente todo o zelo e preocupação. Mãe, eu te amo. Pai, eu te amo. Obrigado.

Agradeço também aos meus amigos, que fizeram cada dia da graduação mais alegre e fácil, obrigado pelas muitas risadas, pelas conversas sobre assuntos interessantes e sobre assuntos bobos. Espero que esse não seja o último capítulo da nossa jornada.

Agradeço a todos os professores, por fazer parte da minha formação com atenção, dedicação e conhecimento. Obrigado a todos vocês pelos ensinamentos e experiências.

Agradeço ao Prof. Dr. Ricardo Utsunomia, meu orientador, que me ajudou e me possibilitou ter conquistas no meio acadêmico o que acaba me incentivando a continuar. Também agradeço ao Prof. Dr. Fabio Porto Foresti, por me aceitar no laboratório e sempre me atender com gentileza e humildade, com um sorriso no rosto. Sei que muito do que os professores fazem acontece nos bastidores, e sou grato por estarem sempre vigiando e cuidando das pessoas e interesses do laboratório.

Agradeço ao Laboratório de Genômica e Conservação de Peixes - LAGENPE pelo apoio e por possibilitar um ambiente agradável e propício ao pensamento científico.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, em especial Natália, Henrique, Zeni e Caio, por me ensinarem muito, participarem ativamente da minha construção de conhecimento sobre genética de peixes e sempre estarem dispostos a ajudar, com determinação e alegria. Sem eles esse trabalho não seria possível, obrigado.

Agradeço também aos órgãos de fomento, Cnpq, Fapesp e CAPES, pela confiança e auxílio.

A Universidade “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, pela formação e experiências incríveis, acredito que o futuro dessa universidade será brilhante, com potencial para se tornar uma universidade que colecionará séculos, títulos e prestígio. Trabalharei para que melhore a cada dia.

SUMÁRIO

Resumo.....	5
1. Introdução.....	7
2. Objetivo.....	9
3. Materiais e métodos.....	10
3.1 Coleta.....	10
3.2 Obtenção de cromossomos metafásicos.....	11
3.3 Coloração convencional com Giemsa e bandeamento-C.....	11
3.4 Hibridação fluorescente in situ (FISH).....	11
4. Resultados.....	12
4.1 Coloração com Giemsa e montagem de cariótipos.....	12
4.2 Bandeamento C.....	13
4.3 Hibridação fluorescente in situ com sondas de As51.....	14
5. Discussão.....	15
6. Considerações finais.....	16
7. Referências.....	17

RESUMO

Os peixes do gênero *Psalidodon* são organismos modelos para estudos citogenéticos e citogenômicos devido a características interessantes como grande diversidade cariotípica, padrões distintos de dispersão de DNA repetitivo e presença de cromossomos supranumerários (B), sendo integrantes da ordem dos Characiformes, extremamente diversa com famílias distribuídas na África e América. Sendo amplamente irrigada com componentes hidrográficos e com elementos de relevo que permitem uma variedade de ambientes com grandes rios e muitos pequenos afluentes, a geografia da região Neotropical oferece o cenário ideal para estudar a evolução e diversificação de linhagens de peixes. Neste trabalho, a caracterização cariotípica de uma população até então não estudada de *Psalidodon anisitsi* habitando o córrego das cascatas (tributário do rio Tietê) do município de Botucatu foi realizada, bem como a sua fórmula cariotípica identificada. Além disso, as regiões com aglomerados de heterocromatina constitutiva foram determinadas, e a hibridação *in situ* fluorescente da família de DNA satélite As51 forneceu a localização cromossômica de clusters dessa sequência repetitiva. Por fim, foram feitas comparações com outros estudos realizados com diferentes populações dessa espécie e espécies próximas. Os resultados obtidos indicaram um número diploide $2n=50$, ausência de cromossomos B e fórmula cariotípica $(2M+14SM+18ST+16A)$ tanto em machos quanto em fêmeas. O bandeamento C revelou regiões de heterocromatina constitutiva na região dos centrômeros dos cromossomos e em regiões subteloméricas dos braços longos de grandes cromossomos acrocêntricos. A técnica de FISH permitiu evidenciar nos machos e nas fêmeas estudadas, fortes marcações subteloméricas no braço longo de grandes cromossomos acrocêntricos. Todavia, nos machos alguns cromossomos apresentaram marcações biteloméricas, ou seja, nos subtelômeros dos braços longos e curtos, o que não ocorreu nas fêmeas.

Palavras-chave: Citogenética de peixes, cromossomos, As51

ABSTRACT

Fish of the genus *Psalidodon* are model organisms for cytogenetic and cytogenomic studies due to interesting characteristics such as great karyotypic diversity, distinct patterns of repetitive DNA dispersion and presence of supernumerary chromosomes (B), members of the order Characiformes, extremely diverse with families distributed in Africa and America. Widely irrigated with hydrographic components and with topographic elements that allow a variety of environments with large rivers and many small tributaries, the geography of the neotropical region is an open-air laboratory for the evolution and diversification of fish lineages. In this characterization work, it was possible to obtain the diploid number for a hitherto unstudied population of *Psalidodon anisitsi* inhabiting the cascadas stream from the municipality of Botucatu, as well as its karyotypic formula. In addition, regions with clusters of constitutive heterochromatin were found. Fluorescent in situ hybridization of the As51 satellite DNA family was performed, providing the chromosomal location of clusters of this repetitive sequence. Finally, comparisons were made with other studies carried out with different populations of this species and related species. The results obtained indicated diploid number $2n = 50$, absence of B chromosomes and karyotypic formula $(2M+14SM+18ST+16A)$ in both male and female. C banding revealed regions of constitutive heterochromatin in the region of chromosomal centromeres and in the subtelomeric regions of the long arms of large acrocentric chromosomes. The FISH technique made it possible to highlight, in the males and females studied, strong subtelomeric marks on the long arm of large acrocentric chromosomes. However, in males, some chromosomes showed marks in the subtelomeres of the long as well in short arms, which did not occur in females.

