



INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA CONSERVAÇÃO E
BIOLOGIA EVOLUTIVA – PPG-GCBEv

Caracterização cromossômica de seis espécies de peixes da família
Curimatidae (Characiformes) da Amazônia

JULIANA NASCIMENTO MORAES

Manaus, Amazonas

Janeiro/2021

JULIANA NASCIMENTO MORAES

**Caracterização cromossômica de seis espécies de peixes da família
Curimatidae (Characiformes) da Amazônia**

ORIENTADORA: ELIANA FELDBERG

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

Manaus, Amazonas

Janeiro/2021



COPOG
COORDENAÇÃO DE
PÓS-GRADUAÇÃO



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PPG GCBEV
GENÉTICA, CONSERVAÇÃO E BIOLOGIA EVOLUTIVA

Ministério da
Ciência, Tecnologia
e Inovação



**ATA DA DEFESA PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, CONSERVAÇÃO E BIOLOGIA EVOLUTIVA**

No dia 12 de Fevereiro de 2021, às 14:00 horas, de modo on-line, reuniu-se a Banca Julgadora da **DEFESA PÚBLICA de Mestrado**, composta pelos(as) seguintes Doutores(as), membros titulares: Josiane Bacarin Traldi, Lucia Giuliano Caetano e Bruno Melo; tendo como membros suplentes: Vanessa Susan Pinheiro Figliuolo e Patrik Viana, afim de proceder a arguição pública da **DISSERTAÇÃO** da estudante **Juliana Nascimento Moraes** intitulada: **“Caracterização cromossômica de seis espécies de peixes da família Curimatidae (Characiformes) da Amazônia”**. O estudo foi conduzido sob a orientação da Dra. Eliana Feldberg, do INPA.

Após a exposição da aula, dentro do tempo regulamentar, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Banca Julgadora, tendo recebido o conceito final:

- Aprovado por unanimidade Reprovado
 Aprovado por maioria

Menção:

- Aprovado com “Distinção” Aprovado com “Distinção e Louvor”

Foi lavrada a ata e assinada pelos Doutores(as), membros presentes da Banca Julgadora.

Josiane Bacarin Traldi – UFAM

Josiane Bacarin Traldi

Lucia Giuliano Caetano – UEL

Lucia Giuliano Caetano

Bruno Melo – UNESP Botucatu

Bruno Melo

Vanessa Susan Pinheiro Figliuolo – INPA

Vanessa Susan Pinheiro Figliuolo

Patrik Viana – INPA

Patrik Viana

Vera Maria Fonseca de Almeida e Val
Dra. Vera Maria Fonseca de Almeida e Val
Vice Coordenadora do PPG GCBEV



Esta Ata não tem efeito de conclusão de curso ou diplomação do estudante. Conforme Regulamento PPG GCBEV Art. 62 “Será conferido ao discente o título de MESTRE ou DOUTOR em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, desde que cumpridas às exigências das Agências de Fomento, dos regulamentos do PPG-INPA e do PPG GCBEV. Para obtenção do título, o estudante deve cumprir, ainda, o exigido nos Arts. 52 ao 55 do Regulamento Geral do INPA e Arts. 61 e 64 do Regulamento PPG GCBEV.

©SEDAB/INPA - Ficha Catalográfica Automática gerada com dados fornecidos pelo(a) autor(a)
Bibliotecário responsável: Jorge Luiz Cativo Alauzo - CRB11/908

M827c Moraes, Juliana Nascimento

Caracterização cromossômica de seis espécies de peixes da família Curimatidae (Characiformes) da Amazônia / Juliana Nascimento Moraes; orientadora Eliana Feldberg. -- Manaus: [s.l.], 2021.
62 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva) -- Coordenação do Programa de Pós-Graduação, INPA, 2021.

1. Citogenética. 2. Peixes amazônicos. 3. Sintenia. 4. DNA ribossomal. 5. ITS. I. Feldberg, Eliana, orient. II. Título.

CDD: 597.80415

Sinopse: Neste estudo foram analisadas citogeneticamente seis espécies da família Curimatidae (Characiformes): *Curimata inornata*, *Curimatella dorsalis* e *Psectrogaster falcata*, coletadas no rio Araguaia/PA, *Curimata vittata*, *Curimatella meyeri* e *Psectrogaster rutiloides*, coletadas no lago Catalão/AM. As análises citogenéticas revelaram um conservadorismo da macroestrutura cromossômica (número diploide e cromossomos dos tipos meta e submetacêntricos). Entretanto, variações na microestrutura cariotípica, como localização da heterocromatina e regiões organizadoras de nucléolos, mapeamento cromossômico dos genes 18S e 5S e sequências teloméricas, sugerem que rearranjos não-robertsonianos estiveram presentes na evolução cariotípica destas espécies, como duplicações e inversões.

Palavras-chave: Peixes amazônicos, citogenética, DNAr, sintenia, telômero, ITS.

Dedico esta dissertação à minha amada família, ao meu marido (Alexandre Vergueiro Jr.) e meus filhos (João Leonardo e Thiago Manoel), que são os pilares da minha vida e os motivos para conseguir me reerguer diante de qualquer adversidade.

A realização deste estudo foi possível devido ao apoio:

Do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), da Divisão de curso de Pós-graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva (DIGEN) e do laboratório de Genética Animal (LGA).

Dos financiamentos fornecidos pelos projetos: Centro de Estudos de Adaptações da Biota Aquática da Amazônia – ADAPTA (INCT/CNPq/FAPEAM 573976/2008-2).

Dinâmica de elementos transponíveis do tipo *Rex* em peixes amazônicos frente a mudanças ambientais” - EDITAL N°. 002/2018 – FAPEAM/UNIVERSAL AMAZONAS.

Citogenética clássica e molecular em peixes da bacia amazônica frente a diferentes desafios ambientais. Taxa da bolsa de produtividade de Eliana Feldberg, CNPq - Processo N° 302421/2014-9.

Do CNPq pela concessão bolsa.

Agradecimentos

Primeiramente quero agradecer a Deus, por resguardar minha saúde e de meus familiares em meio ao caos desta pandemia de COVID-19, também por me permitir concluir este trabalho com muita satisfação e alegria no coração. Neste momento vejo o encerramento de um ciclo extremamente importante em minha vida, a realização de um sonho, que continuará, este é apenas o primeiro passo para a próxima jornada. Não teria conseguido sem a ajuda de **DEUS** e de **VÁRIAS** pessoas.

Não há como descrever a importância de ter uma família ao meu lado em todos os momentos da vida, que vão desde os ensinamentos, conselhos, incentivos, cobranças, alegrias, apoio, amor, porto seguro! Muito obrigada minha grande família Moraes por TUDO. Em especial ao meu marido, Alexandre Vergueiro Júnior, que está ao meu lado sempre, apoiando, incentivando, cobrando e aguentando meus estresses. Se não fosse por esse grande homem, talvez não tivesse chegado até aqui, principalmente após a licença maternidade, que eu não tinha forças para retornar ao mestrado e deixar um bebê de 3 meses em casa, com o meu coração cheio de medos, recebi o incentivo certo. Aos meus filhos, João Leonardo e Thiago Manoel, fontes de minha energia e o principal motivo do meu levantar, de não desistir e de buscar ser melhor constantemente. Juntos com meus dois enteados, Isaque Manoel e Ana Manoela, este grande quarteto são as riquezas da Casa, por quem batalhamos diariamente para ter um lar cheio de amor. Agradeço minha sogra, Lídia Collyer, por estar sempre disposta a estar ao lado de seus netos, sempre que a gente precisa. Obrigada também a Jaciene Reis (babá do Thiaguinho) que divide a responsabilidade de cuidar do meu pequeno com muita dedicação e carinho.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo recurso financeiro e concessão da bolsa de estudos. Aos financiamentos fornecidos pelos projetos: Centro de Estudos de Adaptações da Biota Aquática da Amazônia – ADAPTA (INCT/CNPq/FAPEAM 573976/2008-2), Dinâmica de elementos transponíveis do tipo *Rex* em peixes amazônicos frente a mudanças ambientais” - EDITAL Nº. 002/2018 – FAPEAM/UNIVERSAL AMAZONAS e Citogenética clássica e molecular em peixes da bacia amazônica frente a diferentes desafios ambientais. Taxa da bolsa de produtividade de Eliana Feldberg, CNPq - Processo Nº 302421/2014-9.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) pelo excelente programa de pós-graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva e todo suporte concedido para a realização desta pesquisa. À coordenação do Programa, no nome da Dra. Jacqueline Batista e

aos membros do Conselho Dra. Vera Val, Dra. Eliana Feldberg e Dra. Gislene Zilse, por sempre estarem ao lado de seus alunos, buscando o melhor para a nossa formação. A professora Dra. Josiane Traldi por ter compartilhado grandes ensinamentos nas aulas da UFAM e sempre estar disponível em colaborar com meu aprendizado. Aos professores que tive nas disciplinas, pelo compartilhamento de semanas de conhecimentos, terei sempre admiração – Josiane Traldi, Mário de Pinna, Eliana Feldberg, Jacqueline Batista, Gislene Zilse, Miriam Rafael, Fernanda Werneck, Camila Ribbas, Izeni Farias, Fábio Lima, Waleska Gravena, entre outros. Ao professor Dr. Jansen Zuanon por ter identificado todos os espécimes utilizados nesta pesquisa, esta ajuda foi fundamental. E também aos colegas de turma do mestrado – Débora Lunkes, Wagner Azevedo, Eduardo Freitas, Luana Faria, Yasmin Dantas, Júlia Mesquita, Larissa Matos, Ellen Garcia, Andrea Jobim – pela companhia durante incansáveis disciplinas.

Agradecimento especial para minha orientadora, Dra. Eliana Feldberg, que me acolheu, me auxiliou e não mediu esforços para a realização deste trabalho. Além disso, teve toda paciência, todo amor, dedicação e carinho necessários para o meu crescimento profissional. Com os braços abertos, sempre me recebeu em várias conversas e desabafos, estando sempre presente, uma grande “mãe” científica para mim e para todos os seus orientados. Obrigada por tanta dedicação e competência!

Agradeço infinitamente ao grupo de pesquisa do Laboratório de Genética Animal do INPA, sob a coordenação da Dra. Eliana Feldberg, onde realizei todo trabalho necessário para a realização deste mestrado, conhecendo pessoas incríveis que me ajudaram desde o início desta caminhada, com uma convivência primordial para meu amadurecimento profissional: Alex Viana, Debora Lunkes, Érika Milena, Francijara Araújo, Janice Quadros, José Souza, Leandro Marajó, Leonardo Goll, Patrik Viana, Ramon Favarato, Simone Soares e Vanessa Figliuolo, pela companhia, conversas, conselhos, risadas, apoio e, claro, todo auxílio nas análises e coletas, cada um teve sua contribuição de forma única. Em especial ao Ramon e Patrik por serem muito prestativos, por todo auxílio nas análises laboratoriais, troca de ideias e colaborações diversas. E a minha apoiadora de vários momentos, Vanessa, que me auxiliou durante grande parte do mestrado, com muito apoio, incentivo, paciência, amizade e sugestões. Muito obrigada pessoal, de todo coração!

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a conclusão deste trabalho e grande conquista, eu não teria finalizado com sucesso se não tivesse pessoas especiais ao meu lado. Muito obrigada a todos!!!

“Dificuldades preparam pessoas comuns para destinos extraordinários”

C. S. Lewis

Resumo

A família Curimatidae Gill 1858 compreende espécies de peixes, que dentre os Characiformes, são facilmente distinguíveis por não possuírem dentes em suas mandíbulas. Atualmente, a família possui 117 espécies válidas em oito gêneros, amplamente distribuídas na América Central e na América do Sul, sendo encontradas em maior abundância na Amazônia. Abordagens citogenéticas clássicas já foram realizadas em 38 espécies desta família, entretanto estudos citogenéticos moleculares ainda são incipientes. Desta forma, este estudo objetivou contribuir para o entendimento da evolução cromossômica de espécies de curimatídeos, buscando compreender o processo de diversificação cariotípica destes peixes, onde foram analisadas três espécies (*Curimata vittata*, *Curimatella meyeri* e *Psectrogaster rutiloides*) da bacia amazônica e três espécies (*Curimata inornata*, *Curimatella dorsalis* e *Psectrogaster falcata*) da bacia Tocantins-Araguaia. Evidenciamos os primeiros dados citogenéticos para a espécie *Psectrogaster falcata*, e os primeiros dados citogenéticos moleculares para as seis espécies aqui estudadas. Todas as espécies apresentaram número diploide igual a 54 cromossomos dos tipos meta e submetacêntricos (NF=108), apresentando fórmulas cariotípicas espécie-específicas. O padrão da heterocromatina foi evidenciado em regiões centroméricas e terminais de vários cromossomos, além de blocos conspícuos nas espécies de *Psectrogaster*. A região organizadora de nucléolo (Ag-RON) foi do tipo simples em cinco espécies e múltipla em *C. vittata*, todas com heterocromatina positiva. A localização cromossômica da RON foi confirmada pelo mapeamento do DNA ribossomal 18S, evidenciando um par cromossômico adicional na espécie *C. meyeri*. O DNAr 5S foi localizado em um par cromossômico em 5 espécies, contudo dois pares foram encontrados na espécie *P. rutiloides*. Ainda, evidenciamos o primeiro relato de sintenia entre 18S e 5S na família Curimatidae, na espécie *C. dorsalis*. Sequências teloméricas (TTAGGG)_n foram destacadas em regiões terminais dos cromossomos das espécies do gênero *Curimata*, entretanto presença de sequências teloméricas insterciais (ITS) foram evidenciadas em vários cromossomos das espécies dos gêneros *Curimatella* e *Psectrogaster*. Diante disto, apesar de uma macroestrutura cromossômica conservada, os dados citogenéticos moleculares, inéditos para estas espécies, indicam a ocorrência de rearranjos não-Robertsonianos, evidenciando que a microestrutura cariotípica destas espécies está envolvida no processo de diversificação cromossômica.

Abstract

The Curimatidae family Gill 1858 are a group of fishes, that among the Characiformes, are easily identified by not having teeth in their jaws. Currently, the family has 117 valid species in eight genera, widely distributed in Central and South America, being found in greater abundance in the Amazon Region. Classical cytogenetics analysis have already been carried out in 38 species of this family, however molecular cytogenetic studies are still incipient. Therefore, this study aimed to contribute to the knowledge of chromosomal evolution of curimatid species, on this way contributing to clarify the diversification process of these fishes karyotypes, three species collected at the Amazon basin (*Curimata vittata*, *Curimatella meyeri* and *Psectrogaster rutiloides*) and the others three species from the Tocantins-Araguaia basin (*Curimata inornata*, *Curimatella dorsalis* and *Psectrogaster falcata*). We highlight the first *Psectrogaster falcata* cytogenetics data and the first molecular cytogenetics data for the others six species here studied. All species here studied had a diploid number with 54 chromosomes, meta and submetacentric types ($FN = 108$), presenting species-specific karyotypes formulas. The heterochromatin pattern was evident in centromeric and terminal regions of some chromosomes, in addition to conspicuous blocks in the *Psectrogaster* species. The nucleolus organizing region (Ag-NOR) was single in five species and multiple only in *C. vittata*, all with positive heterochromatin. The chromosomal location of NOR was confirmed using the 18S ribosomal DNA mapping, showing an additional chromosomal pair in the species *C. meyeri*. rDNA 5S was found only in a chromosome pair from 5 species, however the species *P. rutiloides* have two pairs. In our analysis, we found the first case of synteny between 18S and 5S in the Curimatidae family, in the *C. dorsalis* species. Telomeric sequences $(TTAGGG)_n$ were highlighted in terminal regions of the chromosomes from species of *Curimata* genus, however the presence of interstitial telomeric sequences (ITS) were evidenced in several chromosomes from species of *Curimatella* and *Psectrogaster* genera. Given this, despite a conserved chromosomal macrostructure, the molecular cytogenetic data obtained to these species suggest the occurrence of non-Robertsonian rearrangements, showing that the karyotype microstructure of these species is involved in the chromosomal diversification process.

Sumário

Lista de Figuras	XII
Lista de Tabelas	XIII
1. Introdução.....	1
1.1. Sistemática da Família Curimatidae	4
1.2. Citogenética da família Curimatidae	7
2. Objetivos	14
2.1 Objetivo Geral	14
2.2 Objetivos Específicos	14
3. Material e Métodos.....	15
3.1 Indução de mitoses	17
3.2 Obtenção de cromossomos mitóticos	17
3.3 Coloração convencional (Giemsa)	18
3.4 Detecção das regiões de heterocromatina	18
3.5 Regiões Organizadoras de Nucléolos (Ag-RON)	18
3.6 Citogenética molecular	19
3.6.1 Extração de DNA total	19
3.6.2 Preparação das sondas de DNA ribossômico (DNAr) 18S e 5S	19
3.6.3 Preparação da sonda telomérica	20
3.6.4 Marcação de sondas	20
3.6.5 Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	20
3.7 Análise cariotípica	21
4. Resultados	23
5. Discussão.....	28
6. Conclusões	35
7. Referências Bibliográficas	37

Lista de Figuras

- Figura 1.** Número de espécies de peixes válidas para a região amazônica e comparações com outras bacias (gráfico à esquerda) e com outros continentes (mapa e gráfico inferior) (Fonte: Dagosta e Pinna 2019) 2
- Figura 2.** Algumas espécies da família Curimatidae. (Fonte: Queiroz *et al.* 2013) 3
- Figura 3.** Filogenias da família Curimatidae, baseadas em: (A) dados morfológicos (Vari, 1989a), números indicam as sinapormorfias propostas que suportam cada clado, e (B) moleculares (Melo *et al.* 2018), números em ramos representam suporte de bootstrap (Fonte: Melo *et al.* 2018) 5
- Figura 4.** Árvore coalescente de espécies da família Curimatidae, baseada em dados moleculares inferida por *BEAST. Círculos indicam grau de suporte dos ramos (Fonte: adaptado de Melo *et al.* 2018) 6
- Figura 5.** Mapa do Brasil, **A)** destacando a bacia amazônica brasileira, em verde, e a bacia do Tocantins-Araguaia, em amarelo. **B)** local de coleta no rio Araguaia/PA (ponto vermelho) e **C)** local de coleta no lago Catalão/AM (ponto vermelho). (Fonte: adaptado de wikipedia.org) 14
- Figura 6.** Espécies da família Curimatidae estudadas neste trabalho. **A)** *Curimata inornata*; **B)** *Curimata vittata*; **C)** *Curimatella dorsalis*; **D)** *Curimatella meyeri*; **E)** *Psectrogaster falcata*; **F)** *Psectrogaster rutiloides* 15
- Figura 7.** Cariótipos das espécies da família Curimatidae analisadas em coloração convencional Giemsa (à esquerda), bandeamento C (à direita) e regiões organizadoras de nucléolo (Ag-RON, box). Barra de escala = 10µm 23
- Figura 8.** Cariótipos das espécies da família Curimatidae analisadas com marcadores cromossômicos moleculares. À esquerda: *Double FISH* com sondas de DNAr 18S (vermelho) e 5S (verde); À direita: sondas com sequências teloméricas (TTAGGG)_n (vermelho). Barra de escala = 10µm 27

Lista de Tabelas

Tabela 1. Dados citogenéticos de espécies de peixes da família Curimatidae. $2n = N^{\circ}$ diploide; NF = N° fundamental; RON = Região organizadora de nucléolo; Tel= Telômero; m= metacêntrico; sm = submetacêntrico; st = subtelocêntrico; a = acrocêntrico; B = cromossomo supranumerário; p= braço curto; q = braço longo; t = terminal; i = intersticial; pc = pericentromérico; c = centromérico; ITS = sequência telomérica intersticial; - = dados inexistentes 8

Tabela 2. Espécies, local de coleta e número de indivíduos/sexo analisados. M= macho, F= fêmea, ?= sexo não identificado 14

Tabela 3. Dados citogenéticos das espécies aqui estudadas. $2n =$ número diploide; NF= número fundamental; RON= regiões organizadoras de nucléolo; DNAr= DNA ribossomal; m= metacêntrico; sm= submeta cêntrico; p= braço curto; q= braço longo; t= terminal; i=intersticial 21

1. Introdução

A Região Neotropical se destaca por abrigar a maior biodiversidade do mundo, onde também é encontrada a maior ictiofauna de água doce (Lévêque *et al.* 2008; Antonelli *et al.* 2018a; Dagosta e Pinna 2019), sendo que a principal fonte desta elevada riqueza de espécies vem da Grande Amazônia (Antonelli *et al.* 2018b). É nesta região que está localizada a maior bacia hidrográfica do mundo (bacia do rio Amazonas), devido a sua ampla distribuição e extensão continental, ocupando uma área de aproximadamente 6×10^6 km², abrangendo territórios do Brasil (63%), Peru (17%), Bolívia (11%), Colômbia (5,8%), Equador (2,2%), Venezuela (0,8%) e Guiana (0,2%) (Goulding *et al.* 2003). Esta bacia possui diferentes tipos de solo, vegetação e tipos de água, com uma grande diversidade de ambientes aquáticos, como lagos, corredeiras, canais profundos dos grandes rios, áreas alagadas sazonalmente (várzeas e igapós), igarapés, que estão diretamente relacionados com a riqueza de espécies de peixes de água doce, encontrada nesta região (Sioli 1983; Goulding *et al.* 2003; Van der Sleen e Albert 2018). A bacia do Tocantins-Araguaia, embora não seja afluenta da bacia amazônica, pois desagua diretamente no Oceano Atlântico ao Sul da Ilha de Marajó, é reconhecida como uma ecoregião de água doce da Amazônia, além de ser considerada a maior bacia hidrográfica totalmente brasileira abrangendo cerca de 967.059 km², presente nos biomas da Amazônia (ao norte) e Cerrado (ao Sul) (Abell *et al.* 2008; Albert e Reis 2011; Dagosta e Pinna 2017). Formada por rios de águas claras, esta bacia tem uma ictiofauna com alto nível de espécies endêmicas semelhante aos níveis encontrados em alguns afluentes da bacia do rio Amazonas (Dagosta e Pinna 2019).

Considerando o crescente número de espécies de peixes descritas para a Amazônia nos últimos anos, Dagosta e Pinna (2019) enunciam 2.716 espécies válidas para a região, distribuídas em 529 gêneros, 60 famílias e 18 ordens, tornando esta grande região a detentora da maior diversidade ictífica do mundo, possuindo mais que o dobro de espécies de peixes encontradas na bacia do Congo, na África, que ocupa o segundo lugar com 1.250 espécies válidas (Figura 1).

Nesta diversidade de peixes amazônicos destaca-se a ordem Characiformes (tetras, piranhas, dourado e outros), com representantes na África e nas Américas (desde o sul da América do Norte, América Central e América do Sul). Esta ampla distribuição favorece o processo de especiação, fazendo com que a ordem Characiformes seja considerada a quarta ordem mais dominante do mundo, com 2.290 espécies válidas (Fricke *et al.* 2021) e a segunda na região neotropical, com 1.453 espécies válidas (Albert *et al.* 2020). Na região amazônica é

a ordem de maior destaque em riqueza de espécies, com 1.063 espécies descritas, alocadas em 16 famílias (Dagosta e Pinna 2019). Os peixes desta ordem apresentam tamanhos corpóreos variáveis, entre 15 mm até maiores que um metro, apresentam grande variedade de hábitos alimentares, com espécies carnívoras, iliófagas e herbívoras (Van der Sleen e Albert 2018). Na Amazônia, as quatro famílias mais abundantes de Characiformes são: Characidae Latreille 1825 (635 espécies), Anostomidae Gunther 1864 (91 espécies), Curimatidae Gill 1858 (74 espécies) e Serrasalminidae Bleeker 1859 (72 espécies) (Dagosta e Pinna 2019).

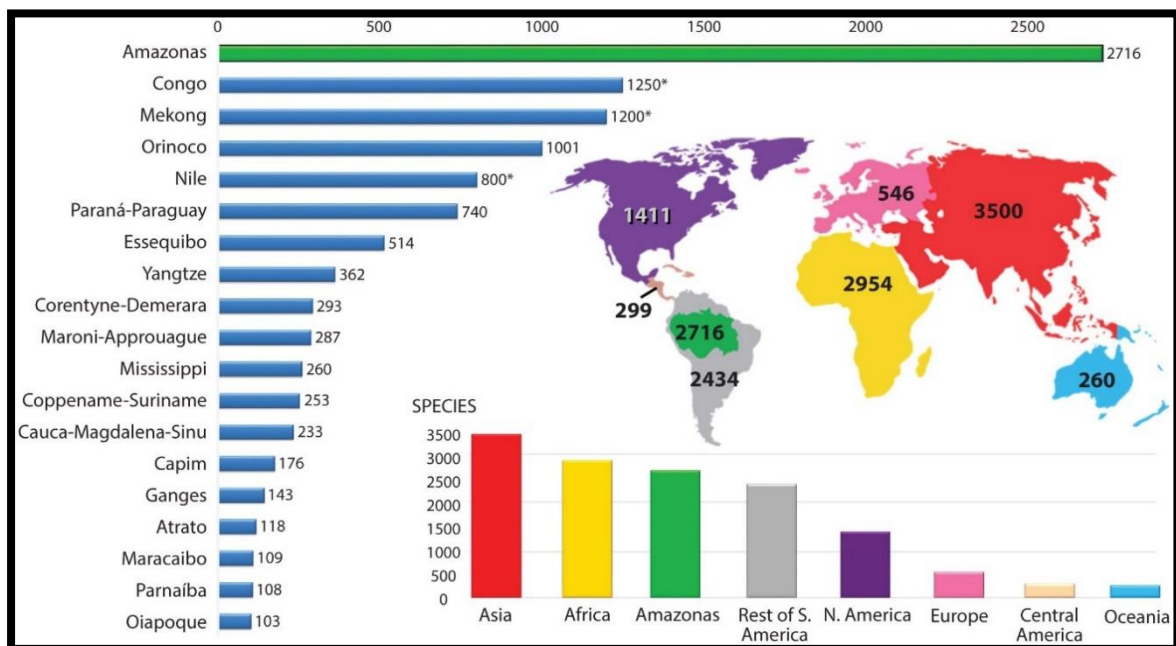


Figura 1. Número de espécies de peixes válidas para a região amazônica e comparações com outras bacias (gráfico à esquerda) e com outros continentes (mapa e gráfico inferior) (Fonte: Dagosta e Pinna 2019).

A família Curimatidae, amplamente distribuída na região neotropical, ocorre desde o sul da Costa Rica até o sul de Buenos Aires, na Argentina, assim como nos rios transandinos do Peru, nos rios e lagos da bacia do Orinoco, em toda a região amazônica até a costa atlântica do Brasil. Na Amazônia ocorrem nos diferentes tipos de água (branca, preta e clara) e em diversos ambientes, que vão desde lagos, córregos de fluxo lântico e lótico, rios sinuosos, corredeiras e matas alagáveis (Vari 1989a; 2003). Isto porque apresentam capacidade adaptativa para colonizar ambientes com sedimentação de partículas menores, mas que possuam recurso alimentar à disposição (Castro e Arcifa 1987; Barbieri 1995).

Os curimatídeos são facilmente distinguíveis das demais espécies de Characiformes, por não possuírem dentes em ambas as mandíbulas (Vari 2003; Nelson *et al.* 2016). Por esse motivo apresentam modificações anatômicas bucais que permitem a exploração da região superficial

do perifiton e, conseqüentemente, ingerem uma grande quantidade de detritos associados a algas unicelulares, microrganismos e partículas finas de matéria orgânica, podendo assim serem considerados detritívoros (Vari 1989a) ou iliófagos (Bowen 1983).

Os curimatídeos possuem coloração prateada, sendo que algumas espécies apresentam manchas escuras, barras ou listras no corpo e nadadeiras. As espécies apresentam diferenças de formas e tamanho corporal, sendo fusiformes alongadas (p.e. *Curimata ocellata* Eigenmann & Eigenmann 1889) ou mais encorpadas e comprimidas lateralmente (p.e. *Psectrogaster amazonica* Eigenmann e Eigenmann 1889), podendo atingir até 27cm de comprimento. No entanto, a maioria dos curimatídeos possuem um corpo intermediário entre essas duas formas, sendo moderadamente comprimida e levemente alongada (p.e. *Curimata vittata* Kner, 1858) (Figura 2) (Vari1989a).

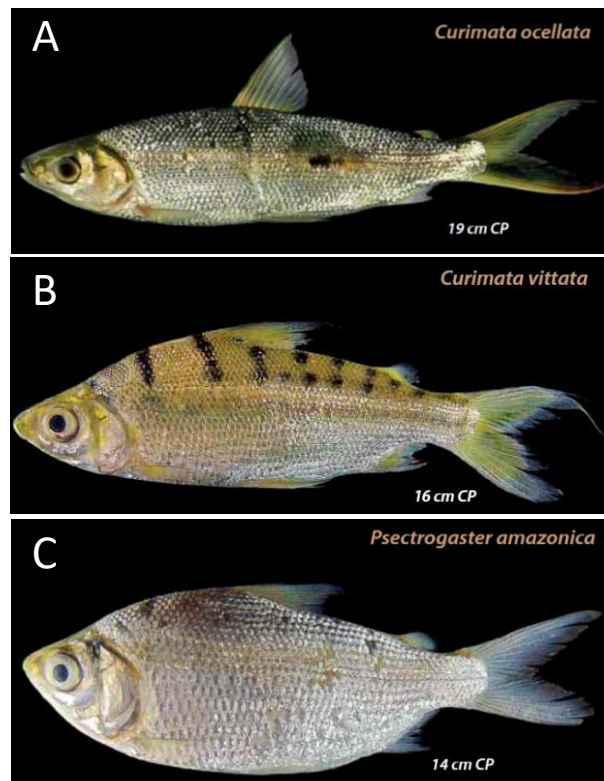


Figura 2. Algumas espécies da família Curimatidae. (Fonte: Queiroz *et al.* 2013)

Os peixes adultos da família Curimatidae realizam migrações laterais, deixando as áreas alagadas em direção aos grandes rios (Welcomme 1985). Segundo Cox-Fernandes (1997), alguns curimatídeos apresentam um padrão trifásico de migração lateral. A primeira etapa deste padrão é uma migração relacionada com o período de vazante (agosto-setembro), onde os cardumes saem das áreas alagadas em direção ao rio, seguindo a corrente do canal principal,

em busca de recursos alimentares. Nos meses de dezembro e janeiro ocorre um segundo pico migratório que é relacionado com a reprodução, quando os peixes com gônadas maduras saem da planície de inundação e migram rio acima, contra a corrente, para a desova. E um terceiro pico migratório encontrado após a desova (fevereiro-maio), entrando na planície recém inundada, onde a corrente favorece a deriva larval e natação dos adultos. Devido ao grande número de espécies e migrações anuais, muitas delas são exploradas, seja para pesca de subsistência ou pesca comercial (Lowe-McConnell 1999; Malabarba e Malabarba 2020). Além disso os curimatídeos têm grande relevância ecológica, sendo recurso alimentar para peixes de maior porte (Vari 2003).

1.1. Sistemática da Família Curimatidae

Atualmente, são reconhecidos oito gêneros na família Curimatidae: *Curimata* Bosc 1817 (13 espécies), *Curimatella* Eigenmann & Eigenmann 1889 (5 espécies), *Curimatopsis* Steindachner 1876 (11 espécies), *Cyphocharax* Fowler 1906 (45 espécies), *Potamorhina* Cope 1878 (5 espécies), *Psectrogaster* Eigenmann & Eigenmann 1889 (8 espécies), *Pseudocurimata* Fernández-Yépez 1948 (6 espécies) e *Steindachnerina* Fowler 1906 (24 espécies) (Fricke *et al.* 2020). Na bacia amazônica há registro de espécies de todos os gêneros, com exceção de *Pseudocurimata* que ocorre apenas em rios do Equador e Peru (Vari 1989b; Van der Sleen e Albert 2018).

O histórico da sistemática da família Curimatidae teve início com Gunther (1864), quando relacionou ao grupo supragenérico Curimatina, membros de Curimatidae (*Curimatus*), Prochilodontidae Eigenmann 1909 (*Prochilodus*), Chilodontidae Eigenmann 1903 (*Caenotropus*), Hemiodontidae Bleeker 1859 (*Hemiodus*) e Parodontidae Eigenmann 1910 (*Saccodon*, *Parodon*). Posteriormente, os curimatídeos neotropicais (*Curimatus*) passaram a fazer parte da subfamília Citharininae (família Characinidae) (Boulenger 1904), agrupamento que foi desconsiderado por Regan (1911) e incluiu os gêneros *Curimatus* e *Anodus* à subfamília Curimatinae (família Anostomidae.), ainda no período pré-cladístico, em pesquisa morfológica detalhada, reorganizaram o grupo dos peixes teleósteos, inserindo Curimatidae na ordem Cypriniformes, juntamente com outras 15 famílias. Após o surgimento da metodologia cladística (Hennig 1950), houve a classificação filogenética da ordem Characiformes realizada por Fink e Fink (1981).

Com base em dados morfológicos detalhados, Vari (1983) considerou Curimatidae e Prochilodontidae como grupos irmãos, sustentado por 11 sinapomorfias e, essas duas famílias, como grupo irmão de Anostomidae e Chilodontidae, sendo as quatro famílias consideradas

monofiléticas, sustentado por quatro sinapomorfias. Em 1998, Buckup considerou estas quatro famílias como parte da superfamília Anostomoidea Gunther 1864. Posteriormente, Melo *et al.* (2014) sugeriram uma nova relação filogenética molecular de Chilodontidae como grupo irmão de Curimatidae e ambas como um grupo irmão de Prochilodontidae, relação que foi corroborada por Betancur-R *et al.* (2018), considerando Anostomidae como grupo irmão destas 3 famílias.

Vari (1989a) também propôs uma hipótese intergenérica para a família Curimatidae (Figura 3A), apoiada por 19 sinapomorfias morfológicas, sugerindo um monofiletismo para os gêneros *Curimatopsis*, *Potamorhina*, *Curimata* e *Psectrogaster*, mas com uma politomia terminal entre *Curimatella*, *Cyphocharax*, *Pseudocurimata* e *Steindachnerina*. Melo *et al.* (2018), a partir de novas análises filogenéticas moleculares (Figura 3B), corroboraram o monofiletismo de Curimatidae, mas a interrelação dos gêneros difere da hipótese de Vari (1989a), exceto pela proposição de *Curimatopsis* como grupo irmão de todos os demais gêneros, que é corroborada por ambas filogenias. A filogenia molecular evidencia *Potamorhina* como grupo irmão de *Curimata*, *Pseudocurimata* como grupo irmão de *Psectrogaster*, e revela um grande clado composto por *Steindachnerina* como monofilético, *Cyphocharax* parafilético e *Curimatella* polifilético (Figura 4), sugerindo a atribuição do nome de um único gênero ou o reconhecimento de vários gêneros dentro deste clado. Isto indica uma filogenia ainda não totalmente resolvida.

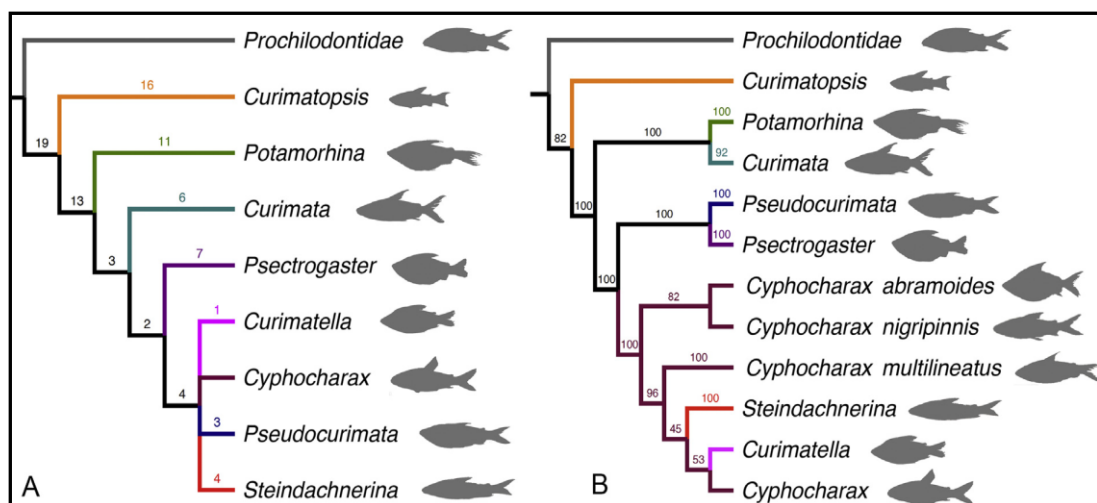


Figura 3. Filogenias da família Curimatidae, baseadas em: (A) dados morfológicos (Vari, 1989a), números indicam sinapormorfias propostas que suportam cada clado, e (B) dados moleculares (Melo *et al.* 2018), números em ramos representam suporte de bootstrap (Fonte: Melo *et al.* 2018).

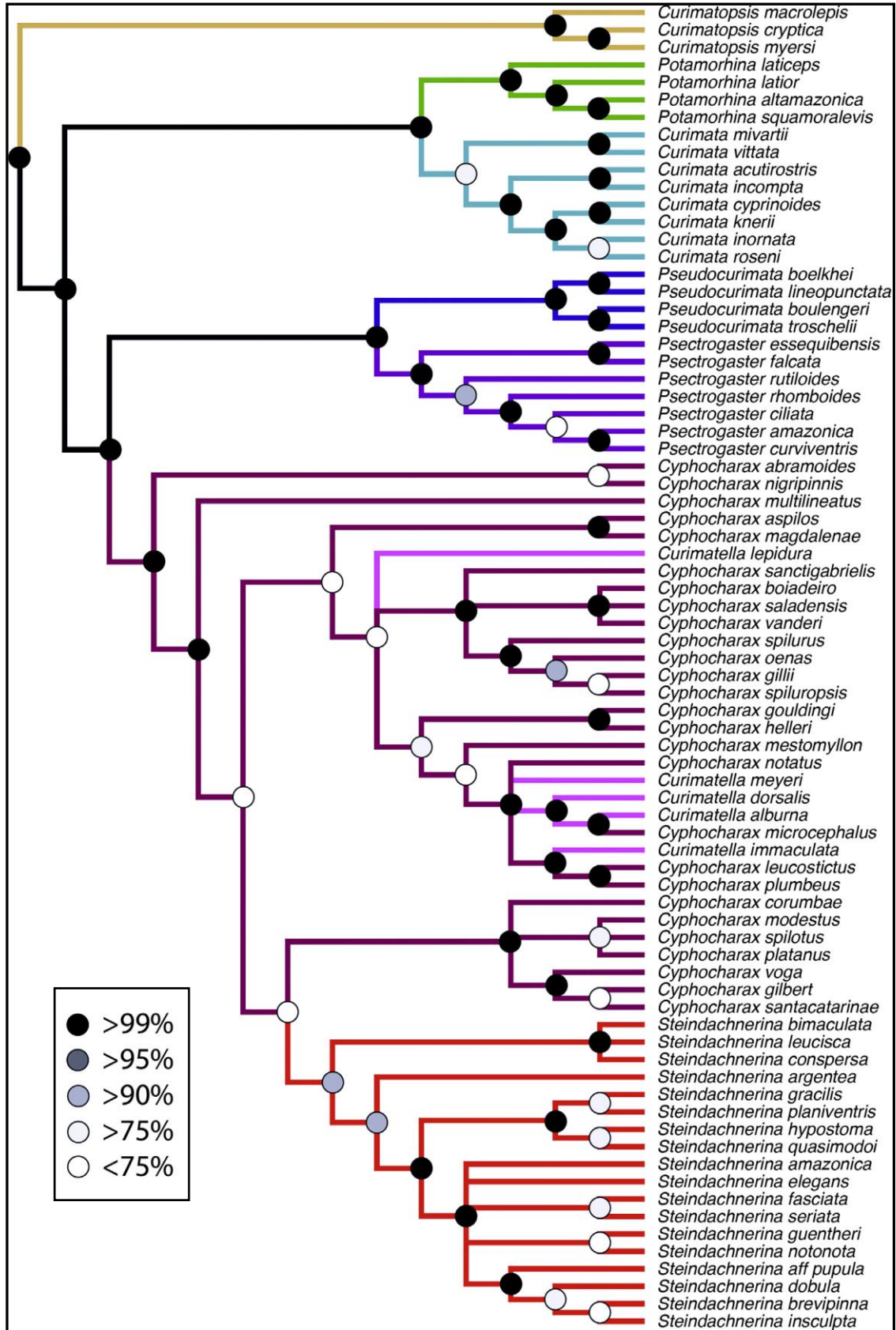


Figura 4. Árvore coalescente de espécies da família Curimatidae, baseada em dados moleculares inferida por *BEAST. Círculos indicam grau de suporte dos ramos (Fonte: adaptado de Melo *et al.* 2018).