Keywords: Fish cytogenetics, chromosomes, As51.

1. INTRODUÇÃO

Reconstruir a história evolutiva de grupos biológicos está entre os maiores desafios enfrentados pela biologia atualmente. Dentre os vertebrados, os ‘peixes’ se apresentam como os mais diversificados, com os Actinopterygii contando com aproximadamente 32.000 espécies, o que representa mais da metade das espécies de vertebrados conhecidas hoje. Constituindo, dessa forma, o maior componente em espécies de vertebrados vivendo em ambientes aquáticos (Guinot; Cavin, 2016). A região Neotropical, por sua vez, abriga mais de seis mil espécies formalmente descritas, sendo a mais diversa do planeta. Um dos fatores contribuintes para tal biodiversidade é a biogeografia dos neotrópicos que permite uma heterogeneidade de ambientes, com a presença de grandes rios e milhares de pequenos afluentes, fazendo da região Neotropical um excelente local de estudo para a evolução e diversificação de linhagens de peixes (Dagosta; de Pinna, 2017, 2019; Albert *et al.*, 2018, 2020; Pelicice *et al.*, 2021).

A ordem dos Characiformes é uma das maiores e mais diversas ordens de peixes dulcícolas, estando distribuídos pela África e as Américas, com 90% de suas espécies concentradas na região Neotropical. Este grupo inclui espécies de importância comercial e utilizadas na alimentação como os ‘dourados’ (gênero *Salminus*), espécies de aquarismo como os conhecidos tetras (gênero *Psalidodon*), bem como predadores vorazes como a ‘traíra’ (gênero *Hoplias*) e as piranhas (subfamília *Serrasalminae*), além de detritívoros a exemplo dos prochilodontídeos (família *Prochilodontidae*). Os Characiformes podem atingir grandes tamanhos corporais como observado no gênero *Hydrocynus*, encontrado na África, e o tambaqui (gênero *Colossoma*). Em contrapartida, existem muitas espécies pequenas, muitas não excedendo os 26 mm (Toledo-Pizza *et al.*, 2024).

A classificação das famílias de Characiformes ficou estável até a primeira década do Século XXI, embora incertezas sobre as relações filogenéticas fossem reconhecidas há muito tempo (Reis *et al.*, 2003; Buckup *et al.*, 2007), majoritariamente se referindo à família Characidae, que representa mais de 50% das espécies em Characiformes. Doravante, muitos estudos utilizando análises morfológicas, citogenéticas e moleculares foram e estão sendo conduzidos para avaliar as relações filogenéticas na família Characidae (Mirande, 2019, Terán *et al.*, 2020, Souza *et al.*, 2022).

A família Characidae é a família de peixes Neotropicais mais diversa, segundo Eschmeyer e Fong (2017), com mais de 1.150 espécies, das quais 231 foram descritas nos

dez anos antecedentes à publicação de seu trabalho, o que sugere muitas outras a serem ainda catalogadas. Representa a quarta maior família em número de espécies nos Actinopterygii, apresentando uma enorme irradiação adaptativa. A maioria dos membros dessa família são peixes de pequeno porte, chegando até 8 cm de comprimento e muitas espécies são consideradas ornamentais, sob o nome popular de “tetras”. (Mirande, 2019).

Considerado um dos grupos mais ricos dentro de Characidae, o gênero *Astyanax* Baird & Girard (1854), tinha até recentemente, em torno de 170 espécies válidas, distribuídas do sul dos Estados Unidos até a Argentina central, com grande representação em sistemas hidrográficos brasileiros (Fricke *et al.*, 2020). Em 2020, Terán *et al.* (2020) realizaram uma revisão que combinou dados morfológicos e moleculares e, com base nestes dados, dois novos gêneros (*Andromakhe* Terán; Benitez; Mirande, 2020; *Makunaima* Terán; Benitez; Mirande, 2020) foram criados, o gênero *Psalidodon* foi restabelecido e várias espécies de *Astyanax* foram agrupadas em oito outros gêneros (veja Terán *et al.*, 2020 e Gavazzoni *et al.*, 2023)

Uma espécie em particular, o tetra Buenos Aires (*Psalidodon anisitsi*) possui grande distribuição nas bacias dos rios Paraná e Uruguai (Froese, R.; Pauly, D., 2023). Anteriormente era considerado como pertencente ao gênero *Astyanax* e depois *Hyphessobrycon*. Finalmente, a espécie foi realocada para o gênero *Psalidodon*, assim como *P. paranae*, *P. bockmanni* e *P. fasciatus*, dentre outras (Terán *et al.*, 2020). Dados citogenéticos para *Psalidodon* e *Astyanax* indicam que a maioria das espécies possuem o número diploide $2n = 50$, embora possuam grande diversidade cariotípica, com algumas características cromossômicas exclusivas em algumas espécies e populações, como a presença de polimorfismos de heterocromatina e padrões distintos de dispersão de DNA repetitivo (Mantovani *et al.*, 2000; Almeida-Toledo *et al.*, 2002; Kantek *et al.*, 2009; Hashimoto; Porto-Foresti 2010; Hashimoto *et al.*, 2011; Utsunomia *et al.*, 2017; Goes *et al.*, 2020). Essa grande quantidade de polimorfismos genéticos, combinado com espécies crípticas resultam em “complexos de espécies” (Goes *et al.*, 2020). Mais recentemente, uma nova revisão taxonômica de Characidae propôs a mudança do gênero *Psalidodon* para a família Acestrorhamphidae (Melo *et al.*, 2024)

Estudos citogenéticos permitiram a identificação de complexos de espécies em distintos grupos de peixes (Moreira-Filho; Bertollo, 1991; Pazza *et al.*, 2006; Cioffi *et al.*, 2018; Gavazzoni *et al.*, 2018; Nirchio *et al.*, 2018). A combinação de técnicas moleculares com análises cromossômicas e morfológicas a fim de caracterizar a biodiversidade e

estrutura genética de populações de peixes ainda é relativamente rara, mas contribuiu de maneira significativa para a taxonomia e sistemática desses organismos (Kavalco *et al.*, 2016; Pazza *et al.*, 2018; Gavazzoni *et al.*, 2023).