1.2. Citogenética da família Curimatidae

A família Curimatidae possui descrição cariotípica para representantes de sete gêneros em um total de 38 espécies, das 117 que constituem a família. Entretanto, informações citogenéticas moleculares estão disponíveis para apenas nove espécies, representando três gêneros: *Cyphocharax*, *Potamorhina* e *Steindachnerina* (Oliveira 2010; Pinheiro *et al.* 2016; Sampaio *et al.* 2016). De uma maneira geral, Curimatidae é dita conservada em relação ao número diploide ($2n$), uma vez que a grande maioria de suas espécies tem $2n=54$ cromossomos dos tipos metacêntricos e submetacêntricos. As variações deste padrão foram descritas para os gêneros *Curimata* (Feldberg *et al.* 1992), *Potamorhina* (Feldberg *et al.* 1993; Brassesco *et al.* 2004; Pinheiro *et al.* 2016), *Cyphocharax* (Brassesco *et al.* 2004; Venere *et al.* 2008) e *Curimatopsis* (Navarrete e Júlio Jr 1997), nos quais encontramos tanto aumento como diminuição deste número, bem como a presença de cromossomos B (Venere e Galetti 1989; Feldberg *et al.* 1992; 1993; Navarrete e Júlio Júnior 1997; Venere *et al.* 2008) (Tabela 1).

Em *Potamorhina* encontramos uma espécie com $2n=54$ (*P. pristigaster*), uma espécie com $2n=56$ (*Potamorhina latior* Spix & Agassiz 1829) e duas espécies com $2n=102$ (*Potamorhina altamazonica* Cope 1878 e *Potamorhina squamoralevis* Braga & Azpelicueta 1983) (Feldberg *et al.* 1993; Brassesco *et al.* 2004; Pinheiro *et al.* 2016), sendo que as duas últimas com elevado número de cromossomos acrocêntricos. Enquanto que em *Cyphocharax platanus* Gunther 1880 que apresenta $2n=58$ e *Curimata ocellata* que apresenta $2n=56$, não há cromossomos acrocêntricos (Feldberg *et al.* 1992; Brassesco *et al.* 2004; Venere *et al.* 2008). Por outro lado, em *Curimatopsis myersi* Vari 1982 ocorreu uma redução do número diploide para $2n=46$ (Navarrete e Júlio Júnior 1997).

Uma outra variação no número de cromossomos também observada na família Curimatidae é a ocorrência de cromossomos B, encontrados nos gêneros *Cyphocharax* e *Steindachnerina* (Tabela 1) (Venere e Galetti 1985; Oliveira e Foresti 1993; Martins *et al.* 1996; Venere *et al.* 2008; Sampaio *et al.* 2011). Estes cromossomos são também conhecidos como supranumerários, uma vez que são cromossomos adicionais e encontrados somente em determinados indivíduos ou populações (Guerra 1988).

Tabela 1 – Dados citogenéticos de espécies de peixes da família Curimatidae. 2n= n° diploide; NF= n° fundamental; Ag-RON= região organizadora de nucléolo; m= metacêntrico; sm= submetacêntrico; st= subtlocêntrico; a= acrocêntrico; B= cromossomo supranumerário; p= braço curto; q= braço longo; t= terminal; i= intersticial; pc= pericentromérico; c= centromérico; ITS= sequência telomérica intersticial; - =dados inexistentes.

Espécie	Localidade	2n	NF	Fórmula Cariotípica	Ag-RON / posição	Banda C	DNAr 18S / posição	DNAr 5S / posição	Telômero	Ref
<i>Curimata</i>										
<i>C. cyprinoides</i>	Rio Negro e Solimões/AM	54	108	44m+10sm	3°m/qt	-	-	-	-	3
	Rio Araguaia/MT	54	108	44m+10sm	7°m/qt	-	-	-	-	16
<i>C. inornata</i>	Rio Negro e Solimões/AM	54	108	40m+14sm	21°sm/pi	-	-	-	-	3
	Rio Araguaia/MT	54	108	40m+14sm	3°m22°sm/qt	pc/t	-	-	-	16
	Rio Araguaia/PA	54	108	38m+16sm	20°sm/pt	pc/t	20°sm/pt	9°m/pi	t	22
<i>C. knerii</i>	Rio Negro e Solimões/AM	54	108	40m+12sm+2st	27°st/pt	-	-	-	-	3
<i>C. ocellata</i>	Rio Uatumã/AM	56	112	40m+16sm	26°sm/pi	-	-	-	-	3
<i>C. vittata</i>	Rio Negro e Solimões/AM	54	108	42m+12sm	sm/qt	-	-	-	-	3
	Lago Catalão/AM	54	108	38m+16sm	20°21°sm/qt	pc/t	20°21°sm/qt	25°sm/pi	t	22
<i>Curimatella</i>										
<i>C. alburna</i>	Rio Negro e Solimões/AM	54	108	46m+8sm	14°m/qt	-	-	-	-	3
<i>C. dorsalis</i>	Rio Miranda/MS	54	108	46m+8sm	13°m/pt	pc	-	-	-	7
	Rio Paraná/AR	54	108	54m/sm	2°m/qt	c/t	-	-	-	11
	Rio Araguaia/PA	54	108	44m+10sm	2°m/qt	pc/t	2°m/qt	2°m/qi	t/ITS 18 pares	22
<i>C. immaculata</i>	Rio Araguaia/GO	54	108	46m+8sm	24°sm/qt	-	-	-	-	16
<i>C. lepidura</i>	Rio São Francisco/SP	54	108	54m/sm	9°m/pt	-	-	-	-	2
<i>C. meyeri</i>	Rio Negro e Solimões/AM	54	108	46m+8sm	9°m/qt	-	-	-	-	3
	Lago Catalão/AM	54	108	46m+8sm	9°m/qt	pc/t/i	7°m/pt 9°m/qt	26°sm/pi	t/ITS 14 pares	22
<i>Curimatopsis</i>										
<i>C. myersi</i>	Rio Miranda/MS	46	92	42m+4sm	-	-	-	-	-	7
<i>Cyphocharax</i>										
<i>C. gilbert</i>	Rio Paraibuna/SP	54	108	44m+10sm	2°m/pt	pc/t	-	-	-	16
<i>C. cf gilli</i>	Rio Bento Gomes/MT	54	108	54m/sm	1°m/qi	-	-	-	-	2
<i>C. gouldingi</i>	Rio Araguaia/GO	54	108	54m+B	2°m/qt	-	-	-	-	16
<i>C. modestus</i>	Águas de São Pedro/SP	54	108	54m/sm	2°m/qt	-	-	-	-	2
	Riacho Três Bocas/PR	54	108	54m/sm+B	2°m/qt	pc/t	2°/qt	-	-	6,13,15,19,20
	Rio Mogi-Guaçu/SP	54	108	54m/sm+B	-	pc	-	-	-	8
	Rio Taquari/PR	54	108	54m/sm+B	2°m/qt	pc/t	2°/qt	-	-	13,15
	Rio Tibagi/PR	54	108	54m/sm	2°m/qt	-	2°/qt	-	-	15
	Rio Água da Floresta/PR	54	108	54m/sm	2°m/qt	-	2°/qt	-	-	15

	Rio Paranapanema/SP	54	108	54m/sm+B	2°m/qt	pc/t	2°/qt	3°,20°/pi	-	12,14,17
	Rio Tietê/SP	54	108	54m/sm+B	2°m/qt	pc/t	2°/qt	3°,20°/pi	-	1,12,14,17
<i>C. naegelii</i>	Rio Mogi-Guaçu/SP	54	108	54m/sm	25°/pt	-	-	-	-	2
	Rio Mogi-Guaçu/SP	54	108	46m+8 sm	1°,2°,11°/qt 6°/pqt 21°/pt	pc/t	-	-	-	16
	Ribeirão Minhoca/MG	54	108	54m/sm+B	6°/qt	pc/t	6°/qt	3°,20°/pi	t/ITS 2 pares	18
<i>C. platanus</i>	Rio Paraná/AR	58	116	52m/sm+6st	5°m/pt	-	-	-	-	11
	Riacho Pirá-Pytá/AR	58	116	48m+4sm+6st	6°m/pt	pc/t	-	-	-	16
<i>C. cf spilurus</i>	Rio Madeira/RO	54	108	54m/sm	10°m/qt	-	-	-	-	2
<i>C. spilotus</i>	Rio Paraná/AR	54	108	54m/sm+B	1°/qi	pc/t	-	-	-	10,11
	Riacho Capivara/RS	54	108	54m/sm+B	2°/qt	pc/t	2°/qt	-	-	19,20
	Gasômetro/RS	54	108	54m/sm+B	2°/qt	pc/t	2°/qt	3crom/pi	-	19,20
<i>C. vanderi</i>	Rio Preto/SP	54	108	54m/sm	6°/qt	-	-	-	-	2
<i>C. voga</i>	Riacho Bolacha/RS	54	108	54m/sm	6°/qt	-	-	-	-	2
	Rio Paraná/AR	54	108	54m/sm	qt	pc/t/i	-	-	-	11
	Rio Saco da Alemoa/RS	54	108	54m/sm+B	5°/qt	pc/t	5°/qt	-	-	19,20
	Riacho Capivara/RS	54	108	54m/sm+B	5°/qt	pc/t	5°/qt	-	-	19,20
	Gasômetro/RS	54	108	54m/sm+B	5°/qt	pc/t	5°/qt	-	-	19,20
	Lagoa Barros/RS	54	108	54m/sm+B	5°/qt	pc/t	5°/qt	2crom/pi	-	19,20
	Lagoa Quadros/RS	54	108	54m/sm+B	5°/qt	pc/t	5°/qt	-	-	19,20
<i>C. saladensis</i>	Barragem A.E.S. UFRGS/RS	54	108	54m/sm+B	8°/qt	pc/t	8°m/qt	2crom/pi	-	19,20
<i>Potamorhina</i>										
<i>P. altamazonica</i>	Rio Negro e Solimões/AM	102	106	2m+2sm+98a	5°a/qt	pc/t/i	5°a/qt	41°a/qi	t	4,21
<i>P. latior</i>	Rio Negro e Solimões/AM	56	112	52m+2sm+2st	25°m/qt	pc/t/i	25°m/qt	4°m/pt	t/ITS 18 pares	4,21
<i>P. pristigaster</i>	Rio Negro e Solimões/AM	54	108	42m+12sm	25°sm/pt	pc	-	-	-	4
	Rio Negro e Solimões/AM	54	108	44m+10sm	5°m/qt	pc/t	5°m/qt	4°m/pt	t/ITS 1 par	21
<i>P. squamoralevis</i>	Rio Paraná/AR	102	116	14m/sm+88a	qt	pc	-	-	-	11
<i>Psectrogaster</i>										
<i>P. amazonica</i>	Rio Araguaia/MT	54	108	44m+10sm	17°m/pt	-	-	-	-	16
<i>P. curviventris</i>	Rio Miranda/MS	54	108	42m+12sm	20°m/pt	pc	-	-	-	7
	Rio Paraná/AR	54	108	54m/sm	qi	pc/t	-	-	-	11
<i>P. falcata</i>	Rio Araguaia/PA	54	108	40m+14sm	13°m/pt	pc/t	13°m/pt	24°sm/pi	t/ITS 15 pares	22
<i>P. rutiloides</i>	Rio Negro e Solimões/AM	54	108	42m+12sm	9°m/qt	-	-	-	-	3
	Lago Catalão/AM	54	108	46m+8sm	16°m/pt	pc/t/i	16°m/pt	5°m/pt 22°sm/qi	t/ITS 18 pares	22
<i>Steindachnerina</i>										
<i>S. amazonica</i>	Rio Araguaia/GO	54	108	42m+12sm	2°m23°sm/qt	pc/t	-	-	-	16
<i>S. biornata</i>	Rio Forquethinha/RS	54	108	54m/sm+B	3°m/qt	pc/t	4crom/qt	-	-	19,20

<i>S. brevipinna</i>	Rio Miranda/MS	54	108	46m+6sm	17°m/pt	c/t	-	-	-	7	
	Rio Paraná/AR	54	108	54m/sm	15°m/qt	pc/i/t	-	-	-	11	
<i>S. conspersa</i>	Rio Paraguai/MS	54	108	54m/sm	2°m/qi	-	-	-	-	2	
	Rio Paraná/AR	54	108	54m/sm	2°m/qt	pc/t/i	-	-	-	11	
<i>S. elegans</i>	Rio São Francisco/SP	54	108	54m/sm	25°/pt	-	-	-	-	2	
<i>S. gracilis</i>	Rio Araguaia/MT	54	108	38m+16sm	4crom/qt	-	-	-	-	16	
<i>S. cf guentheri</i>	Rio São Francisco/AC	54	108	54m/sm	24°/pt	pc/i/t	-	-	-	9	
<i>S. insculpta</i>	Rio Mogi-Guaçu/SP	54	108	54m/sm	25°/pt	-	-	-	-	2	
	Rio Passa-Cinco/SP	54	108	54m/sm	25°/pt	-	-	-	-	2	
	Rio Paranapanema/SP	54	108	54m/sm+B	7°/qt	pc/t	7°/qt	2°/pi	-	5,12,14,17	
	Reserva Jurumirim/SP	54	108	54m/sm+B	-	pc	-	-	-	5	
	Rio Tietê/SP	54	108	54m/sm	7°/qt	pc/t	7°/qt	2°/pi	-	12,14,17	
	Riacho Três Bocas/PR	54	108	54m/sm+B	7°/qt	pc/t	7°/qt	-	-	13,15	
	Rio Taquiri/PR	54	108	54m/sm	7°/qt	pc/t	7°/qt	-	-	13,15	
	Rio Tibagi/PR	54	108	54m/sm	7°/qt	pc/t	7°/qt	-	-	13,15	
	Rio Água da Floresta/PR	54	108	54m/sm	7°/qt	pc/t	7°/qt	-	-	13,15	
	Cachoeira de Emas/SP	54	108	50m+4sm	22°m/pt	pc/t	-	-	-	16	
	Rio Água dos Patos/SP	54	108	54m/sm+B	12°/pt	pc/t	12°/pt	2crom/pi	-	19, 20	
	Riacho Três Bocas/PR	54	108	54m/sm+B	12°/pt	pc/t	12°/pt	2crom/pi	-	19, 20	
	Riacho Pavãp/PR	54	108	54m/sm+B	12°/pt	pc/t	12°/pt	-	-	19, 20	
	Rio Jacutinga/PR	54	108	54m/sm+B	12°/pt	pc/t	12°/pt	-	-	19, 20	
	<i>S. leucisca</i>	Rio Negro e Solimões/AM	54	108	48m+6sm	15°m/pt	-	-	-	-	3

1- Venere e Galetti (1985); 2- Venere e Galetti (1989); 3- Feldberg *et al.* (1992); 4- Feldberg *et al.* (1993); 5- Oliveira e Foresti (1993); 6- Martins *et al.* (1996); 7- Navarrete e Júlio Jr (1997); 8- Venere *et al.* (1999); 9- Carvalho *et al.* (2001); 10- Fenocchio *et al.* (2003); 11- Brassesco *et al.* (2004); 12- De Rosa *et al.* (2006); 13- Gravena *et al.* (2007); 14- De Rosa *et al.* (2007); 15- Teribele *et al.* (2008); 16- Venere *et al.* (2008); 17- De Rosa *et al.* (2008); 18- Oliveira (2010); 19- Sampaio *et al.* (2011); 20- Sampaio *et al.* (2016); 21- Pinheiro *et al.* (2016); 22- Presente estudo.

A heterocromatina é uma região do cromossomo que se encontra em um estado altamente condensado ao longo do ciclo celular, estas regiões contêm uma alta densidade de DNAs repetitivos *in tandem* (DNAs satélites e ribossomais), localizada principalmente em regiões pericentroméricas, terminais e intersticiais (Guerra 1988; Sumner 2003). A heterocromatina tem um papel importante na evolução cromossômica das espécies, pois pode estar relacionada com rearranjos cromossômicos, como translocações, inversões e fusões, e sua identificação permite verificar a organização diferencial do cariótipo das espécies (Ridley 2006; Grewal e Jia 2007).

O padrão de distribuição da heterocromatina na maioria das espécies de Curimatidae, para as quais este marcador é disponível, ocorre em regiões pericentroméricas dos cromossomos, com blocos terminais em alguns cromossomos, sendo que algumas espécies apresentam uma grande quantidade de blocos heterocromáticos em seu conjunto cromossômico, com alguns pares facilmente identificáveis devido à presença de grandes blocos. Entretanto, o padrão de banda C difere entre as espécies (Navarrete e Júlio Jr. 1997; Carvalho *et al.* 2001; Brassesco *et al.* 2004; Venere *et al.* 2008; De Rosa *et al.* 2007; De Rosa *et al.* 2008; Pinheiro *et al.* 2016).

Os DNAs ribossomais, que são sequências repetitivas *in tandem*, são classificados em duas famílias multigênicas altamente conservadas, a classe de genes que codifica o gene ribossomal 5S e a classe principal 45S (genes que codificam RNA ribossomal 18S, 5,8S, 28S), estando esta última classe relacionada com a região organizadora de nucléolo (RON) (Long e David 1980). Apesar destas sequências serem altamente conservadas (mesmo entre táxons não relacionados), possuem espaçadores (NTS) que variam em tamanho e composição, alterando o número de cópias e posição nos cromossomos das espécies, permitindo verificar a dinâmica da organização genômica destes genes (Martins *et al.* 2011; Wang *et al.* 2017; Sochorová *et al.* 2018).