Desse modo, peixes oferecem boas oportunidades para estudos genéticos e taxonômicos, visto que estudos citogenéticos vêm sendo conduzidos com peixes desde a década de 1970, utilizando majoritariamente técnicas citogenéticas clássicas para descrição cariotípica (Yano *et al.* 2017). Estudos citogenéticos nesse molde são fundamentais para a melhor compreensão da história e dos processos evolutivos em Characidae, visto que características cromossômicas nas populações revelam processos de divergência críptica e especiação, assim como casos raros de hibridização e diferenciação de cromossomos sexuais. Recentemente, novas técnicas citogenéticas e moleculares vêm sendo empregadas no estudo dos cromossomos de peixes, como é o caso da hibridação fluorescente *in situ* (FISH). Essa técnica permite integrar as informações moleculares presentes em sequências de DNA com suas respectivas localizações físicas nos cromossomos, facilitando, assim, a caracterização e montagem de genomas, além do mais, múltiplos dados sobre relações evolutivas foram elucidados por FISH (Yano *et al.* 2017; Liehr, 2021). Técnicas citogenéticas, moleculares e de análises morfológicas contribuem significativamente para a taxonomia e sistemática desses organismos, bem como caracterizar e entender a biodiversidade e estrutura genética de populações, tal qual a biodiversidade geral em peixes (Moreira-Filho; Bertollo, 1991; de Bello Cioffi *et al.*, 2018; Gavazzoni *et al.*, 2018; Gavazzoni *et al.*, 2023). Dados citogenéticos para *P. anisitsi* já existem, todavia, há divergências na descrição cariotípica dessa espécie em populações distintas. Diante disso, o objetivo desse estudo é realizar uma caracterização citogenética de uma população de *Psalidodon anisitsi* do córrego das cascatas (um tributário do Rio Tietê) no município de Botucatu, São Paulo, uma localidade não estudada previamente e comparar com estudos anteriores realizados com peixes de outras localidades.

2. OBJETIVOS

Realizar a caracterização citogenética de uma população de *Psalidodon anisitsi* coletados no Córrego das Cascatas, no município de Botucatu. Obter o número diploide e comparar os cariótipos de macho e fêmea.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta

Para este estudo, os espécimes de *Psalidodon anisitsi* foram coletados no Córrego das Cascatas (um tributário do Rio Tietê) integrante da Bacia do Alto Paraná, nas coordenadas 22°54'04"S 48°27'44"O, no município de Botucatu, Estado de São Paulo. Todos os procedimentos de amostragem, manutenção e análise dos animais foram realizados de acordo com as regras internacionais em experimentação animal seguidas pela Universidade Estadual Paulista.

Todos os exemplares foram coletados utilizando covos e armazenados imediatamente em tambores com oxigenação. Posteriormente, foram transportados ao Laboratório de Genômica e Conservação de Peixes, localizado no Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências, UNESP-Bauru, onde foram transferidos para aquários aerados e mantidos até o início dos experimentos.

3.2 Obtenção de cromossomos metafásicos

As suspensões celulares contendo cromossomos metafásicos mitóticos foram obtidas a partir de células renais conforme o protocolo proposto em Foresti *et al.* (1981). Tal técnica consiste na inibição da polimerização dos microtúbulos durante a divisão celular através da ação da colchicina, o que inexoravelmente impede que as células em mitose entrem na fase de anáfase, estacionando-se em metáfase, a fase da divisão celular em que os cromossomos estão mais condensados. Após a injeção na região intra-abdominal de colchicina em concentração 0,025% na proporção de 1 ml/100 g de peso do animal, o indivíduo é deixado em aquário aerado por 50 minutos e, em seguida, sacrificado por excesso de anestésico benzocaína. Então, o rim anterior é retirado e transferido para uma placa de Petri contendo 7mL de solução hipotônica (KCl 0,075M). O material foi dissociado com auxílio de pinças e pipeta Pasteur e depois, transferido para um tubo de centrífuga. A solução foi mantida a 37°C por 21 minutos e retirada da estufa para o acréscimo de 7 gotas de fixador Carnoy gelado (metanol e ácido acético na proporção 3:1). A mistura foi agitada levemente com a ajuda de uma pipeta Pasteur e ficará em repouso por 5 min em temperatura ambiente. 6 ml de fixador são adicionados novamente e após agitação a mistura é levada à centrifuga (900 ± 100 rpm) por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e o precipitado ressuspensionado em 7 ml de fixador e centrifugado novamente por 7 min a 900 ± 100 rpm por mais três vezes para uma completa

fixação e lavagem das células em suspensão. Enfim, o material final foi diluído em aproximadamente 300µL de fixador e armazenado em tubos de 1,5mL. Durante a etapa de sacrifício dos animais, cada indivíduo terá o seu sexo identificado por inspeção gonadal em microscópio óptico e fragmentos de tecido muscular fixados em etanol 100% para análises moleculares posteriores.

3.3 Coloração convencional com Giemsa e bandeamento-C

Após a obtenção de suspensões celulares contendo cromossomos metafásicos mitóticos, a solução foi gotejada em lâminas previamente limpas e secas. Após a secagem em temperatura ambiente, as lâminas foram coradas com solução de Giemsa a 5% em tampão fosfato (pH 6,7) por 10 minutos para posterior observação em microscópio óptico e fotografadas, com base nas imagens obtidas, os números diploides foram obtidos e os cariótipos, montados, classificando a morfologia dos cromossomos com base na razão entre os tamanhos dos braços curtos e longos e na posição centromérica de acordo com o padrão estabelecido por Levan *et al.*, (1964).