A região organizadora de nucléolo (RON) é um marcador amplamente analisado nas espécies de Curimatidae, onde a sua localização é detectada indiretamente por nitrato de prata (Ag-RON) (Guerra 1988) e a maioria dos estudos em curimatídeos considera este um bom marcador citogenético espécie/específico, uma vez que, embora muitas espécies apresentem um único par de cromossomos nucleolares, este par se encontra em diferentes posições/localizações no cariótipo (Feldberg *et al.* 1992; Brassesco *et al.* 2004; Teribele *et al.* 2008; Venere *et al.* 2008; Sampaio *et al.* 2016; Pinheiro *et al.* 2016). Feldberg *et al.* (1992) identificaram este caráter (Ag-RON), em espécies dos gêneros *Curimata* (*Curimata cyprinoides* Linnaeus 1766, *C. inornata*, *C. knerii* Steindachner 1876, *C. ocellata*, *C. vittata*), *Curimatella* (*Curimatella*

alburna Muller & Troschel 1844, *Curimatella meyeri* Steindachner 1882), *Psectrogaster* (*Psectrogaster rutiloides* Kner 1858) e *Steindachnerina* (*Steindachnerina leucisca* Gunther 1868), evidenciando que as regiões organizadoras de nucléolos são espécie-específicas. Este padrão também foi observado por Brassesco *et al.* (2004), que encontraram apenas um par de cromossomos portadores de RON em oito espécies analisadas (*Curimatella dorsalis*, *Cyphocharax platanus*, *C. spilodus*, *C. voga*, *Potamorhina squamoralevis*, *Psectrogaster curviventris*, *Steindachnerina brevipinna*, *S. conspersa*), com posições espécie-específicas. Ainda, diferente do padrão de RONs simples descrito para a maioria dos curimatídeos, Venere *et al.* (2008) encontraram espécies com sistema múltiplo: *Cyphocharax naegelli* (4 pares + 1 cromossomo), *Curimata inornata* (1 par + 1 cromossomo), *Steindachnerina amazonica* (1 par + 1 cromossomo) e *Steindachnerina gracilis* Vari & Williams 1989 (2 pares) (Tabela 1).

Com relação à citogenética molecular, as sequências de DNA ribossômico 18S e 5S têm sido usadas como marcadores citogenéticos em peixes neotrópicos, por contribuírem em questões taxonômicas e evolutivas (Bellafronte *et al.* 2005; Terencio *et al.* 2012; Favarato *et al.* 2016; Sampaio *et al.* 2016; Pinheiro *et al.* 2016; Barros *et al.* 2017; Dorini *et al.* 2020). Contudo, poucos trabalhos foram realizados, utilizando marcadores fluorescentes, na família Curimatidae. Existem relatos apenas para as espécies *Cyphocharax modestus*, *C. saladensis*, *C. spilodus*, *C. voga*, *Potamorhina altamazonica*, *P. latior*, *P. pristigaster*, *Steindachnerina biornata*, *S. insculpta* (De Rosa *et al.* 2006; De Rosa *et al.* 2007; Teribele *et al.* 2008; Pinheiro *et al.* 2016; Sampaio *et al.* 2016). Em todas as espécies confirmou-se que as Ag-RONs são correspondentes com a localização do gene ribossomal 18S, cuja sequência foi mapeada por meio da técnica FISH. No entanto, Sampaio *et al.* (2016) observaram que a espécie *S. biornata* possui dois pares cromossômicos metacêntricos com sítios ribossômicos 18S, porém apenas um par de cromossomos foi marcado com nitrato de prata, sugerindo falta de atividade transcricional destes sítios. Também foi possível observar diferentes marcações para o DNAr 5S, mostrando sítios independentes em regiões pericentroméricas.

Outra classe de DNAs repetitivos que vem sendo amplamente utilizada para o mapeamento físico cromossômico, a fim de investigar a existência de rearranjos cromossômicos, é a sequência telomérica (TTAGGG)_n. Estas repetições curtas estão localizadas principalmente na região terminal dos cromossomos, promovendo estabilidade e integridade cromossômica (Multani *et al.* 2006; Monaghan 2010; Ocalewicz 2013). Contudo, sítios teloméricos intersticiais (ITS) já foram encontrados em aproximadamente 40% das espécies de peixes, e tal localização tem sido relacionada com rearranjos cromossômicos, envolvendo a região telomérica, tais como fusões, inversões, translocações e duplicações.

Ainda, regiões com ITS também podem contribuir para uma elevada taxa de fissões cromossômicas (Ocalewicz 2013).

Para a família Curimatidae, a espécie *Cyphocharax naegeli* (Oliveira 2010) possui um par cromossômico com ITS presente. Pinheiro *et al.* (2016), verificando prováveis alterações cromossômicas em espécies do gênero *Potamorhina*, observaram apenas sítios terminais em *P. altamazonica* ($2n=102$), mas observaram ITS em um par cromossômico de *P. pristigaster* ($2n=54$) e em 18 pares de *P. latior* ($2n=56$), sugerindo eventos de fissões, seguidos de fusões cromossômicas. Estes dados de *Potamorhina* contribuíram para a recente filogenia molecular proposta por Dorini *et al.* (2020), que propôs a ocorrência de uma única fissão na linhagem de *P. latior*, seguida por mais de 20 fissões no ancestral de *P. altamazonica* e *P. squamoralevis*.

Portanto, considerando a pequena quantidade de estudos citogenéticos com espécies de Curimatidae, haja vista a riqueza de espécies da família, principalmente no que tange a estudos de citogenética molecular, e o fato de ferramentas citogenéticas serem eficazes no reconhecimento da diversidade genética intra e interespecífica, este estudo objetiva contribuir para a caracterização cromossômica de mais seis espécies da família Curimatidae, por meio de uma abordagem citogenética convencional e molecular. Além de fornecer informações sobre marcadores importantes no entendimento da evolução cromossômica de um grupo de peixes neotropicais.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Contribuir para a caracterização cromossômica de mais seis espécies da família Curimatidae e fornecer informações sobre marcadores que sejam importantes no entendimento de sua evolução cromossômica.

2.2 Objetivos Específicos

- Descrever a macroestrutura cariotípica (número diploide, número fundamental e fórmula cariotípica) de espécies da família Curimatidae;
- Identificar região organizadora de nucléolo e padrão de distribuição da heterocromatina em espécies da família Curimatidae;
- Mapear sequências repetitivas de DNA ribossomal 18S e 5S e sequências teloméricas nos cromossomos de espécies da família Curimatidae;
- Verificar possíveis variações cariotípicas envolvidas na evolução cromossômica de espécies da família Curimatidae.

3. Material e Métodos

Para a realização deste estudo foram analisados, citogeneticamente, 52 exemplares de seis espécies pertencentes a três gêneros da família Curimatidae (Tabela 2 e Figuras 5 e 6).

Tabela 2 – Espécies, local de coleta e número de indivíduos/sexo analisados. M= macho, F= fêmea, ?= sexo não identificado.

Espécie	Sexo			Local	Coordenadas	Voucher
	M	F	?			
<i>Curimata inornata</i>	-	-	8	Rio Araguaia, PA	5°25'33.59"S 48°28'30.37"W	INPA-ICT 059622
<i>Curimata vittata</i>	-	2	-	Lago Catalão, AM	3°09'42.2"S 59°54'54.7"W	INPA-ICT 059623
<i>Curimatella dorsalis</i>	-	2	-	Rio Araguaia, PA	5°25'33.59"S 48°28'30.37"W	INPA-ICT 059624
<i>Curimatella meyeri</i>	4	13	-	Lago Catalão, AM	3°09'42.2"S 59°54'54.7"W	INPA-ICT 059625
<i>Psectrogaster falcata</i>	-	-	3	Rio Araguaia, PA	5°25'33.59"S 48°28'30.37"W	INPA-ICT 059626
<i>Psectrogaster rutiloides</i>	10	10	-	Lago Catalão, AM	3°09'42.2"S 59°54'54.7"W	INPA-ICT 059627

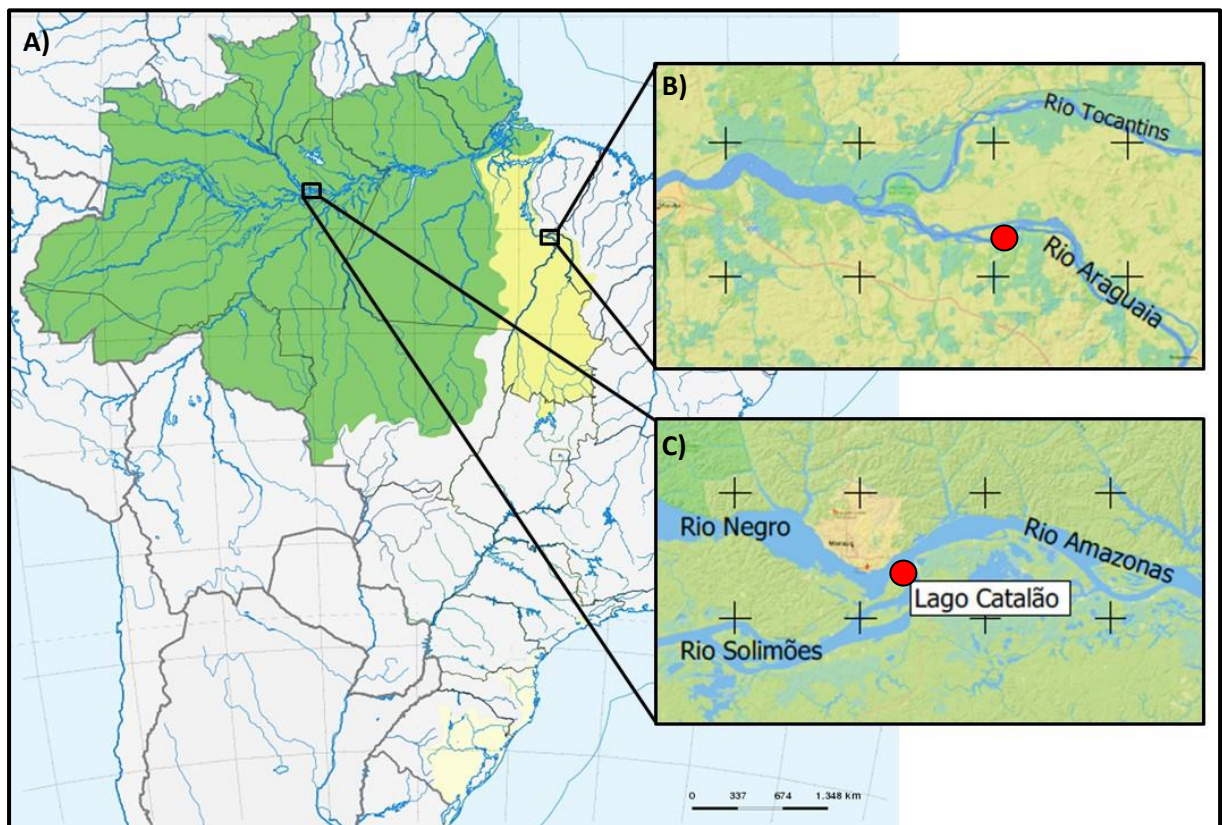


Figura 5. Mapa do Brasil: **A)** destacando a bacia amazônica brasileira, em verde, e a bacia do Tocantins-Araguaia, em amarelo. **B)** local de coleta no rio Araguaia/PA (ponto vermelho) e **C)** local de coleta no lago Catalão/AM (ponto vermelho). (Fonte: adaptado de wikipedia.org).

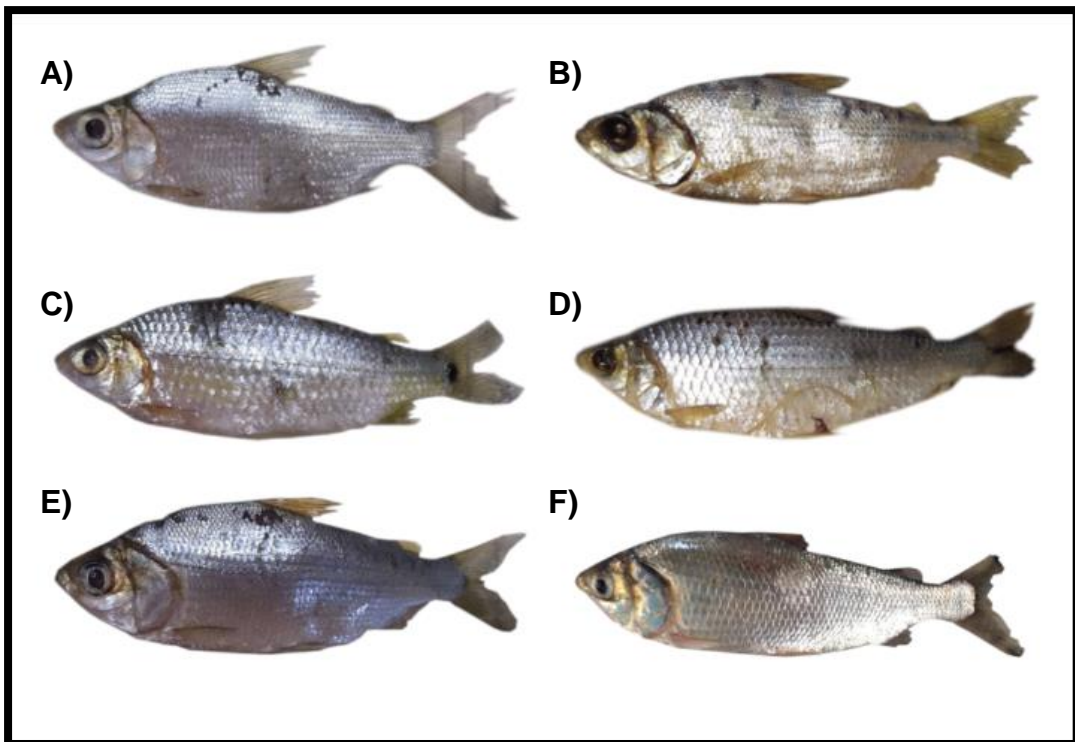


Figura 6. Espécies da família Curimatidae estudadas neste trabalho. **A)** *Curimata inornata* (16cm); **B)** *Curimata vittata* (24cm); **C)** *Curimatella dorsalis* (14cm); **D)** *Curimatella meyeri* (20cm); **E)** *Psectrogaster falcata* (12cm); **F)** *Psectrogaster rutiloides* (13cm).

A coleta foi realizada com o uso de redes de pesca de malhas 70, 80 e 90 mm, sob autorização do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio, Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO, Licença permanente no. 28095-1 e todos os procedimentos deste trabalho foram aprovados pela comissão de ética no uso de animais do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (004/2018-CEUA/INPA).

Os peixes foram transportados vivos, em recipientes com sistema de aeração, para o Laboratório, onde foi realizada a obtenção das suspensões celulares e de tecido muscular. Os animais foram eutanasiados, seguindo as recomendações das Diretrizes da Prática da Eutanásia do CONCEA 2013. Após a eutanásia, os exemplares aqui estudados foram numerados, registrados, fixados em formol 10% durante 24h e acondicionados posteriormente em recipientes contendo álcool 70% para o depósito na coleção ictiológica do INPA.

3.1 Indução de mitoses

Para a obtenção de um maior número de células em metáfase foi utilizada a técnica de indução de mitoses descrita por Oliveira *et al.* (1988b), onde foi preparada uma solução de fermento biológico na proporção de 0,5g de fermento, 0,5g de açúcar e 20 mL de água destilada. Em seguida, esta solução foi incubada em estufa a 40 °C por cerca de 20 minutos e, posteriormente, injetada na região intraperitoneal do animal vivo, na proporção de 1 mL para cada 100 g de peso. Os peixes foram mantidos em aquários aerados por um período de 24 horas antes da coleta das amostras para análise citogenética.

3.2 Obtenção de cromossomos mitóticos

As preparações para obtenção dos cromossomos mitóticos seguiram o protocolo descrito por Gold *et al.* (1990), que consiste em: 24 horas após a aplicação da solução de fermento, os peixes foram eutanasiados, procedendo-se a retirada do rim, que é o órgão hematopoiético dos peixes. O material foi transferido para uma cubeta de vidro contendo 15 mL de meio RPMI e o tecido foi dissociado com auxílio de uma seringa hipodérmica, desprovida de agulha, com movimentos leves de aspiração e expiração, onde foi obtida uma suspensão homogênea de células. Posteriormente, foram adicionadas 3 a 4 gotas (ou 150 µL para cada 2 mL de meio de cultura) de colchicina 0,125% e o material foi ressuspenso, cuidadosamente, com auxílio de uma pipeta Pasteur e incubado em estufa a 37 °C por 30 minutos.

Após esse período, o material foi transferido para um tubo de centrífuga e centrifugado por 10 minutos a 900 rpm; em seguida foi retirado o sobrenadante tomando cuidado para não ressuspenso o material e foi acrescentado 10 mL de solução de KCl 0,075M; o material foi ressuspenso novamente e deixado em estufa a 37 °C por 40 minutos. Em seguida, foi adicionado 1 mL de fixador carnoy gelado (3 metanol: 1 ácido acético) e uma nova centrifugação por 10 minutos a 900 rpm.

O sobrenadante foi retirado com auxílio de uma pipeta Pasteur, tomando cuidado para não ressuspenso o material, sendo acrescentados novamente 10 mL de fixador gelado. O material foi centrifugado por 10 minutos, sendo que este passo foi repetido mais duas vezes. Após a eliminação do sobrenadante da última centrifugação, foi adicionado 1,5 mL de fixador e o material foi transferido para um tubo de 2 mL e armazenado em freezer (-20 °C).

3.3 Coloração convencional (Giemsa)

Para determinação do cariótipo das espécies analisadas, as lâminas limpas foram aquecidas a 60 °C em banho-maria e em seguida a suspensão celular foi gotejada sobre a lâmina. Estas foram secas no ambiente e posteriormente foram coradas com Giemsa diluída a 10% em tampão fosfato, pH 6,8 por 10 minutos e secas ao ar novamente, sendo observadas ao microscópio óptico após secas.

3.4 Detecção das regiões de heterocromatina

Para a detecção da heterocromatina utilizamos a técnica de bandeamento C descrita por Sumner (1972), com modificações. As lâminas, já contendo as preparações cromossômicas, foram tratadas durante 2 minutos com ácido clorídrico (HCl 0,2N) a 42 °C, lavadas rapidamente em água destilada à temperatura ambiente e secas ao ar. Em seguida foram incubadas a 42 °C em solução de hidróxido de bário a 5% por cerca de 58 segundos. A ação do hidróxido de bário foi interrompida imergindo as lâminas rapidamente em solução de HCl 0,2N (em temperatura ambiente) e posteriormente lavadas em água destilada. Em seguida, foram secas novamente ao ar e incubadas em solução 2xSSC (cloreto de sódio 0,3M e citrato trissódico 0,03M, pH 6,8) em banho-maria a 60 °C, por um período de 15 minutos, sendo novamente lavadas em água destilada e secas ao ar. Posteriormente, as lâminas foram coradas de acordo com Lui *et al.* (2012), utilizando uma solução contendo 0,5 µL de iodeto de propídio em 20 µL de Vectashield®, coberta com uma lamínula e mantida em recipiente escuro por 20 minutos. Após a montagem as lâminas foram analisadas em microscópio de epifluorescência.

3.5 Regiões Organizadoras de Nucléolos (Ag-RON)

Para a caracterização das regiões organizadoras de nucléolos (RON) foi utilizada a técnica descrita por Howell e Black (1980). Esta técnica consiste em gotejar sobre a lâmina, contendo a preparação cromossômica, quatro gotas de uma solução coloidal, obtida com 1 g de gelatina comercial sem sabor dissolvida em 50 mL de água destilada, acrescida de 0,5 mL de ácido fórmico. Posteriormente, foi adicionado sobre a solução coloidal 8 gotas de solução aquosa de AgNO₃ (nitrato de prata) a 50%, sendo coberta com uma lamínula. As lâminas foram incubadas em câmara úmida e levadas à estufa a 60 °C por um período de 5 a 7 minutos até atingirem uma coloração dourada ou marrom escura e, posteriormente, as lâminas foram lavadas em água destilada até remoção da lamínula e deixadas secar diretamente ao ar.

3.6 Citogenética molecular

3.6.1 Extração de DNA total

O DNA genômico foi extraído a partir de tecido muscular das espécies de peixes da família Curimatidae, preservado em etanol 100%, utilizando o protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989).

O tecido foi fragmentado em pequenos pedaços em um tubo estéril do tipo Ependorff de 1,5 mL, em seguida foi utilizada uma solução de tampão de lise (Tris-HCl pH 8,0 em 10 mM, NaCl 0,3 M, EDTA 10 mM) para dissolvê-lo. Em seguida foi acrescentado: 15 µL de proteinase K (10 mg/mL) e 10 µL de RNase A (10 mg/mL). As amostras foram, então, incubadas a 60 °C em banho-seco por aproximadamente 2 horas até que o tecido estivesse totalmente digerido e, posteriormente, foram feitas lavagens sucessivas com fenol clorofórmio e clorofórmio hidratado (500 µL de cada um destes reagentes). Após a lise, o DNA foi separado das proteínas por precipitação salina juntamente com centrifugação a 14000 rpm, sendo adicionados em seguida 600 µL de Isopropanol 100% gelado para precipitação do sobrenadante, juntamente com mais uma etapa de centrifugação. Ao final, o DNA foi hidratado em 100 µL de água milli-Q, e, posteriormente, para possibilitar a análise da quantidade e integridade do material, foi realizada eletroforese com gel de agarose a 1% (com tampão Tris-Borato-EDTA 0,5X e corrida a 70 V por 60 minutos), corado com GelRed Acid Gel Stain Biotium (1:500). A visualização e análise do DNA no gel foram feitas no fotodocumentador *Easy Doc 100* (BioAgency). O DNA extraído também foi quantificado em espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare).

3.6.2 Preparação das sondas de DNA ribossômico (DNAr) 18S e 5S

As sondas 18S e 5S foram amplificadas por PCR (Polymerase Chain Reaction). Para a amplificação do DNAr 18S foram utilizados os *primers* 18Sf (5'-CCG CTT TGG TGA CTC TTG AT-3') e 18Sr (5'-CCG AGG ACC TCA CTA AAC CA-3') (Gross *et al.* 2010), e 5Sf (5'-TAC GCC CGA TCT CGT CCG ATC) e 5Sr (5' -CAGGCT GGT ATG GCC GTA AGC- 3') (Martins e Galetti Jr. 1999), respectivamente. As reações tiveram um volume final de 25 µL consistindo de 1 µL de DNA genômico (100 ng), 2,5 µL de tampão 10× com cloreto de magnésio (1,5 mM), 0,5 µL de Taq DNA Polimerase (5 U/µl), 1,5 µL de dNTP (1 mM), 1,5 µL de cada *primer* (5 mM) e água ultrapura para completar o volume.

O programa de PCR foi utilizado, seguindo as seguintes etapas: DNAr 18S: 1 minuto a 95 °C (para desnaturação da fita de DNA); 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 56 °C

(anelamento) e 1 minuto e 30 segundos a 72 °C (amplificação) e 5 minutos a 72 °C (extensão final). DNAr 5S: 1 minuto a 94 °C (desnaturação); 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 54 °C (anelamento) e 1 minuto e 30 segundos a 72 °C (amplificação) e 5 minutos a 72 °C (extensão final). Posteriormente, os produtos gerados foram verificados em gel de agarose 1% e quantificados em espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare).

3.6.3 Preparação da sonda telomérica

Para a detecção de sequências teloméricas foram utilizadas sondas amplificadas via PCR (Polymerase Chain Reaction), usando os *primers* (TTAGGG)₅ e (CCCTAA)₅ (Ijdo *et al.* 1991), seguindo os parâmetros: 1µL do *primer* F, 1µL do *primer* R, 12,5µL de Go Taq e 9,5µL de água destilada com um volume final de 24µL. O programa de PCR seguiu as seguintes condições: 1 minuto a 95 °C (desnaturação); 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 50 °C (anelamento) e 1 minuto e 30 segundos a 72 °C (amplificação) e 5 minutos a 72 °C (extensão final). Em seguida, o produto final da PCR foi verificado em eletroforese, e, também, quantificado em espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare).

3.6.4 Marcação de sondas

Todas as sondas produzidas foram marcadas. Sendo assim, os produtos de PCR (DNA ribossomal 18S e sequências teloméricas) foram marcados seguindo o método de *nick translation* com digoxigenina-11-dUTP (*Dig-Nick Translation mix*; Roche) para marcação de sonda vermelha, enquanto o DNA ribossomal 5S foi marcado com biotina-14-dATP (*Biotin Nick Translation mix*; Roche) para marcação de sonda verde, seguindo as instruções do fabricante.

3.6.5 Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

A técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) foi realizada de acordo com os procedimentos adotados por Pinkel *et al.* (1986), com algumas modificações.

As preparações cromossômicas foram gotejadas nas lâminas e secas ao ar. Para preparação das lâminas, foram lavadas em tampão PBS 1x durante 5 minutos em temperatura ambiente, sendo depois desidratadas em séries alcoólicas 70%, 85% e 100%, 5 minutos cada e secas ao ar. Em seguida as lâminas foram incubadas em 90 µL de RNase (0,4% RNase/2xSSC) a 37°C por 1h em câmara úmida. Após este processo, as lâminas foram lavadas três vezes em 2xSSC por 5 minutos cada e em PBS 1x também por 5 minutos.

Posteriormente, as lâminas foram fixadas em formaldeído 1% em PBS 10x/50mM MgCl₂ durante 10 minutos à temperatura ambiente e depois lavadas em PBS 1x por 5 minutos, sendo posteriormente desidratadas em série alcoólica gelada (70%, 85%, 100 %) por 5 minutos cada.

O DNA cromossômico (que está na lâmina) foi desnaturado com formamida 70% em 2xSSC a 70 °C por 5 minutos e desidratado em etanol gelado 70%, 85% e 100% por 5 minutos cada, secando ao ar. Simultaneamente à esta desidratação da lâmina em série alcoólica, foram adicionados em um tubo *ependorf* a solução de hibridização, que contém 50 µL de formamida 100% (concentração final 50%), 20 µL sulfato de dextrano 50%, 10 µL 20xSSC (concentração final de 2xSSC), 5 µL de cada sonda marcada e 10 µL água milli-Q, para ser desnaturada a 99 °C por um período de 10 minutos, e após este tempo foi passada imediatamente ao gelo.

Após o passo de desnaturação, a solução de hibridização foi colocada sobre a lâmina com os cromossomos também desnaturados, coberta com lamínula e incubada em câmara úmida a 37 °C por aproximadamente 18 horas (*overnight*).

Após o término do tempo de hibridização, as lâminas foram lavadas em formamida 15% a 42 °C durante 10 minutos e logo em seguida lavadas em solução Tween 0,5%, por 5 minutos.

Posteriormente, para detecção do sinal, as lâminas foram incubadas em tampão NFDM por 15 minutos e lavadas 2 vezes com Tween 0,5% temperatura ambiente por 5 minutos cada. Para amplificação do sinal, as lâminas foram incubadas com os anticorpos específicos (antidigoxigenina e/ou estreptavidina) por 60 minutos em câmara úmida a 37 °C. Após este tempo as lâminas foram lavadas 3 vezes com Tween 0,5% temperatura ambiente por 5 minutos cada, desidratadas em série alcoólica gelada 70%, 85% e 100% durante 5 minutos cada e após estarem secas, as lâminas foram montadas com 21µL de uma solução contendo 1µL de DAPI diluído em 20µL de Vectashield®, coberta com uma lamínula e mantida em recipiente escuro. Após a preparação, as lâminas foram analisadas em microscópio de epifluorescência.

3.7 Análise cariotípica

As lâminas submetidas à coloração convencional (Giemsa) foram analisadas em microscópio óptico com a objetiva de imersão, num aumento de 1.000 vezes. As lâminas que utilizaram fluorocromos (Bandeamento C e FISH) foram analisadas em fotomicroscópio de epifluorescência *Olympus Bx-51*, sob filtro apropriado. Pelo menos 30 metáfases por indivíduo foram analisadas, sendo que as melhores tiveram sua imagem capturada, utilizando sistema de captura de imagens DPController e processadas pelo programa DPManager. Posteriormente, os cariótipos foram montados, utilizando o programa Adobe Photoshop CS4, onde os

cromossomos metafásicos mitóticos foram recortados, emparelhados, medidos no programa *ImageJ* e colocados em ordem decrescente de tamanho, separados por grupos. A morfologia dos cromossomos foi determinada de acordo com a posição do centrômero segundo Levan *et al.* (1964) e classificados com base no índice de relação de braços (RB= comprimento do braço maior/comprimento do braço menor), podendo ser metacêntricos (RB= 1,0-1,7), submetacêntricos (RB= 1,71-3,0), subtelocêntricos (RB= 3,01-7,0) e acrocêntricos (RB > 7,00). Na determinação do número de braços (NF) foram considerados os cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos como tendo dois braços e os acrocêntricos como tendo apenas um braço.

4. Resultados

As seis espécies analisadas (*Curimata inornata*, *C. vittata*, *Curimatella dorsalis*, *C. meyeri*, *Psectrogaster falcata* e *P. rutiloides*) apresentaram número diploide igual a 54 cromossomos e número fundamental (NF) igual a 108 (Tabela 3, Figura 7), ou seja, todos os cromossomos apresentam dois braços (meta/submetacêntricos) (Tabela 3).

Tabela 3 – Dados citogenéticos das espécies aqui estudadas. 2n= número diploide; NF= número fundamental; Ag-RON= regiões organizadoras de nucléolo detectada por nitrato de Prata; DNAr= DNA ribossomal; m= metacêntrico; sm= submetacêntrico; p= braço curto; q= braço longo; t= terminal; i=intersticial.

Espécie	2n	NF	Fórmula Cariotípica	Ag-RON / Posição	DNAr 18S / Posição	DNAr 5S / Posição
<i>Curimata inornata</i>	54	108	38m + 16sm	20°sm/pt	20°sm/pt	9°m/pi
<i>Curimata vittata</i>	54	108	38m + 16sm	20°21°sm/qt	20°21°sm/qt	25°sm/pi
<i>Curimatella dorsalis</i>	54	108	44m + 10sm	2°m/qt	2°m/qt	2°m/qi
<i>Curimatella meyeri</i>	54	108	46m + 8sm	9°m/qt	7°m/pt 9°m/qt	26°sm/pi
<i>Psectrogaster falcata</i>	54	108	40m + 14sm	13°m/pt	13°m pt	24°sm/pi
<i>Psectrogaster rutiloides</i>	54	108	46m + 8sm	16°m/pt	16°m/pt	5°m/pt22°m/qi

A heterocromatina está em blocos peri/centroméricos de todos cromossomos das seis espécies analisadas por bandeamento C, exceto dois pares em *P. falcata* (5, 18). Alguns cromossomos apresentam blocos heterocromáticos espécie-específicos, e blocos adicionais nas porções terminais de alguns cromossomos também foram observados em todas as espécies, como descrito abaixo (Figura 7):

Curimata inornata: blocos biteloméricos presentes nos pares 1 e 9; blocos terminais no braço longo (q) nos pares: 6, 8, 10, 12, 20, 21, 22 e 25; o par 8 possui marcação conspícua no braço curto (p); e os pares 6 e 20 apresentam os braços curtos totalmente heterocromáticos.

Curimata vittata: blocos biteloméricos presentes nos pares: 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14 e 19; blocos terminais em p foram detectados nos pares 4, 15, 16 e 22; blocos terminais em q nos pares 13, 20, 21, e 24; já o par 12 apresenta o braço p totalmente heterocromático.

Curimatella dorsalis: blocos biteloméricos foram visualizados nos pares 8, 15 e 27; marcações terminais q nos pares 1, 2, 3, 6, 7, 9 e 10.

Curimatella meyeri: blocos biteloméricos foram encontrados nos pares 1, 4, 6, 7, 9, 16, 18, 19 e 24; marcações terminais p dos pares 3 e 10; marcações terminais q dos pares 2, 5, 13,

15 e 26; os pares 11 e 16 apresentaram os braços *p* totalmente heterocromáticos e o par 5 apresentou um bloco intersticial nos braços *q*.

Psectrogaster falcata: marcações biteloméricas encontradas nos pares 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 12, 13, 17, 18, 21, 23 e 25; marcações terminais *p* estão no par 7; marcações terminais nos braços *q* nos pares 8, 14 e 19; o par 3 apresentou os braços curtos totalmente heterocromáticos.

Psectrogaster rutiloides: blocos biteloméricos nos pares 1, 3, 4, 7, 10, 13 e 24; marcações terminais nos braços *q* dos pares 12 e 27; marcações terminais nos braços *p* dos pares 5 e 16; braços curtos totalmente heterocromáticos 13; bloco intersticial *q* no par 2, 19 e 21.

As regiões organizadoras de nucléolo, detectadas pela técnica de impregnação por nitrato de prata (Ag-RON), foram evidenciadas ativas em apenas um par cromossômico em cinco das seis espécies: *Curimata inornata*, *Psectrogaster falcata* e *P. rutiloides*, localizada na porção terminal dos braços *p*, nos pares 20, 13 e 16, respectivamente. Nas espécies *Curimatella dorsalis* e *C. meyeri* foram localizadas nas porções terminais dos braços *q*, nos pares 2 e 9, respectivamente. E *Curimata vittata* apresentou RONS múltiplas nos pares 20 e 21, na porção terminal dos braços *q*, todas concomitantes com heterocromatina (Figura 7, box Ag-RON).

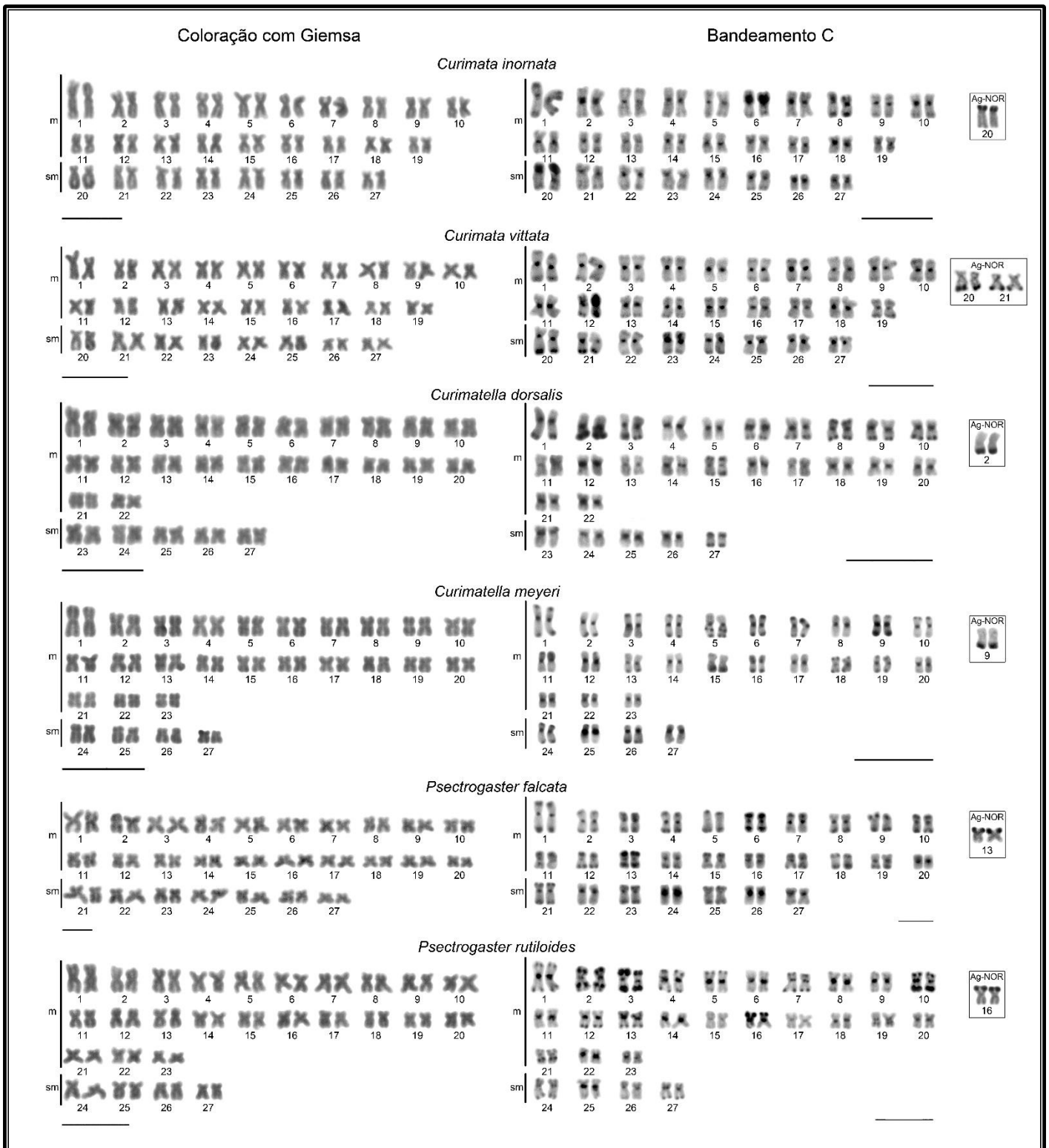


Figura 7. Cariótipos das espécies da família Curimatidae analisadas em coloração convencional Giemsa (à esquerda), bandeamento C (à direita) e regiões organizadoras de nucléolo (Ag-RON, box). Barra de escala = 10µm.

O mapeamento do DNA ribossomal 18S confirmou a localização das regiões organizadoras de nucléolo ativas nas seis espécies analisadas. Entretanto, em *Curimatella meyeri*, um sítio adicional foi evidenciado no par sete, na porção terminal do braço *p*, região também heterocromática (+C) (Figura 8, 18S).

O mapeamento do DNAr 5S evidenciou um par em todas as espécies, exceto *Psectrogaster rutiloides* que apresentou dois pares carreando este sítio (Figura 8, 5S). Entretanto, sua posição no cariótipo foi variável, ou seja, em *Curimata inornata*, intersticial no par 9; em *C. vittata* intersticial no par 25, em *Curimatella dorsalis* intersticial par 2, em sintonia com o 18S, em *C. meyeri* intersticial no par 26 e em *Psectrogaster falcata* intersticial no par 24. *Psectrogaster rutiloides* apresentou os sítios DNAr 5S na porção terminal do braço curto do par 5 e intersticial no par 22.

Sequências teloméricas (TTAGGG)_n foram localizadas na região terminal de todos os cromossomos das seis espécies. Nas duas espécies de *Curimata* não foram evidenciadas ITS (Figura 8, (TTAGGG)_n). Entretanto, ITSs foram evidenciadas em vários cromossomos das espécies de *Curimatella* e *Psectrogaster*, sendo que em alguns pares os blocos são conspícuos.

Curimatella dorsalis: Blocos de ITS pericentroméricas nos pares metacêntricos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 12, 13, 14, 15, 16 e 20, e submetacêntricos 23, 24, 25 e 26.

Curimatella meyeri: Blocos de ITS pericentroméricas nos pares metacêntricos 1, 4, 6, 7, 8, 9, 11, 13, 14, 20, 21 e 23, e submetacêntricos 24, 25 e 27.

Psectrogaster falcata: Blocos de ITS pericentroméricas nos pares metacêntricos 1, 2, 3, 4, 8, 13, 14, 15, 19 e 20, e submetacêntricos 21, 22, 24, 26 e 27.

Psectrogaster rutiloides: Blocos de ITS pericentroméricas nos pares metacêntricos 1, 2, 3, 5, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 16, 18, 19, 20, 21 e 22, e submetacêntricos 24 e 27.