Além disso, a localização da heterocromatina constitutiva foi realizada pelo protocolo descrito em Sumner (1972). Esta técnica consiste basicamente em: 1. hidrolisar as lâminas por 30 minutos em HCl 0,2N à temperatura ambiente e lavar em água destilada; 2. passar por uma solução de Ba(OH)₂ por cerca de 40 segundos e lavar em água destilada; 3. lavar em HCl 1N a 60°C e, em seguida, em água destilada; 4. incubar por 20 minutos em 2xSSC (pH = 6,8) a 60°C; 5. corar por aproximadamente 30 minutos com solução de Giemsa a 5% em tampão fosfato (pH = 6,7).

3.4 Hibridação fluorescente *in situ* (FISH)

A técnica de FISH foi realizada de acordo como protocolo de Pinkel *et al.* (1986) com algumas modificações implementadas no Laboratório de Genômica e Conservação de Peixes (LAGENPE). Com o intuito de marcar as localizações dos satélites As51, as sondas foram marcadas utilizando digoxigenina-11 dUTP para a detecção dos sinais, enquanto os cromossomos foram contra-corados com DAPI. Foram selecionados 2 machos e 2 fêmeas para realizar a FISH, com base na qualidade das preparações.

4. RESULTADOS

4.1 Coloração com Giemsa e montagem de cariótipos

Todos os indivíduos estudados apresentaram um número diploide $2n = 50$ cromossomos, contendo 25 pares. Não foram encontradas evidências de cromossomos supranumerários em nenhuma das metáfases analisadas. A classificação com base na morfologia dos cromossomos evidenciou a presença de um par de grandes cromossomos metacêntricos, quatorze cromossomos submetacêntricos, dezoito cromossomos subtelocêntricos e dezesseis cromossomos acrocêntricos de tamanhos variados, caracterizando uma fórmula cariotípica (2M+14SM+18ST+16A). Esse resultado diverge das fórmulas cariotípicas encontradas nos trabalhos de Centofante *et al.* (2003) e Goes *et al.* (2020), 6M+16M+12ST+16A e 10M+2SM+20ST+18A, respectivamente.

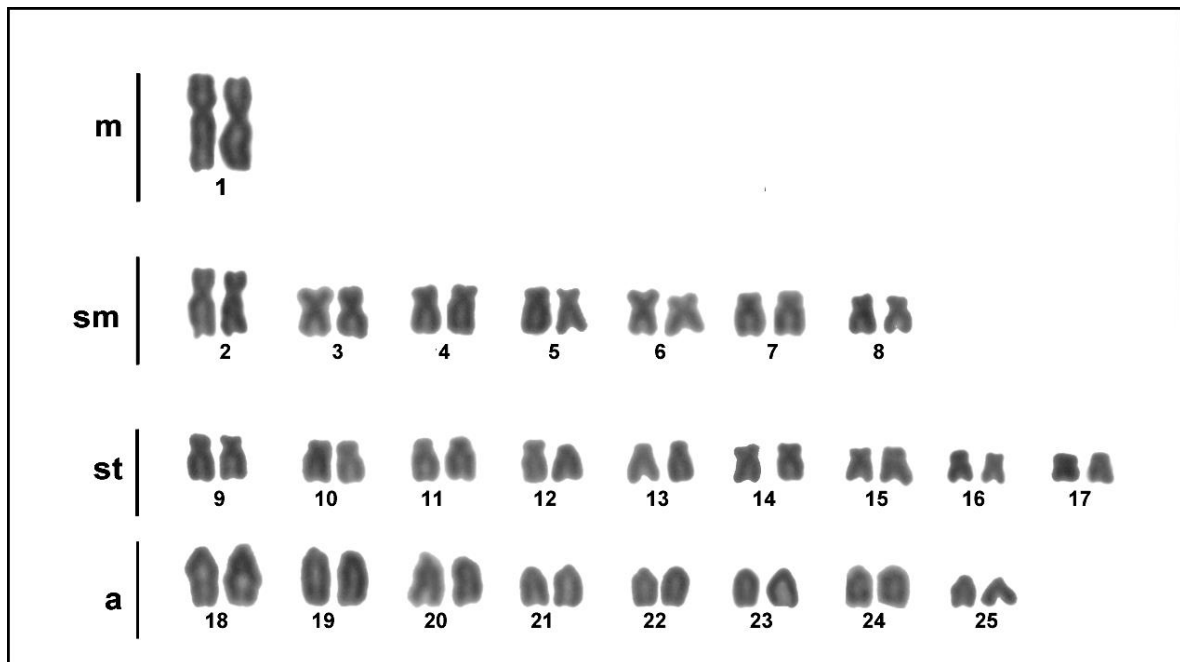


Figura 1: Cariótipo com coloração convencional em giemsa de uma fêmea de *Psalidodon anisitsi*.