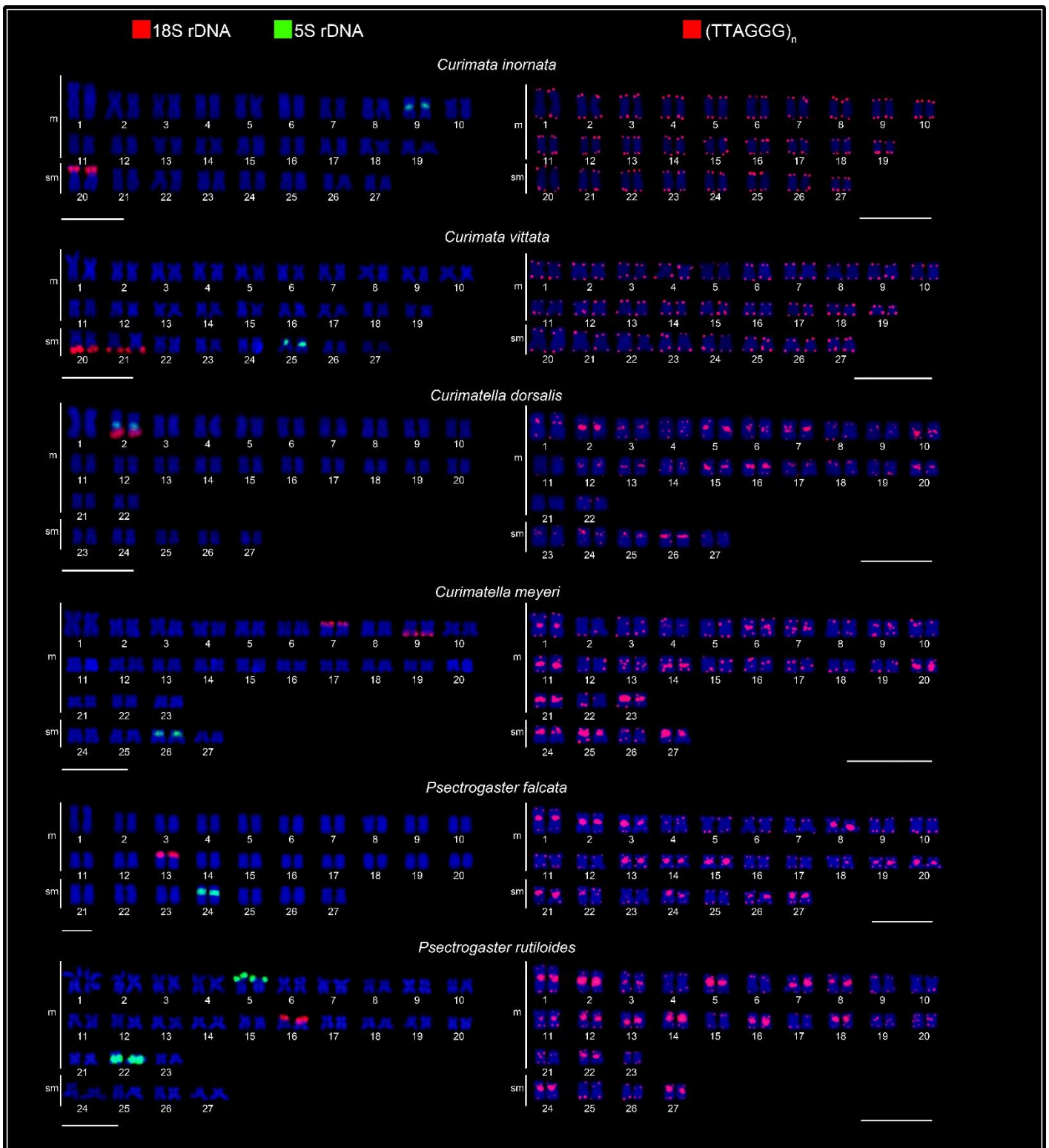


Figura 8. Cariótipos das espécies da família Curimatidae analisadas com marcadores cromossômicos moleculares. À esquerda: *Double FISH* com sondas de DNAr 18S (vermelho) e 5S (verde); À direita: sondas com sequências teloméricas (TTAGGG)_n (vermelho). Barra de escala = 10µm.

5. Discussão

A família Curimatidae apresenta macroestrutura cromossômica estável com número diploide de 54 cromossomos, dos tipos metacêntricos e submetacêntricos, com número fundamental igual a 108, diferenciando em suas fórmulas cariotípicas. As espécies do presente estudo também evidenciaram esta estabilidade quanto ao número diploide ($2n=54$) e cromossomos meta e submetacêntricos. Segundo Feldberg *et al.* (1992), estas características descrevem um cariótipo ancestral da família Curimatidae e variações desta condição podem ser consideradas caracteres derivados. Esse conservadorismo na macroestrutura cromossômica, encontrado na maioria das espécies da família Curimatidae, pode estar relacionado com sua ampla distribuição geográfica e formação de grandes cardumes de acordo com a hipótese proposta por Oliveira *et al.* (1988a) e De Oliveira *et al.* (2009). Para os autores, alguns grupos de peixes, caracterizados por alta mobilidade e por populações com grande número de indivíduos, tendem a apresentar padrões cromossômicos estáveis, enquanto que grupos com baixa mobilidade e baixa densidade populacional tendem a apresentar ampla variação cromossômica, ocasionando fixação de rearranjos cromossômicos diferenciais entre populações (Oliveira *et al.* 1988a; De Oliveira *et al.* 2009).

Curimatidae, embora apresente $2n=54$ como conservado para a família, rearranjos robertsonianos, dos tipos fusão e fissão, que alteram o número diploide, já foram encontrados em espécies de quatro gêneros. Com redução do número diploide relatado somente na espécie *Curimatopsis myersi* ($2n=46$) (Navarrete e Júlio Jr 1997), e aumento do número diploide encontrado nas espécies *Curimata ocellata* ($2n=56$) (Feldberg *et al.* 1992), *Cyphocharax platanus* ($2n=58$) (Brassesso *et al.* 2004; Venere *et al.* 2008), *Potamorhina altamazonica* ($2n=102$), *Potamorhina latior* ($2n=56$) (Feldberg *et al.* 1993; Pinheiro *et al.* 2016) e *Potamorhina squamoralevis* ($2n=102$) (Brassesso *et al.* 2004), sendo que todos os gêneros têm 54 cromossomos como diploide ancestral. A presença de números diploides diferentes que foram relatados nestas seis espécies de curimatídeos demonstram a dinâmica da evolução cromossômica neste grupo de peixes, contrastando com as espécies da superfamília Anostomoidea (Buckup 1998), onde todas as espécies das famílias Chilodontidae, Prochilodontidae e Anostomidae, que possuem dados cariotípicos disponíveis na literatura, apresentam número diploide igual a 54 cromossomos (Porto *et al.* 1992; Martins *et al.* 2000; Terencio *et al.* 2012; Dulz *et al.* 2020).

Também é possível evidenciar, que mesmo os curimatídeos com número diploide conservado, a diferenciação cromossômica encontrada nas fórmulas cariotípicas (FC) entre eles parece envolver alterações na microestrutura do cariótipo, com rearranjos estruturais não-

robertsonianos, sem causar alterações no número diploide (Guerra 1988). Ao compararmos os dados do presente trabalho com os dados relatados na literatura constatamos diferenças entre as FC (Feldberg *et al.* 1992; Navarrete e Júlio Jr 1997; Brassesco *et al.* 2004; Venere *et al.* 2008), onde foi possível observar redução de cromossomos metacêntricos nas espécies *C. inornata*, *C. vittata*, *C. dorsalis* e aumento de cromossomos metacêntricos em *P. rutiloides* (tabela 1). Estas diferenças podem estar relacionadas com a ocorrência de rearranjos não-robertsonianos, principalmente dos tipos inversões, translocações, deleções e, ainda, reposicionamento do centrômero, alterando a morfologia cromossômica (Rocchi *et al.* 2012). No entanto, diferenças não foram encontradas na fórmula cariotípica descrita para a espécie *C. meyeri* (Feldberg *et al.* 1992; presente estudo).

O padrão da heterocromatina para as seis espécies aqui representadas foram descritos, anteriormente na literatura, somente nas espécies *C. inornata* (Venere *et al.* 2008) e *C. dorsalis* (Navarrete e Júlio Jr. 1997; Brassesco *et al.* 2004), e de uma forma geral segue o padrão descrito para os demais curimatídeos, com blocos pericentroméricos e marcações adicionais em regiões terminais, intersticiais e alguns cromossomos com braços inteiros heterocromatinizados, além de grandes blocos heterocromáticos coincidentes com as regiões organizadoras de nucléolo (RON) em todas as espécies já analisadas com este marcador (Feldberg *et al.* 1992; Navarrete e Júlio Jr 1997; Carvalho *et al.* 2001; Fenocchio *et al.* 2003; Brassesco *et al.* 2004; Venere *et al.* 2008; Pinheiro *et al.* 2016).

Um fato observado, é que o padrão de heterocromatina encontrado nas espécies dos três gêneros aqui representados, bem como nos trabalhos anteriores na família Curimatidae (Navarrete e Júlio Jr 1997; Venere *et al.* 2008; Sampaio *et al.* 2016), evidenciam características cromossômicas únicas, onde cada espécie apresenta um padrão diferente. E ao compararmos o padrão heterocromático destas espécies com a filogenia molecular proposta para os curimatídeos (Melo *et al.* 2018, Figura 4), é possível sugerir que ocorre um aumento de heterocromatina no processo evolutivo, em cada gênero desta família. Por exemplo, no gênero *Curimata*, apesar do padrão de banda C ser semelhante entre as espécies, nota-se variação na quantidade de heterocromatina, onde pudemos evidenciar 1 par cromossômico com braços curtos totalmente heterocromáticos na espécie basal *C. vittata*, enquanto que em *C. inornata*, de clado derivado na filogenia (Melo *et al.* 2018, Figura 4), apresenta 2 pares cromossômicos com braços curtos heterocromáticos. Tal evidência também é observada no gênero *Psectrogaster*, que apesar de ambas espécies possuírem blocos mais conspícuos de heterocromatina, o clado que primeiro divergiu (*P. falcata*) apresenta menor quantidade de heterocromatina em comparação com a espécie de clado derivado *P. rutiloides*, que evidencia

maior heterocromatinização. Ainda, *Curimatella*, com ambas espécies em ramos próximos na filogenia proposta por Melo *et al.* (2018) (Figura 4), o padrão de banda C é muito semelhante, mas *C. meyeri* tem uma marcação intersticial no par 5. Com isso, apesar destas espécies apresentarem macroestrutura cromossômica semelhante, rearranjos não-robertsonianos estão envolvidos na diversificação do padrão de heterocromatina, refletindo a variabilidade intra e interespecífica que ocorre na família Curimatidae.

A presença de rearranjos cromossômicos na evolução dos curimatídeos também é verificada pela localização das regiões organizadoras de nucléolos (RON), que apresenta ampla variação interespecífica. A maioria das espécies, até agora analisadas, apresentam Ag-RON em um único par de cromossomos (RON simples), com diferenças na localização cromossômica e posição no cariótipo entre as espécies (Feldberg *et al.* 1992; 1993; Navarrete e Júlio Jr 1997; Brassesco *et al.* 2004; presente estudo), sendo RON simples considerada uma característica plesiomórfica em peixes neotropicais. No entanto, RONs múltiplas também já foram relatadas em alguns curimatídeos (Venere *et al.* 2008; presente trabalho), como consequência de rearranjos subsequentes, levando ao surgimento deste caráter derivado (Hsu *et al.* 1975). Além disso, algumas marcações encontradas no presente estudo contrapõem dados anteriormente descritos na literatura, indicando um polimorfismo em relação à localização do DNAr 45S, indicando que o processo evolutivo em curimatídeos vem acompanhado por alterações nestes DNAs repetitivos.

Em *C. inornata*, coletadas no baixo rio Araguaia (Pará) (presente estudo) encontramos RON simples nos braços curtos de um par submetacêntrico, como evidenciado também por Feldberg *et al.* (1992) em indivíduos do lago Catalão (Amazonas), no entanto Venere *et al.* (2008) ao estudar populações do alto rio Araguaia (Barra do Garça, MT) encontraram RONs múltiplas nos braços longos de um par metacêntrico e um par submetacêntrico para a mesma espécie. Ou seja, indivíduos coletados em regiões diferentes do mesmo sistema hidrográfico (Rio Araguaia) apresentam divergências na localização da Ag-RON. Diferenças também foram encontradas na espécie *C. vittata*, coletada no lago Catalão (Amazonas), onde no presente estudo foi evidenciada RON múltipla, enquanto Feldberg *et al.* (1992) encontraram RON simples evidenciada somente em um dos homólogos, para indivíduos da mesma localidade. Estas variações no número de RONs detectadas em espécies de *Curimata* nos leva a sugerir diferenças na atividade transcricional dos cístrons de DNAr 45S que, dependendo da atividade proteica da célula, permite a ativação de mais de um par de cromossomos, uma vez que Ag-RON evidencia apenas sítios que estavam ativos na intérfase anterior (Hsu *et al.* 1975; Miller *et al.* 1976).

Variações também foram evidenciadas nas espécies *Curimatella dorsalis* e *C. meyeri*, que apresentaram RON simples nos braços longos de cromossomos metacêntricos (par 2 e par 9, respectivamente) no presente estudo, corroborando Brassesco *et al.* (2004) e Feldberg *et al.* (1992). Entretanto, Navarrete e Júlio Jr (1997) encontraram para *C. dorsalis* a Ag-RON no par metacêntrico 13 localizada em braços curtos. E, em *Psectrogaster rutiloides* foi observada uma variação na localização da Ag-RON, que foi evidente nos braços curtos dos indivíduos do presente estudo, enquanto Feldberg *et al.* (1992) encontraram marcações nos braços longos desta espécie. Vários autores relatam que a relação entre Ag-RON e grandes blocos de heterocromatina, que é uma característica encontrada em todas as espécies de curimatídeos analisadas até o momento, exceto *Potamorhina pristigaster* (Pinheiro *et al.* 2016), pode facilitar a ocorrência de rearranjos cromossômicos, envolvendo esse DNA ribossômico, ocasionando diversificação cariotípica nas espécies (Moreira-Filho *et al.* 1984; Galetti *et al.* 1994; Schneider *et al.* 2013; Pinheiro *et al.* 2016).

A localização da sequência do DNAr 18S foi correspondente com a marcação indireta Ag-RON em todas as espécies analisadas neste estudo, no entanto em *Curimatella meyeri* foi evidenciado um sítio adicional em região terminal no braço curto do par nº 7, que não foi detectado pelo nitrato de prata. Na família Curimatidae, tal evidência também já foi relatada na espécie *Steindachnerina biornata* (Sampaio *et al.* 2016). O fato deste sítio não ter sido detectado na Ag-RON pode ser atribuído à ausência de atividade transcricional (Vidal *et al.* 2017) e, dependendo da atividade da célula o número de marcações pode ser variável. Além disso, devido este sítio ribossomal estar localizado em região telomérica e coincidente com heterocromatina há uma maior facilidade de transferência de material genético por sua proximidade no núcleo interfásico, segundo o modelo de Rabl (Schweizer e Loidl 1987). A localização do DNAr 18S em posição terminal é uma característica de 16 espécies de curimatídeos até o momento (Oliveira 2010; Pinheiro *et al.* 2016; Sampaio *et al.* 2016), sendo que variação deste padrão é encontrada apenas em *Cyphocharax spilatus*, uma linhagem derivada, com marcação em região cromossômica intersticial, sugerindo a ocorrência de rearranjos dos tipos translocações ou inversões, mudando a localização deste gene ribossomal, (Sampaio *et al.* 2016).

Com relação ao DNAr 5S, este foi mapeado em 16 espécies de curimatídeos e destas 14 apresentam cístrons em posição intersticial, em um único par de cromossomos (De Rosa *et al.* 2006; Oliveira 2010; Pinheiro *et al.* 2016; Sampaio *et al.* 2016; presente estudo). Esta localização em um par de cromossomos é conservada em muitos grupos de peixes, sendo relatada de forma predominante em Characiformes, podendo representar uma condição

ancestral e conferir alguma vantagem para proteção deste gene no genoma das espécies (Martins e Galetti Jr 2001; Martins e Wasko 2004; Cioffi e Bertollo 2012). Apesar disso, variação deste padrão em curimatídeos já foi relatada em *Potamorhina latior*, *P. pristigaster*, que apresentaram cístrons 5S localizados em porção terminal dos cromossomos (Pinheiro *et al.* 2016). E, no presente estudo, em *Psectrogaster rutiloides* foi evidenciado sítios múltiplos em dois pares cromossômicos, sendo um em posição terminal e outro em posição intersticial, evidenciando a ocorrência de rearranjos não-robertsonianos, como translocações e inversões. A presença de sítio ribossomal 5S em regiões terminais e/ou sítios múltiplos pode ser considerado um caráter derivado e homoplástico em curimatídeos (Oliveira 2010; Sampaio *et al.* 2016; Pinheiro *et al.* 2016; presente estudo). Condições semelhantes também são relatadas em várias espécies da superfamília Anostomoidea (Anostomidae, Chilodontidae, Prochilodontidae e Curimatidae) (Martins e Galetti Jr 1999 e 2000; Hatanaka e Galetti Jr 2004; Dulz *et al.* 2019 e 2020).

A análise dos DNAr 18S e 5S, por *double-FISH*, no presente estudo, mostrou os primeiros resultados para espécies de *Curimata*, *Curimatella* e *Psectrogaster* e evidenciamos que estes DNAs repetitivos estão em pares cromossômicos diferentes nestas espécies, com exceção de *Curimatella dorsalis*. Tal característica é relatada nas espécies de curimatídeos estudadas até o momento, sugerindo que seja um caráter plesiomórfico nesta família (Oliveira 2010; Sampaio *et al.* 2016; Pinheiro *et al.* 2016; presente estudo), sendo também relatado para várias espécies de peixes de água doce (p. ex.: Martins e Galetti Jr. 2001; Cioffi e Bertollo 2012; Marajó *et al.* 2018; Quadros *et al.* 2020; Campos *et al.* 2020). O fato de estarem em pares cromossômicos diferentes é tido como uma vantagem evolutiva, pois evita a ocorrência de possíveis rearranjos desvantajosos entre as regiões de DNAs ribossômicos, além de evitar quebras cromossômicas que seriam facilitadas pela sintenia destas regiões (Martins e Galetti Jr. 1999; 2001; Martins 2007).

Entretanto, em *Curimatella dorsalis* evidenciamos o primeiro relato de sintenia entre 18S e 5S na família Curimatidae, mapeados no 2º par cromossômico, sendo o DNAr 18S localizado na porção terminal do braço longo, enquanto que o 5S está localizado em região intersticial do mesmo braço. Este caráter derivado pode ter surgido de forma independente em *C. dorsalis* e estes genes podem ter sido carregados por rearranjos cromossômicos, como translocações e/ou por elementos de transposição (Symonová *et al.* 2013; Barros *et al.* 2017).

A sintenia de 18S e 5S é uma característica atípica em peixes, sendo que na superfamília Anostomoidea (Anostomidae, Chilodontidae, Prochilodontidae e Curimatidae) foi relatada somente em linhagens derivadas, em três espécies da família Anostomidae (De Barros *et al.*

2017; Dulz *et al.* 2019), seis espécies da família Prochilodontidae (Martins e Galetti Jr 1999; Jesus e Moreira-Filho 2003; Hatanaka e Galetti Jr 2004; Vicari *et al.* 2006; Terencio *et al.* 2012; Voltolin *et al.* 2013) e, agora, em uma única espécie de Curimatidae (presente estudo). E em outras famílias de Characiformes, sintenia entre 18S e 5S foram identificadas em espécies de Characidae (Mantovani *et al.* 2005; Castro *et al.* 2014), Erythrinidae (Cioffi *et al.* 2009; Martins *et al.* 2013), Serrasalmidae (Favarato 2019) e Triportheidae (Diniz *et al.* 2009). Este fato evidencia alto nível de mudanças cromossômicas envolvendo os sítios de 18S e 5S de forma independente nos táxons, corroborando com a hipótese de que os DNAs ribossomais geralmente sofrem muitos rearranjos (Symonová *et al.* 2013).

Outro marcador, utilizado no presente estudo, que revelou alta variação cariotípica na família Curimatidae, foi o mapeamento cromossômico de sequências teloméricas (TTAGGG)_n. Conhecidos como telômeros, são sequências geralmente localizadas nas extremidades do cromossomos, compostos de DNA altamente repetitivo *in tandem*, que possuem extrema importância para a estabilidade e integridade cromossômica (Nanda *et al.* 2002; Multani *et al.* 2006; Monaghan 2010), além de serem sequências amplamente conservadas no genoma dos vertebrados (Meyne *et al.* 1990; Guerra 2004).