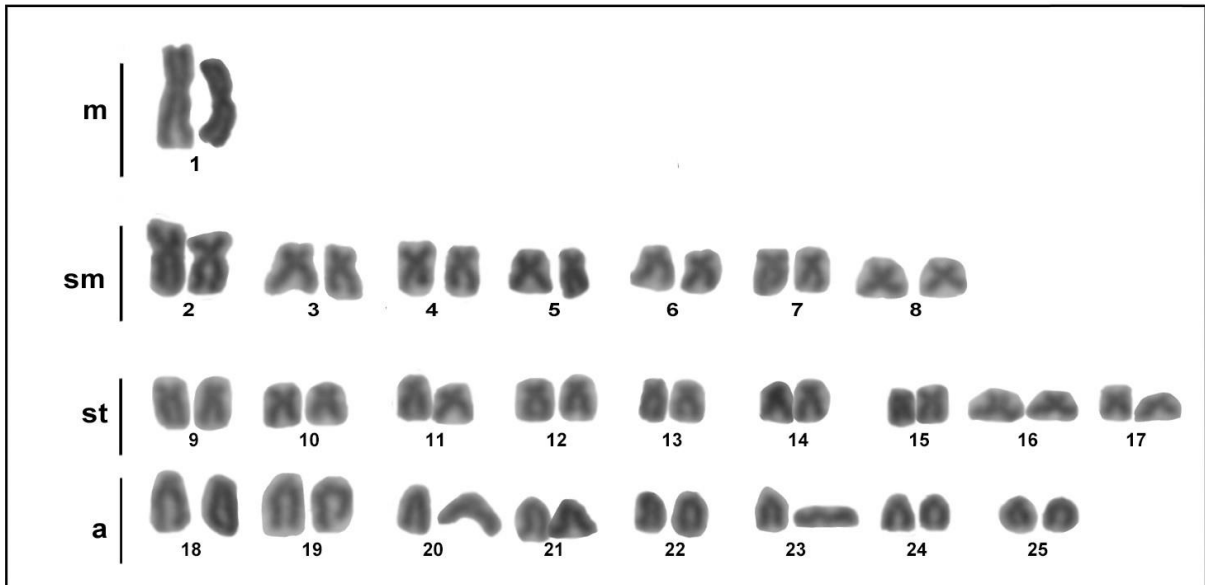


Figura 2: Cariótipo com coloração convencional em giemsa de um macho de *Psalidodon anisitsi*.

4.2 Bandejamento C

A técnica de bandejamento-C permite evidenciar regiões de heterocromatina constitutiva, basicamente danificando o cromossomo com uma base forte, as regiões mais condensadas sofrem menos dano, aparecendo mais escuras nas imagens de microscopia ótica. Regiões de heterocromatina constitutiva foram encontradas nos centrômeros dos cromossomos e em regiões subteloméricas dos braços longos de cromossomos acrocêntricos.

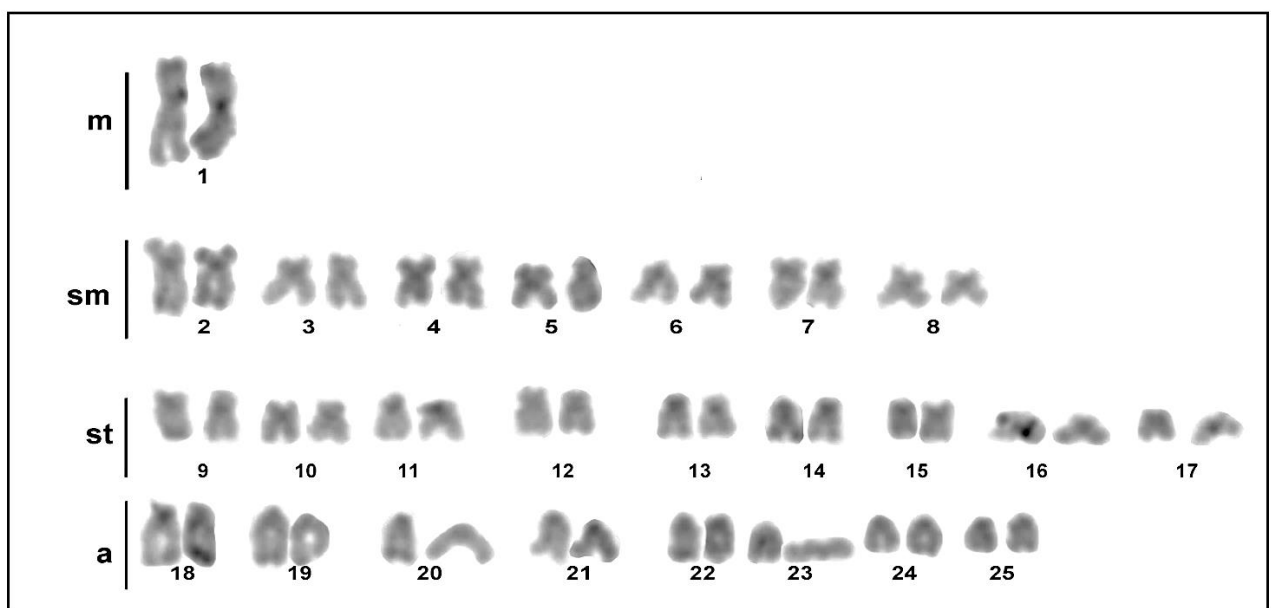


Figura 3: Cariótipo de um macho de *Psalidodon anisitsi* após bandejamento C

4.3 Hibridação fluorescente *in situ* com sondas de As51

A técnica de FISH permite observar em quais cromossomos estão localizadas as porções do genoma que correspondem à sonda utilizada. No caso, foram utilizadas sondas para marcação de regiões contendo o DNA satélite As51. Tanto nos machos quanto nas fêmeas estudadas, fortes marcações subtelo méricas no braço longo de grandes cromossomos acrocêntricos estão presentes. Todavia, nos machos alguns cromossomos apresentaram marcações bitelo méricas, ou seja, nos subtelo meros dos braços longos e curtos (destacados pelas setas brancas na [figura 6 A](#)), o que não ocorreu nas fêmeas.

A moda em número de marcações por metáfase machos variou entre 18 e 19, com um dos machos estudados, apresentando bastante variação por metáfase analisada e o outro indivíduo macho acabou sendo mais estável, oscilando entre 18 e 19 marcações. O número de marcações nas fêmeas flutuou entre 12 e 14.

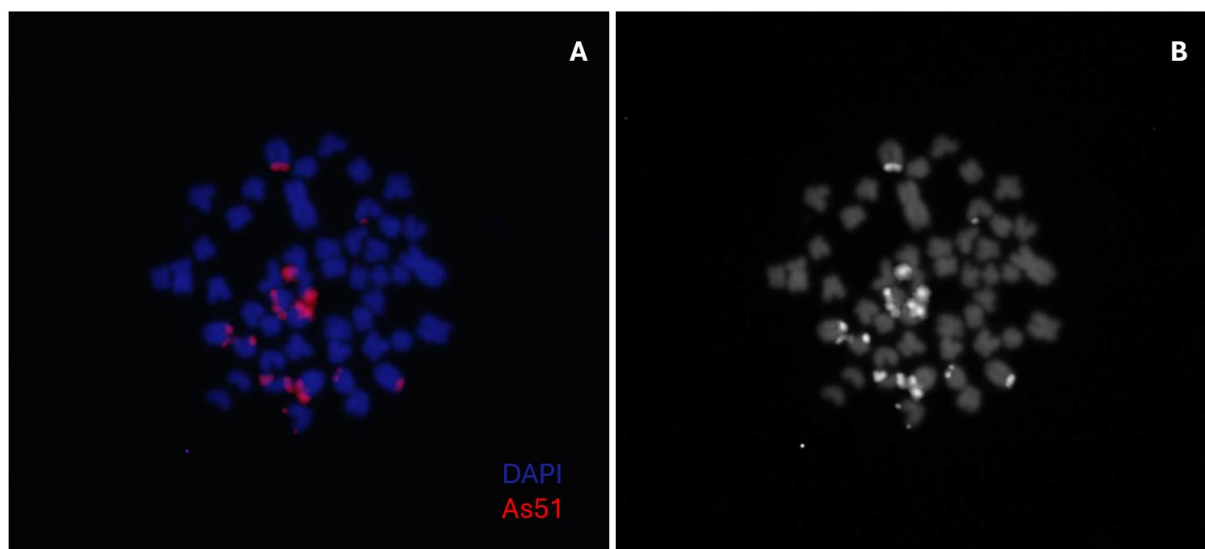


Figura 4: Fêmea (A) Metáfase de FISH com as marcações do satélite As51 em vermelho e cromossomos em azul. **(B)** Mesma metáfase que em A, mas com faixa de cores diferente para facilitar visualização.

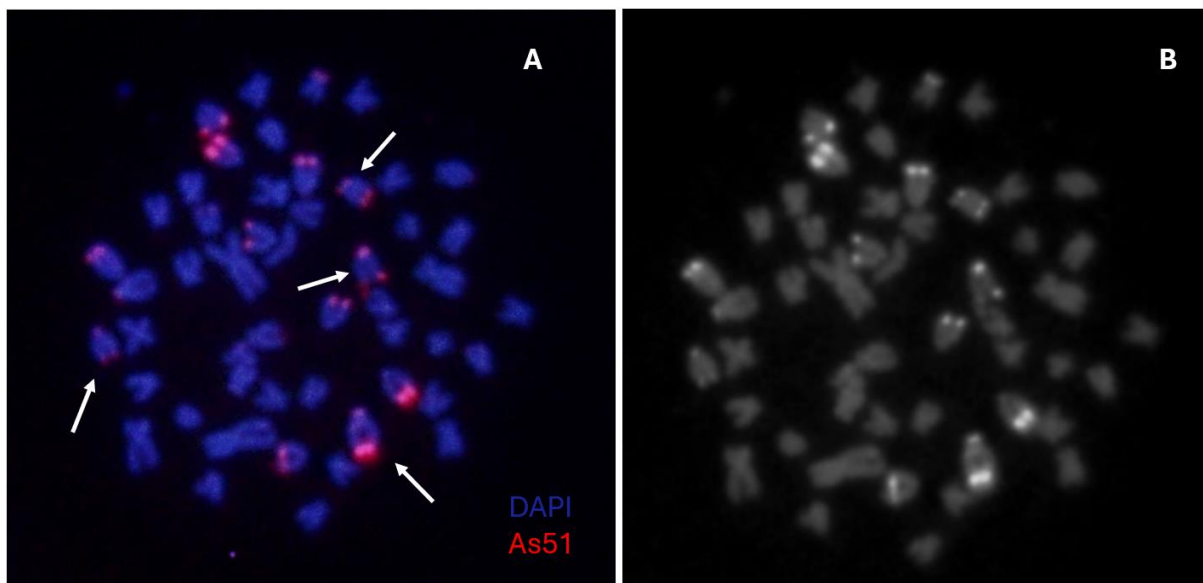


Figura 5: Macho (A) Metáfase de FISH com as marcações do satélite As51 em vermelho e cromossomos em azul. **(B)** Mesma metáfase que em A, mas com faixa de cores diferente para facilitar visualização.

5. DISCUSSÃO

A fórmula cariotípica observada aqui (2M+14SM+18ST+16A) diverge das fórmulas cariotípicas encontradas nos trabalhos de Centofante *et al.* (2003) e Goes *et al.* (2020). Uma hipótese para essas diferenças observadas nas fórmulas cariotípica seria a ocorrência de alterações cromossômicas estruturais, como deleções e inversões pericêntricas, que ocorreram de forma independente em cada uma das populações, como resultado da diferenciação alopátrica.

O número diploide $2n = 50$, bem como o par de cromossomos metacêntricos grandes é típico dos peixes desse grupo, se apresentando em *P. scabripinnis*, *P. altiparanae*, *P. bockmanni*, *P. paranae* e muitos outros, (Vicari *et al.*, 2008; Abellini *et al.*, 2014, Daniel *et al.*, 2015, Hashimoto, *et al.*, 2008). Autores como Sánchez-Romero *et al.* (2015) e Melo *et al.* (2024) sugerem que essa característica é uma sinapomorfia de Acestrorhamphidae. Todavia, todas essas espécies mencionadas anteriormente possuem registros de ocorrência de cromossomos supranumerários (cromossomos B), o que não acontece com *P. anisitsi*, com nenhuma evidência de cromossomos B encontrada nessa espécie até agora.

As marcações de As51 comumente formam grandes aglomerados nas regiões subteloméricas nos braços longos nos grandes cromossomos acrocêntricos o que também

é observado em *P. bockmanni*, *P. paranae*, *P. fasciatus* e *P. scrabipinnis* (Abel *et al.*, 2006; Goes *et al.*, 2022). Classicamente, clusters de As51 são encontrados em regiões de heterocromatina constitutiva, o que pode ser observado ao parear uma metáfase de banda C com uma metáfase hibridizada com As51 (Figura 7). Visto que a heterocromatina constitutiva está presente nas regiões subteloméricas de cromossomos acrocêntricos.