No presente estudo foi realizado o primeiro mapeamento físico cromossômico destes DNAs repetitivos em espécies de *Curimata*, *Curimatella* e *Psectrogaster*, e estas sequências foram observadas nas extremidades de todos os cromossomos das seis espécies analisadas. Nas espécies do gênero *Curimata* (*C. inornata* e *C. vittata*) sinais teloméricos foram evidentes apenas nas extremidades dos cromossomos, sem nenhuma marcação adicional, e este padrão é o esperado (p. ex. Yano *et al.* 2014; Pucci *et al.* 2016; Sousa *et al.* 2017). No entanto, as espécies de *Curimatella* e *Psectrogaster* (*Curimatella dorsalis*, *C. meyeri*, *Psectrogaster falcata* e *P. rutiloides*) apresentaram blocos conspícuos de sequências teloméricas localizados em região pericentromérica de vários pares cromossômicos.

A localização de sequências teloméricas (TTAGGG)_n em regiões não terminais, conhecidas como sequências teloméricas intersticiais (ITS), já foram encontradas em várias espécies de vertebrados (Wells *et al.* 1990; Ruiz-Herrera *et al.* 2008; Ocalewicz 2013; Bolzán 2017) e podem nos fornecer uma visão sobre a diversificação cariotípica das espécies, pela presença de rearranjos cromossômicos, tais como fusões, inversões e translocações (Meyne *et al.* 1990) ou que sequências de DNA telomérico foram inseridas durante o mecanismo de reparo de quebra de fita dupla do DNA (Azzalin *et al.* 2001).

Na família Curimatidae, o primeiro relato de ITS foi em dois pares metacêntricos de *Cyphocharax naegelli* (2n=54) (Oliveira 2010), que foram relacionados com possíveis eventos

de fissão cromossômica, sendo corroborada pela hipótese proposta por Venere *et al.* (2008). Os autores relatam, que blocos conspícuos de heterocromatina foram encontrados no par 2 da maioria das espécies de *Cyphocharax* ($2n=54$), inclusive em *C. naegelli*, no entanto, tal evidência estava ausente no claro irmão, *Cyphocharax platanus* ($2n=58$), e que o aumento do número diploide encontrado nesta espécie pode ser resultado da ruptura cromossômica viabilizada por estes blocos heterocromáticos e ITS (Venere *et al.* 2008; Oliveira 2010).

As ITSs evidenciadas em espécies de *Potamorhina* (Pinheiro *et al.* 2016) também estão relacionadas com possíveis eventos de fissão cêntrica. Um único par (metacêntrico) com ITS foi encontrado em *P. pristigaster* ($2n=54$), seguido de 18 pares cromossômicos com blocos conspícuos de ITS pericentroméricas encontradas na espécie *P. latior* ($2n=56$), que provavelmente deram origem à múltiplas fissões cêntricas, encontradas nas espécies derivadas *P. altamazonica* ($2n=102$) e *P. squamoralevis* ($2n=102$), como sugerido na filogenia molecular proposta por Dorini *et al.* (2020).

Estes relatos corroboram a hipótese de que sequências teloméricas intersticiais, as vezes se co-localizam com locais de ruptura cromossômica, evidenciando “pontos-quentes” para ocorrência de recombinação, desempenhando um papel significativo na instabilidade do genoma e na evolução cromossômica destas espécies (Ashley e Ward 1993; Ruiz-Herrera *et al.* 2008; Ocalewicz 2013; Bolzán 2017).

Geralmente, em vertebrados, podem ser identificados dois tipos de ITS: curtas (s-ITS, visto com sinais fluorescentes fracos) e heterocromáticas (het-ITS, visto com sinais fortes fluorescentes, relacionados com heterocromatina) (Bolzán 2017). Aqui, consideramos as ITS encontradas em espécies de *Curimatella* e *Psectrogaster* como Het-ITS, tendo em vista que coincidem com grandes blocos heterocromáticos.

Muitos autores relacionam o surgimento de Het-ITS com eventos de fusões de cromossomos ancestrais (Meyne *et al.* 1990; Ruíz-Herrera *et al.* 2008), no entanto, tais fusões robertsonianas geralmente são acompanhadas de variação na macroestrutura cariotípica, evidenciando redução no número diploide (p. ex.: Rosa *et al.* 2012; Schneider *et al.* 2013; Favarato *et al.* 2016), porém, as espécies aqui analisadas apresentam número diploide conservado de 54 cromossomos, e considerando que este diploide também é compartilhado por espécies da superfamília Anostomoidea, é provável que as ITSs encontradas nas espécies de curimatídeos não representem resquícios de telômeros ancestrais, como também já foi relatado em outros grupos de vertebrados (Pagnozzi *et al.* 2000 e 2002; Nanda *et al.* 2008; Schneider *et al.* 2013; Scacchetti *et al.* 2015; Viana *et al.* 2020).

O surgimento de Het-ITS na família Curimatidae pode estar relacionado com outros mecanismos, como por exemplo: (1) ocorrência de inversões pericêntricas, com a inserção de ITSs curtas (s-ITS), seguido de várias ampliações destas regiões e posterior heterocromatinização (Meyne *et al.* 1990; Paço *et al.* 2012); (2) por transposições, intermediadas por elementos transponíveis (TEs), que são inseridos internamente nos cromossomos e passam por processos de amplificação (Garrido-Ramos *et al.* 1998). Como encontrado no gênero *Potamorhina* (Pinheiro *et al.* 2016), onde elementos transponíveis foram evidenciados em regiões pericentroméricas e relacionados com heterocromatina em *P. latior*; (3) inserção de sequências (TTAGGG)_n por mecanismo de reparo de fita dupla, com ou sem ação da telomerase, podendo resultar em s-ITS, seguido de amplificação e heterocromatinização destas sequências, levando a grandes blocos heterocromáticos (Ruíz-Herrera *et al.* 2008).

Independente do mecanismo que tenha dado origem às Het-ITSs encontradas na família Curimatidae, tais sequências constituem parte da diversificação cariotípica deste grupo de peixes. E segundo a literatura, Het-ITS estão envolvidas em vários rearranjos estruturais, incluindo quebras cromossômicas, podendo levar ao desenvolvimento de novos cariótipos e novas espécies, favorecendo a evolução cromossômica (Bolzán *et al.* 2017). E, de forma geral, as espécies da família Curimatidae apresentam uma macroestrutura cariotípica conservada em relação ao número diploide, entretanto, quando marcadores citogenéticos são aplicados é possível evidenciar altos níveis de polimorfismo na microestrutura cromossômica, principalmente envolvendo DNAs ribossomais e repetitivos (distribuição da heterocromatina, RON, DNAr 18S, DNAr 5S e sequências teloméricas).

6. Conclusões

A caracterização citogenética molecular de mais seis espécies de Curimatidae permitiram algumas considerações:

- As seis espécies de curimatídeos estudadas sugerem uma tendência à conservação da macroestrutura cariotípica, envolvendo o número diploide ($2n = 54$) e cromossomos dos tipos meta e submetacêntricos, entretanto as fórmulas cariotípicas diferenciadas permitem sugerir que os principais mecanismos evolutivos ocorreram por meio de rearranjos não robertsonianos, dos tipos duplicações, inversões e/ou translocações.
- A análise do padrão da distribuição de heterocromatina sugere que a diversificação cromossômica encontrada nesta família tem origem recente mantendo um padrão semelhante entre as espécies, entretanto foi possível evidenciar que espécies de clados

derivados apresentam uma heterocromatinização, mostrando-se um bom marcador para diferenciar os táxons.

- A região organizadora de nucléolo (Ag-RON), bem como o mapeamento do DNAr 18S, apresentam alto polimorfismo cromossômico, demonstrando variações tanto entre espécies, como entre populações. O que sugere altas taxas de rearranjos cariotípicos, envolvendo estas regiões em linhagens evolutivas.
- A localização cromossômica do gene ribossomal 5S também diferencia os curimatídeos, com pares cromossômicos espécie-específicos, em consequência de rearranjos não-robertsonianos.
- ITS heterocromáticas conspícuas, associadas à heterocromatina pericentromérica, encontradas em vários cromossomos das espécies de *Curimatella* e *Psectrogaster*, levantam hipóteses de vários mecanismos responsáveis pela origem destas Het-ITS, evidenciando diversificação cariotípica, envolvendo estes DNAs repetitivos. Além da possibilidade de causar instabilidade no genoma, favorecendo a evolução cromossômica.
- Estes resultados permitem inferir que a evolução cromossômica desta família vem sendo acompanhada por muitos rearranjos não-robertsonianos, levando à diversificação deste grupo de peixes.

7. Referências Bibliográficas

- Abell, R.; Thieme, M.L.; Revenga, C.; Bryer, M.; Kottelat, M.; Bogutskaya, N.; Coas, B.; Mandrak, N.; Balderas, S.C.; Bussing, W.; Stiassny, M.L.J.; Skelton, P.; Allen, G.R.; Unmack, P.; Naseka, A.; NG, R.; Sindorf, N.; Robertson, J.; Armijo, E.; Higgins, J.V.; Heibel, T.J.; Wikramanayake, E.; Olson, D.; López, H.L.; Reis, R.E.; Lundberg, J.G.; Pérez, M.H.S.; Petry, P. 2008. Freshwater ecoregions of the world: A new map of biogeographic units for freshwater biodiversity conservation. *BioScience* 58(4): 403-414.
- Albert, J.S.; Reis, R. 2011. Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes. Univ of California Press, California, 409 p.
- Albert, J.S.; Tagliacollo, V.A.; Dagosta, F. 2020. Diversification of Neotropical freshwater fishes. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 51: 27.
- Antonelli, A.; Ariza, M.; Albert, J.; Andermann, T.; Azevedo, J.; Bacon, C.; Faurby, S.; Guedes, T.; Hoorn, C.; Lohmann, L.G.; Matos-Maraví, P. 2018a. Conceptual and empirical advances in Neotropical biodiversity research. *Peer Journal* 4(6): e5644.
- Antonelli A.; Zizka, A.; Carvalho, F.A.; Scharn, R.; Bacon, C.D.; Silvestro, D.; Condamine, F.L. 2018b. Amazonia is the primary source of Neotropical biodiversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115(23): 6034-9.
- Ashley, T.; Ward, D.C. 1993. A ‘hot spot’ of recombination coincides with an interstitial telomeric sequences in Armenian hamster. *Cytogenetics and Cell Genetics* 62: 169–171.
- Azzalin, C.M.; Nergadze, S.G.; Giulotto, E. 2001. Human intrachromosomal telomeric-like repeats: sequence organization and mechanisms of origin. *Chromosoma* 110(2): 75-82.
- Barbieri, G. 1995. Biologia populacional de *Cyphocharax modesta* (Hensel, 1869) (Characiformes, Curimatidae) da represa do Lobo (Estado de São Paulo) II. Dinâmica da reprodução e influência de fatores abióticos. *Boletim do Instituto de Pesca* 22: 57-62.
- Barros, A.V.; Wolski, M.A.V.; Nogaroto, V.; Almeida, M.C.; Moreira-Filho, O.; Vicari, M.R. 2017. Fragile sites, dysfunctional telomere and chromosome fusions: What is 5S rDNA role? *Gene* 608: 20–27.
- Bellafronte, E.; Margarido, V.P.; Moreira-Filho, O. 2005. Cytotaxonomy of *Parodon nasus* and *Parodon tortuosus* (Pisces: Characiformes). A case of synonymy confirmed by cytogenetics analyses. *Genetics and Molecular Biology* 28(4): 710-716.

- Betancur-R, R.; Arcila, D.; Vari, R.P.; Hughes, L.C.; Oliveira, C.; Sabaj, M.H.; Ortí, G. 2018. Phylogenomic incongruence, hypothesis testing, and taxonomic sampling: The monophyly of characiform fishes. *Evolution* 73(2): 329-345.
- Bolzán, A.D. 2017. Interstitial telomeric sequences in vertebrate chromosomes: Origin, function, instability and evolution. *Mutation research/Reviews in mutation research* 773: 51-65.
- Boulenger, G.A. 1904. Fishes (Systematic Account of the Teleostei). In: Harmer S.F.; Shipley A.E. (editors). *The Cambridge Natural History*. p. 475-727. London: Macmillan and Co. Ltd.
- Bowen, S. H. 1983. Detritivory in neotropical fish communities. *Environmental Biology of Fishes* 9(2): 137-144.
- Brassescio, M.S.; Pastori, M.C.; Roncati, H.A., Fenocchio, A.S. 2004. Comparative cytogenetic studies of Curimatidae (Pisces, Characiformes) from the middle Paraná River (Argentina). *Genetics and Molecular Research* 3(2): 293-301.
- Buckup, P.A. 1998. Relationships of the Characidiinae and phylogeny of characiform fishes (Teleostei, Ostariophysi). Pp. 123-143. In: Malabarba, L.R.; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena, Z.M.S.; & Lucena, C.A.S. (Eds.). *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*. Porto Alegre, Edipucrs, 603p.
- Campos, A.S.; Favarato, R.M.; Feldberg, E. 2020. Interspecific cytogenetic relationships in three *Acestrohynchus* species (Acestrohynchinae, Characiformes) reveal the existence of possible cryptic species. *Comparative Cytogenetics* 14: 27-42.
- Carvalho, M.L.; Oliveira, C.; Foresti, F. 2001. Cytogenetic analysis of three species of the families Characidae and Curimatidae (Teleostei, Characiformes) from the Acre River. *Chromosome Science* 5(2): 91-96.
- Castro, R.M.C.; Arcifa, M.S. 1987. Comunidades de peixes de reservatórios no sul do Brasil. *Revista Brasileira de Biologia* 47: 493-500.
- Castro, J.P.; Moura, M.O.; Moreira-Filho, O.; Shibatta, O.A.; Santos, M.H.; Nogaroto, V.; Vicari, M.R.; de Almeida, M.C.; Artoni, R.F. 2014. Evidence of incipient speciation in *Astyanax scabripinnis* species complex (Teleostei: Characidae). *Neotropical Ichthyology* 12(2): 429-438.
- Cioffi, M.B.; Martins, C.; Centofante, L.; Jacobina, U.; Bertollo L.A.C. 2009. Chromosomal variability among allopatric populations of Erythrinidae fish *Hoplias malabaricus*: mapping of three classes of repetitive DNAs. *Cytogenetic and Genome Research* (125): 132-141.

- Cioffi, M.B.; Bertollo, L.A.C. 2012. Chromosomal distribution and evolution of repetitive DNAs in fish. In: Garrido-Ramos, M.A. (Ed.). *Repetitive DNA*. Vol. 7. Basel, Karger, p.197-221.
- Cox-Fernandes, C. 1997. Lateral migration of fishes in Amazon floodplains. *Ecology of Freshwater Fish*, 6: 36-44.
- Dagosta, F.C.; de Pinna, M.D. 2017. Biogeography of Amazonian fishes: deconstructing river basins as biogeographic units. *Neotropical Ichthyology* 15(3): 169 p.
- Dagosta, F.C.; de Pinna, M. 2019. The fishes of the Amazon: distribution and biogeographical patterns, with a comprehensive list of species. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 431: 1-163.
- De Barros, L.C.; Galetti Jr., P.M.; Feldberg, E. 2017. Mapping 45S and 5S ribosomal genes in chromosomes of Anostomidae fish species (Ostariophysi, Characiformes) from different Amazonian water types. *Hydrobiologia* 789(1): 77-89.
- De Oliveira, R.R.; Feldberg, E.; dos Anjos, M.B.; Zuanon, J. 2009. Mechanisms of chromosomal evolution and its possible relation to natural history characteristics in *Ancistrus* catfishes (Siluriformes: Loricariidae). *Journal of Fish Biology* 75: 2209–2225.
- De Rosa, L.V.; Foresti, F.; Wasko, A.P.; Oliveira, C.; Martins, C. 2006. Nucleotide sequence, genomic organization and chromosome localization of 5S rDNA in two species of Curimatidae (Teleostei, Characiformes). *Genetics and Molecular Biology* 29: 251–256.
- De Rosa, L.V.; Foresti, F.; Martins, C.; Oliveira, C.; Sobrinho, P.E.; Wasko, A.P. 2007. Cytogenetic analyses of two Curimatidae species (Pisces; Characiformes) from the Paranapanema and Tietê Rivers. *Brazilian Journal of Biology* 67: 333–338.
- De Rosa, L.V.; Foresti, F.; Martins, C.; Oliveira, C.; Wasko, A.P. 2008. Identification and description of distinct B chromosomes in *Cyphocharax modestus* (Characiformes, Curimatidae). *Genetics and Molecular Biology* 31 (1): 265-269.
- Diniz, D.; Laudicina, A.; Bertollo, L.A.C. 2009. Chromosomal location of 18S and 5S rDNA sites in *Triportheus* fish species (Characiformes, Characidae). *Genetics and Molecular Biology* 32(1): 37-41.
- Dorini, B.F.; Ribeiro-Silva, L.R.; Foresti, F.; Oliveira, C.; Melo, B.F. 2020. Molecular phylogenetics provides a novel hypothesis of chromosome evolution in Neotropical fishes of the genus *Potamorhina* (Teleostei, Curimatidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 1-9 p.

- Dulz, T.A.; Lorscheider, C.A.; Nascimento, V.D.; Noletto, R.B.; Moreira-Filho, O.; Nogaroto, V.; Vicari, M.R. 2019. Comparative cytogenetics among *Leporinus friderici* and *Leporellus vittatus* populations (Characiformes, Anostomidae): focus on repetitive DNA elements. *Comparative Cytogenetics* 13: 1–16.
- Dulz, T.A.; Azambuja, M.; Nascimento, V.D.; Lorscheider, C.A.; Noletto, R.B.; Moreira-Filho, O.; Nogaroto, V.; Diniz, D.; Affonso, P.R.A.M.; Vicari, M.R. 2020. Karyotypic diversification in two *Megaleporinus* species (Characiformes, Anostomidae) inferred from in situ localization of repetitive DNA sequences. *Zebrafish* 17(5): 333-341.
- Favarato, R.M.; da Silva, M.; de Oliveira, R.R.; Artoni, R.F.; Feldberg, E.; Matoso, D.A. 2016. Cytogenetic diversity and the evolutionary dynamics of rDNA genes and telomeric sequences in the *Ancistrus* genus (Loricariidae: Ancistrini). *Zebrafish* 13(2): 103-111.
- Favarato, R.M. 2019. *Mapeamento cromossômico comparativo de serrasalmídeos (Serrasalmidae, Characiformes) por meio de sequências repetitivas de DNA*. Tese de doutorado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Amazonas. 89 p.
- Feldberg, E.; Porto, J.I.R.; Bertollo, L.A.C. 1992. Karyotype evolution in Curimatidae (Teleostei, Characiformes) of the Amazon region. I. Studies on the genera *Curimata*, *Psectrogaster*, *Steindachnerina* and *Curimatella*. *Brazilian Journal of Genetics* 15: 369–383.
- Feldberg, E.; Porto, J.I.R.; Nakayama, C.M.; Bertollo, L.A.C. 1993. Karyotype evolution in Curimatidae (Teleostei, Characiformes) from the Amazon region. II. Centric fissions in the genus *Potamorhina*. *Genome* 36: 372–376.
- Fenocchio, A.S.; Pastori, M.C.; Roncati, H.A.; Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C. 2003. A cytogenetic survey of the fish fauna from Argentina. *Caryologia* 2: 197–204.
- Fink, S.V.; Fink, W.L. 1981. Interrelationships of the Ostariophysan Fishes (Teleostei). *Zoological Journal of the Linnean Society* 72: 297-353.
- Fricke, R.; Eschmeyer, W.N.; Van der Laan, R. (eds) 2020. Eschmeyer's Catalog of Fishes: Genera, Species, References. (<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>). Electronic version accessed 10 de fevereiro 2021.
- Galetti Jr., P.M.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. 1994. Trends in chromosome evolution of Neotropical Characiform fishes. *Caryologia* 47: 289–297.
- Garrido-Ramos, M.A.; de la Herran, R.; Ruiz Rejon, C.; Ruiz Rejon, M. 1998. A satellite DNA of Sparidae family (Pisces, Perciformes) associated with telomeric sequences. *Cytogenetics and Cell Genetics* 83: 3–9.