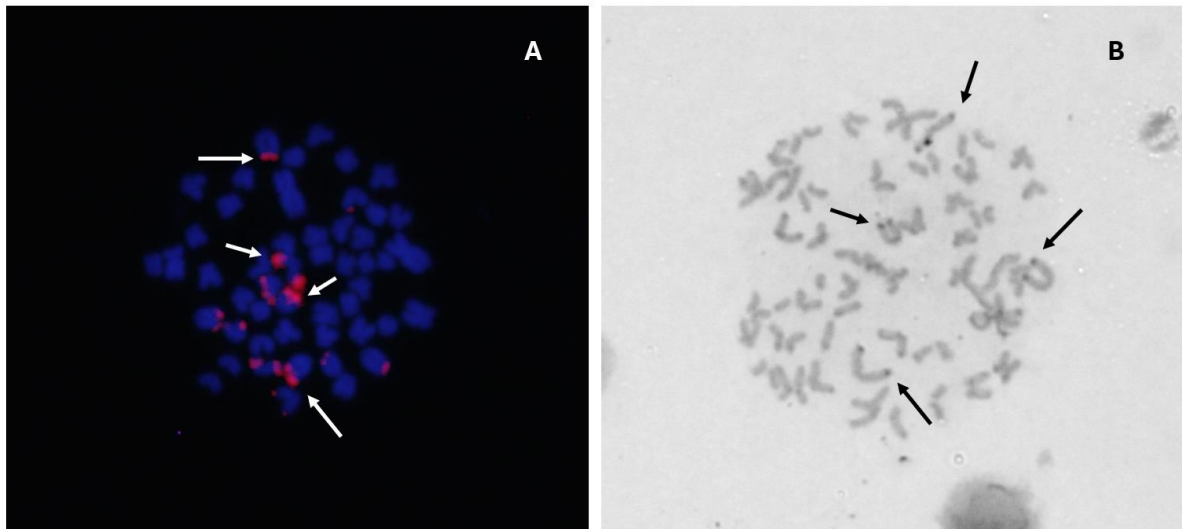


Figura 6: (A) Metáfase de FISH com as marcações do satélite As51 em vermelho e cromossomos em azul. (B) Metáfase de banda C evidenciando regiões com heterocromatina constitutiva (pontos escuros indicados pelas setas)

As marcações de As51 encontradas em outros *locus* despertam curiosidade, possivelmente podem estar associadas com sequências de DNA ribossômico como 45S e 18S, tais hipóteses podem ser comprovadas a partir de análises bioinformáticas e da hibridação fluorescente in situ regiões de 45S e 18S.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo de caracterização cariotípica é um aspecto básico para preparar estudos mais complexos envolvendo aspectos citogenômicos e moleculares. Os pontos principais desse trabalho incluem a confirmação do número diploide $2n = 50$ nessa população de *Psilidodon anisitsi* o que indica que essa espécie não possui alterações no número diploide em diferentes populações. Apesar dos números diploides conservados entre populações analisadas previamente desta espécie, foi possível notar diferenças significativas nas fórmulas cariotípicas dessas amostras. Também não foram encontrados cromossomos supranumerários (B), diferentemente de várias espécies do mesmo gênero. Regiões de heterocromatina constitutiva e do satélite As51 se sobrepõem, todavia existem

marcações desse satélite que não estão localizadas em regiões subteloméricas dos braços longos em grandes cromossomos acrocêntricos, principalmente nos machos analisados.

7. REFERÊNCIAS

ABELINI, Edner; MARTINS-SANTOS, Isabel Cristina; FERNANDES, Carlos Alexandre. Cytogenetic analysis in three species from genus *Astyanax* (Pisces; Characiformes) with a new occurrence of B chromosome in *Astyanax paranae*. **Caryologia**, v. 67, n. 2, p. 160-171, 2014.

ABEL, Luciano Douglas dos Santos; MANTOVANI, Monique; MOREIRA-FILHO, Orlando. Chromosomal distribution of the As51 satellite DNA in two species complexes of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 448-452, 2006.

ALBERT, James S.; TAGLIACOLLO, Victor A.; DAGOSTA, Fernando. Diversification of Neotropical freshwater fishes. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 51, n. 1, p. 27-53, 2020.

ALBERT, James S.; VAL, Pedro; HOORN, Carina. The changing course of the Amazon River in the Neogene: center stage for Neotropical diversification. **Neotropical Ichthyology**, v. 16, n. 03, p. e180033, 2018.

ALMEIDA-TOLEDO, Lurdes Foresti de *et al.* Conservation of the 5S-bearing chromosome pair and co-localization with major rDNA clusters in five species of *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 97, n. 3-4, p. 229-233, 2002.

BUCKUP, Paulo Andreas; MENEZES, Naércio Aquino; GHAZZI, Miriam Sant'Anna. **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2007.

CENTOFANTE, Liano *et al.* Chromosomal differentiation among allopatric populations of *Hyphessobrycon anisitsi* (Pisces, Tetraodonidae). **Cytologia**, v. 68, n. 3, p. 283-288, 2003.

DAGOSTA, Fernando CP; PINNA, Mário de. Biogeography of Amazonian fishes: deconstructing river basins as biogeographic units. **Neotropical Ichthyology**, v. 15, n. 3, p. e170034, 2017.

DAGOSTA, Fernando CP; DE PINNA, Mário. The fishes of the Amazon: distribution and biogeographical patterns, with a comprehensive list of

species. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 2019, n. 431, p. 1-163, 2019.

DANIEL, Sandro Natal *et al.* New insights into karyotypic relationships among populations of *Astyanax bockmanni* (Teleostei, Characiformes) of different watersheds. **Zebrafish**, v. 12, n. 2, p. 181-188, 2015.

DE BELLO CIOFFI, Marcelo *et al.* Conventional cytogenetic approaches—useful and indispensable tools in discovering fish biodiversity. **Current Genetic Medicine Reports**, v. 6, p. 176-186, 2018.

ESCHMEYER, W. N.; FONG, J. **Species by Family/Subfamily in the Catalog of Fishes**, Electronic Version (18 February 2020). California Academy of Sciences, San Francisco, 2020.

FROESE, R.; PAULY, D. Editores. **FishBase**. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, (02/2023), 2023. Disponível em: <https://www.fishbase.se/summary/Psalidodon-anisitsi.html>. Acesso em: 01 de jul. 2023.

GAVAZZONI, Mariane *et al.* Morphologically cryptic species of the *Astyanax bimaculatus* “caudal peduncle spot” subgroup diagnosed through cytogenetic characters. **Zebrafish**, v. 15, n. 4, p. 382-388, 2018.

GAVAZZONI, Mariane *et al.* Species delimitation in *Psalidodon fasciatus* (Cuvier, 1819) complex (Teleostei: Characidae) from three hydrographic basins. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 138, n. 1, p. 51-67, 2023.

GOES, C. A. G. *et al.* Cytogenetic markers as a tool for characterization of hybrids of *Astyanax* Baird & Girard, 1854 and *Hyphessobrycon* Eigenmann, 1907. **Comparative Cytogenetics**, v. 14, n. 2, p. 231, 2020.

GOES, Caio Augusto Gomes *et al.* Revealing the satellite DNA history in *Psalidodon* and *Astyanax* characid fish by comparative satellitomics. **Frontiers in Genetics**, v. 13, p. 884072, 2022.

GUINOT, Guillaume; CAVIN, Lionel. ‘Fish’(Actinopterygii and Elasmobranchii) diversification patterns through deep time. **Biological Reviews**, v. 91, n. 4, p. 950-981, 2016.

HASHIMOTO, Diogo Teruo *et al.* First report of a B chromosome in a natural population of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 275-278, 2008.

HASHIMOTO, Diogo Teruo; PORTO-FORESTI, Fábio. Chromosome polymorphism of heterochromatin and nucleolar regions in two populations of the fish *Astyanax bockmanni* (Teleostei: Characiformes). **Neotropical Ichthyology**, v. 8, p. 861-866, 2010.

HASHIMOTO, D. T. *et al.* Chromosome mapping of H1 histone and 5S rRNA gene clusters in three species of *Astyanax* (Teleostei, Characiformes). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 134, n. 1, p. 64-71, 2011.

KANTEK, D. L. Z. *et al.* Chromosomal location and distribution of As51 satellite DNA in five species of the genus *Astyanax* (Teleostei, Characidae, Incertae sedis). **Journal of Fish Biology**, v. 75, n. 2, p. 408-421, 2009.

KAVALCO, Karine Frehner *et al.* Chromosomal diversification higher than molecular variation in *Astyanax aff. fasciatus* (Teleostei, Characidae). **Zebrafish**, v. 13, n. 4, p. 345-353, 2016.

LIEHR, T. Molecular cytogenetics in the era of chromosomics and cytogenomic approaches. **Front Genet** 12: 720507. 2021.

MANTOVANI, Monique *et al.* Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. **Genetica**, v. 109, p. 161-168, 2000.

MELO, Bruno F. *et al.* Phylogenomics of Characidae, a hyper-diverse Neotropical freshwater fish lineage, with a phylogenetic classification including four families (Teleostei: Characiformes). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 202, n. 1, p. zlae101, 2024.

MIRANDE, Juan Marcos. Morphology, molecules and the phylogeny of Characidae (Teleostei, Characiformes). **Cladistics**, v. 35, n. 3, p. 282-300, 2019.

MOREIRA-FILHO, Orlando; BERTOLLO, Luiz Antônio Carlos. *Astyanax scabripinnis* (Pisces; Characidae): a "species complex". **Brazil J. Genet.**, v. 14, p. 331-357, 1991.

PAZZA, Rubens; DERGAM, Jorge A.; KAVALCO, Karine F. Trends in karyotype evolution in *Astyanax* (Teleostei, Characiformes, Characidae): insights from molecular data. **Frontiers in Genetics**, v. 9, p. 131, 2018.

PELICICE, Fernando M. *et al.* Human impacts and the loss of Neotropical freshwater fish diversity. **Neotropical Ichthyology**, v. 19, p. e210134, 2021.

REIS, Roberto E.; Kullander Sven O.; Ferraris Carl J. Jr., **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Edipucrs, 2003.

SÁNCHEZ-ROMERO, Omar *et al.* First description of the karyotype and localization of major and minor ribosomal genes in *Rhoadsia altipinna* Fowler, 1911 (Characiformes, Characidae) from Ecuador. **Comparative cytogenetics**, v. 9, n. 2, p. 271, 2015.

SOUZA, Camila S. *et al.* Phylogenomic analysis of the Neotropical fish subfamily Characinae using ultraconserved elements (Teleostei: Characidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 171, p. 107462, 2022.

TERÁN, Guillermo E.; BENITEZ, Mauricio F.; MIRANDE, J. Marcos. Opening the Trojan horse: phylogeny of *Astyanax*, two new genera and resurrection of *Psalidodon* (Teleostei: Characidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 190, n. 4, p. 1217-1234, 2020.

TOLEDO-PIZA, Mônica *et al.* Checklist of the species of the Order Characiformes (Teleostei: Ostariophysi). **Neotropical Ichthyology**, v. 22, n. 1, 2024.

UTSUNOMIA, Ricardo *et al.* A glimpse into the satellite DNA library in Characidae fish (Teleostei, Characiformes). **Frontiers in Genetics**, v. 8, p. 103, 2017.

VICARI, Marcelo Ricardo *et al.* Comparative cytogenetics among species of the *Astyanax scabripinnis* complex. Evolutionary and biogeographical inferences. **Genetics and Molecular Biology**, 31, 1 (suppl), 173-179, 2008.

YANO, Cassia Fernanda; BERTOLLO, Luiz Antônio Carlos; CIOFFI, Marcelo de Bello. Fish-FISH: Molecular cytogenetics in fish species. **Fluorescence in situ hybridization (FISH) application guide**, p. 429-443, 2017.