- Gold, J.R.; Li, C.; Shipley, N.S.; Powers, P.K. 1990. Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. *Journal of Fish Biology* 37: 563-575.
- Goulding, M.; Barthem, R.; Ferreira, E. 2003. *The Smithsonian Atlas of the Amazon*. Washington; London: Smithsonian Books. 256 p.
- Gravena, W.; Teribele, R.; Giuliano-Caetano, L.; Dias, A.L. 2007. Occurrence of B chromosomes in *Cyphocharax modestus* (Fernández-Yépez, 1948) and *Steindachnerina insculpta* (Fernández-Yépez, 1948) (Characiformes, Curimatidae) from the Tibagi River basin (Paraná State, Brazil). *Brazilian Journal of Biology* 67(4, Suppl.): 905-908.
- Grewal, S.I.; Jia, S. 2007. Heterochromatin revisited. *Nature Reviews Genetics* 8(1): 35-46.
- Gross, M.C.; Schneider, C.H.; Valente, G.T.; Martins, C.; Feldberg, E. 2010. Variability of 18S rDNA locus among *Symphysodon* fishes: chromosomal rearrangements. *Journal of Fish Biology* 76: 1117-1127.
- Guerra, M.S. 1988. *Introdução à citogenética geral*. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, RJ. 142 p.
- Guerra, M. 2004. *FISH: conceitos e aplicações na citogenética*. Sociedade Brasileira de Genética. Ribeirão Preto, SP, BR. 184pp.
- Gunther, A. 1864. *Catalogue of the Fishes in the Collection of the British Museum*. 5, xii + 455 pages. London.
- Hatanaka, T.; Galetti Jr, P.M. 2004. Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica* 122: 239–244.
- Hennig, W. 1950. *Grundzüge einer Theorie der phylogenetischen Systematik*. Berlin: Deutscher Zentralverlag.
- Howell, W.M.; Black, D.A. 1980. Controlled silver staining nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: a 1 step method. *Experientia* 36: 1014-1015.
- Hsu, T.C.; Spirito, S.C.; Pardue, M.L. 1975. Distribution of 18+28S ribosomal genes in mammalian genomes. *Chromosoma* 53: 25-33.
- Ijdo, J.W.; Wells, R.A.; Baldini, A.; Reeders, S.T. 1991. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. *Nucleic Acids Research* 19(17): 4780.
- Jesus, C.M.; Moreira-Filho, O. 2003. Chromosomal localization of 5S and 18S RNA genes in *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Caryologia* 56: 281–287.

- Levan, A.; Fredga, K.; Sandberg, A.A. 1964. Nomenclature for centromeric position of chromosomes. *Heredity* 52: 201-220.
- Lévêque, C.; Oberdorff, T.; Paugy, D.; Stiassny, M.L.J.; Tedesco, P.A. 2008. Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. *Hydrobiologia* 595(1): 545–567.
- Long, E.O.; David, I.B. 1980. Repeated genes in eukaryotes. *Annual Review of Biochemistry* 49: 727-764.
- Lowe-McConnell, R.H. 1999. *Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais*. São Paulo: Edusp. 534 p.
- Lui, R.L.; Blanco, D.R.; Moreira-Filho, O.; Margarido, V.P. 2012. Propidium iodide for making heterochromatin more evident in the C-banding technique. *Biotechnic & Histochemistry* 87(7): 433–438.
- Malabarba, L.R.; Malabarba, M.C. 2020. Phylogeny and classification of Neotropical fish. In: *Biology and Physiology of Freshwater Neotropical Fish*. p. 1-19, Academic Press.
- Mantovani, M.; Abel, L.D.S.; Moreira-Filho, O. 2005. Conserved 5S and variable 45S rDNA chromosomal localization revealed by FISH in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae). *Genetica* 123: 211–216.
- Marajó, L.; Viana, P.; Ferreira, M.; Py-Daniel, L.R.; Feldberg, E. 2018. Cytogenetics of two *Farlowella* species (Loricariidae: Loricariinae): implications on the taxonomic status of the species. *Neotropical Ichthyology* 16: 1-8.
- Martins, C.; Giuliano-Caetano, L.; Dias, A.L. 1996. Occurrence of a B chromosome in *Cyphocharax modesta* (Pisces, Curimatidae). *Cytobios* 85: 247–253.
- Martins, C.; Galetti Jr., P.M. 1999. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Research* 7: 363-367.
- Martins, C.; Galetti Jr., P.M. 2000. Conservative distribution of 5S rDNA loci in *Schizodon* (Pisces, Anostomidae) chromosomes. *Chromosome Research* 8(4): 353-355.
- Martins, C.; Venere, P.C.; Mestriner, C.A.; Cestari, M.M.; Ferreira, R.; Galetti Jr, P.M. 2000. Chromosome relationships between Anostomidae and Chilodontidae fish (Characiformes). *Cytologia* 65(2): 153-160.
- Martins, C.; Galetti Jr., P.M. 2001. Organization of 5S rDNA in species of the fish *Leporinus*: Two different genomic locations are characterized by distinct non transcribed spacers. *Genome* 44: 903-910.
- Martins, C.; Wasko, A.P. 2004. Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. *Focus on genome research* 289: 318.

- Martins, C. 2007. Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In Pisano, E.; Ozouf- Costaz, C.; Foresti, F.; Kapoor, B.G. (eds): *Fish Cytogenetics*. Enfield, Science Publishers, p. 421–453.
- Martins, C.; Cabral-de-Mello, D.C.; Valente, G.T.; Mazzuchelli, J.; Oliveira, S.G. 2011. Cytogenetic mapping and its contribution to the knowledge of animal genomes. In: *Advances in Genetics Research*, Vol. 4 Kevin, V.U. (Ed.). Nova Science Publisher, Hauppauge, NY, USA. p. 1-82.
- Martins, N.F.; Bertollo, L.A.C.; Troy, W.P.; Feldberg, E.; Valentin, F.C.S.; Cioffi, M.B. 2013. Differentiation and evolutionary relationships in *Erythrinus erythrinus* (Characiformes, Erythrinidae): comparative chromosome mapping of repetitive sequences. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 23(2): 261-269.
- Melo, B.F.; Sidlauskas, B.L.; Hoekzema, K.; Vari, R.P.; Oliveira, C. 2014. The first molecular phylogeny of Chilodontidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) reveals cryptic biodiversity and taxonomic uncertainty. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 70: 286-295.
- Melo, B.F.; Sidlauskas, B.L.; Hoekzema, K.; Vari, R.P.; Dillman, C.B.; Oliveira, C. 2018. Molecular phylogenetics of Neotropical detritivorous fishes of the Family Curimatidae (Teleostei: Characiformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 127: 800-812.
- Meyne, J.; Baker, R.J.; Hobart, H.H.; Hsu, T.C.; Ryder, O.A.; Ward, O.G.; Wiley, J.E.; Wurster-Hill, D. H.; Yates, T.L.; Moyzis, R.K. 1990. Distribution of nontelomeric sites of 62 A.D. Bolzán / Mutation Research 773 (2017) 51–65(TTAGGG)_n telomeric sequences in vertebrate chromosomes, *Chromosoma* 99, 3–10.
- Miller, O.J.; Miller, D.A.; Dev, V.G.; Tantravahi, R.; Croce, C.M. 1976. Expression of human and suppression of mouse nucleolus organizer activity in mouse-human somatic cell hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 73: 4531–4535.
- Monaghan, P. 2010. Telomeres and life histories: the long and the short of it. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1206: 130-142.
- Moreira-Filho, O.; Bertollo, L.A.C.; Galetti Jr, P.M. 1984. Structure and variability of nucleolar organizer regions in Parodontidae fish. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 26(5): 564-568.
- Multani, A.S.; Ozen, M.; Furlong, C.L.; Zhao, Y.J.; Hsu, T.C., Pathak, S. 2006. Heterochromatin and interstitial telomeric DNA homology. *Chromosoma* 110: 214-220.
- Nanda, I.; Schrama, D.; Feichtinger, W.; Haaf, T.; Scharl, M.; Schmid, M. 2002. Distribution of telomeric (TTAGGG) sequences in avian chromosomes. *Chromosoma* 111: 215-227.

- Nanda, I.; Fugate, M.; Steinlein, C.; Schmid, M. 2008. Distribution of (TTAGGG)_n telomeric sequences in karyotypes of the *Xenopus* species complex. *Cytogenetic and genome research* 122(3-4): 396-400.
- Navarrete, M.C.; Júlio-Júnior, H.F. 1997. Cytogenetic analysis of four curimatids from the Paraguay basin, Brazil (Pisces: Characiformes: Curimatidae). *Cytologia* 62: 241–247.
- Nelson, J.S.; Grande, T.; Wilson, M.V.H. 2016. *Fishes of the world*. Fifth edition. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons.
- Ocalewicz, K. 2013. Telomeres in fishes. *Cytogenetics and Genome Research* 141: 114-125.
- Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L.F.; Foresti, F.; Britski, H.A.; Toledo-Filho, S.A. 1988a. Chromosome formulae of Neotropical freshwater fishes. *Revista Brasileira de Genética* 11: 577-624.
- Oliveira, C.; Almeida-Toledo, L.F.; Foresti, F.; Toledo-Filho, S.A. 1988b. Supernumerary chromosomes, Robertsonian rearrangement and multiple NORs in *Corydoras aeneus* (Pisces, Siluriformes, Callichthyidae). *Caryologia* 41: 227-236.
- Oliveira, C.; Foresti, F. 1993. Occurrence of supernumerary microchromosomes in *Steindachnerina insculpta* (Pisces, Characiformes, Curimatidae). *Cytobios* 76:183–186.
- Oliveira, R.M. 2010. *Citogenética clássica e molecular de três espécies de curimatídeos, com ênfase no cromossomo B de Cyphocharax nagelii* (Characiformes, Curimatidae). Tese de doutorado, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo. 137 p.
- Paço, A.; Chaves, R.; Vieira-da-Silva, A.; Adegas, F. 2013. The involvement of repetitive sequences in the remodelling of karyotypes: the Phodopus genomes (Rodentia, Cricetidae). *Micron*, 46, 27-34.
- Pagnozzi, J.M.; de Jesus Silva, M.J.; Yonenaga-Yassuda, Y. 2000. Intraspecific variation in the distribution of the interstitial telomeric (TTAGGG)_n sequences in *Micoureus demerarae* (Marsupialia: Didelphidae). *Chromosome Research* 8(7): 585-591.
- Pagnozzi, J.M.; Ditchfield, A.D.; Yonenaga-Yassuda, Y. 2002. Mapping the distribution of the interstitial telomeric (TTAGGG)_n sequences in eight species of Brazilian marsupials (Didelphidae) by FISH and the correlation with constitutive heterochromatin. Do ITS represent evidence for fusion events in American marsupials? *Cytogenetic and genome research* 98(4): 278-284.
- Pinheiro, V.S.S.; Carvalho, N.D.M.; Do Carmo-Júnior, E.; Schneider, C.H.; Feldberg, E.; Gross, M.C. 2016. Karyoevolution in *Potamorhina* (Cope, 1878) (Ostariophysi, Curimatidae): using repetitive DNA for the elucidation of genome organization. *Zebrafish*. DOI: 10.1089/zeb.2015.1187.

- Pinkel, D.; Straume, T.; Gray, J.W. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83: 2934-2938.
- Porto, J.I.R.; Feldberg, E.; Nakayama, C.M.; & Falcão, J. 1992. A checklist of chromosome numbers and karyotypes of Amazonian freshwater fishes. *Revue d'Hydrobiologie Tropicale*, 25(4), 287-299.
- Pucci, M.B.; Barbosa, P.; Nogaroto, V.; Almeida, M.C.; Artoni, R.F.; Scacchetti, P.C.; Pansonato-Alves, J.C; Foresti, F.; Moreira-Filho, O.; Vicari, M.R. 2016. Chromosomal spreading of microsatellites and (TTAGGG)_n sequences in the *Characidium zebra* and *C. gomesi* genomes (Characiformes: Crenuchidae). *Cytogenetic and genome research* 149(3): 182-190.
- Quadros, J.; Ferreira, A.M.V.; Viana, P.F.; Marajó, L.; Oliveira, E.; Ferreira, E.; Feldberg, E. 2020. Comparative cytogenetic of six species of Amazonian Peacock bass (*Cichla*, Cichlinae): intrachromosomal variations and genetic introgression among sympatric species. *Comparative Cytogenetics* 14: 437-451.
- Queiroz, L.J.; Torrente-Vilara, G.; Ohara, W.M.; Pires, T.; Zuanon, J.A.; & Doria, C.R.C. 2013. *Peixes do rio Madeira, Vol. 1*. São Paulo, Brazil: Editora Dialetto. 402 p.
- Regan, C.T. 1911. The classification of the Teleostean fishes of the Order Ostariophysi, I: Cyprinoidea. *Annals and Magazine of Natural History* 8(8): 13-32.
- Ridley, M. 2006. *Evolução*. 3ra ed. Editora Artmed, 752p.
- Rocchi, M.; Archidiacono, N.; Schempp, W.; Capozzi, O.; Stanyon, R. 2012. Centromere repositioning in mammals. *Heredity* 108: 59–67.
- Rosa, K.O.; Ziemniczak, K.; de Barros, A.V.; Nogaroto, V.; Almeida, M.C.; Cestari, M.M.; Artoni, R.F.; Vicari, M.R. 2012. Numeric and structural chromosome polymorphism in *Rineloricaria lima* (Siluriformes: Loricariidae): fusion points carrying 5S rDNA or telomere sequence vestiges. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 22(3): 739-749.
- Ruíz-Herrera, A.; Nergadze, S.G.; Santagostino, M.; Giulotto, E. 2008. Telomeric repeats far from the ends: mechanisms of origin and role in evolution. *Cytogenetic and Genome Research* 122: 219–228.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Springs Harbor, NY.
- Sampaio, T.R.; Gravena, W.; Gouveia, J.G.; Giuliano-Caetano, L.; Dias, A.L. 2011. B microchromosomes in the family Curimatidae (Characiformes): mitotic and meiotic behavior. *Comparative Cytogenetics* 5: 301–313.

- Sampaio, T.R.; Pires, L.B.; Venturelli, N.B.; Usso, M.C.; Rosa, R.; Dias, A.L. 2016. Evolutionary trends in the family Curimatidae (Characiformes): inferences from chromosome banding. *Comparative Cytogenetics* 10(1): 77-95.
- Scacchetti, P.C.; Utsunomia, R.; Pansonato-Alves, J.C.; Costa-Silva, G.J.; Oliveira, C.; Foresti, F. 2015. Extensive spreading of interstitial telomeric sites on the chromosomes of *Characidium* (Teleostei, Characiformes). *Genetica* 143(3): 263-270.
- Schneider, C.H.; Gross, M.C.; Terencio, M.L.; Artoni, R.F.; Vicari, M.R.; Martins, C.; Feldberg, E. 2013. Chromosomal evolution of Neotropical cichlids: the role of repetitive DNA sequences in the organization and structure of karyotype. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 23: 201-214.
- Schweizer, D.; Loidl, J. 1987. A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C band patterns. *Chromosomes Today* 9: 61-74.
- Sioli, H. 1983. *Amazônia: Fundamentos da Ecologia da maior região de florestas tropicais*. Terceira edição. Editora Vozes Ltda. Rio de Janeiro.
- Sochorová, S.; Garcia, S.; Gálvez, F.; Symonová, R.; Kovařík, A. 2018. Evolutionary trends in animal ribosomal DNA loci: introduction to a new online database. *Chromosoma* 127: 141-150.
- Sousa, J.F.D.S.; Viana, P.F.; Bertollo, L.A.; Cioffi, M.B.; Feldberg, E. 2017. Evolutionary relationships among *Boulengerella* species (Ctenoluciidae, Characiformes): genomic organization of repetitive DNAs and highly conserved karyotypes. *Cytogenetic and Genome Research* 152(4): 194-203.
- Sumner, A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromere heterochromatin. *Experimental Cell Research* 75: 304-306.
- Sumner, A.T. 2003. *Chromosomes Organization and Functions*. Blackwell Science Ltd. 280p.
- Symonová, R.; Majtánová, Z.; Sember, A.; Staaks, G.B.; Bohlen, J.; Freyhof, J.; Rábová, M.; Ráb, P. 2013. Genome differentiation in a species pair of coregonine fishes: an extremely rapid speciation driven by stress-activated retrotransposons mediating extensive ribosomal DNA multiplications. *BMC Evolutionary Biology* 13: 42.
- Terencio, M.L.; Schneider, C.H.; Gross, M.C.; Vicari, M.R.; Feldberg, E. 2012. Stable Karyotypes: a general role for the fish of the family Prochilodontidae? *Hydrobiologia* 686: 147-156.
- Teribele, R.; Gravena, W.; Carvalho, K.; Giuliano-Caetano, L.; Dias, A.L. 2008. Karyotypic analysis in two species of fishes of the family Curimatidae: Ag-NO₃, CMA3 and FISH with 18S probe. *Caryologia* 61: 211-215.

- Van der Sleen, P. e Albert, J.A. 2018. *Field guide to the fishes of the Amazon, Orinoco and Guianas*. Princeton University Press. 464p.
- Vari, R.P. 1983. Phylogenetic relationships of the families Curimatidae, Prochilodontidae, Anostomidae, and Chilodontidae (Pisces: Characiformes). *Smithsonian Contributions to Zoology* 378: 1-60.
- Vari, R.P. 1989a. A Phylogenetic Study of the Neotropical Characiform Family Curimatidae (Pisces: Ostariophysi). *Smithsonian Contributions to Zoology* 471:1-71.
- Vari, R.P. 1989b. Systematics of the Neotropical Characiform Genus *Pseudocurimata* Fernandez-Yepez (Pisces: Ostariophysi). *Smithsonian Contributions to Zoology* 490: 1-30.
- Vari, R.P. 2003. Family Curimatidae. In: Reis, R.E.; Kullander, S.O.; Ferraris, C.J. (eds) *Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America*. p. 51–64. Porto Alegre, Brazil: Edipucrs.
- Venere P.C.; Galetti Jr., P.M.1985. Natural triploidy and chromosome B in the fish *Curimata modesta* (Curimatidae, Characiformes). *Brazilian Journal of Genetics* 8: 681–687.
- Venere, P.C.; Galetti Jr., P.M. 1989. Chromosome evolution and phylogenetic relationships of some Neotropical Characiformes of the family Curimatidae. *Brazilian Journal of Genetics* 12: 17–25.
- Venere P.C.; Miyazawa C.S.; Galetti Jr., P.M. 1999. New cases of supernumerary chromosomes in Characiform fishes. *Genetics and Molecular Biology* 22(3): 345–349.
- Venere, P.C.; Souza, I.L.; Silva, L.K.S.; dos Anjos, M.B.; de Oliveira, R.R.; Galetti Jr., P.M. 2008. Recent chromosome diversification in the evolutionary radiation of the freshwater fish family Curimatidae (Characiformes). *Journal of Fish Biology* 72: 1976–1989.
- Viana, P.F.; Feldberg, E.; Cioffi, M.B.; De Carvalho, V.T.; Menezes, S.; Vogt, R.C.; Liehr, T.; Ezaz, T. 2020. The Amazonian red side-necked turtle *Rhinemys rufipes* (Spix, 1824) (Testudines, Chelidae): Has a GSD sex-determining mechanism with an ancient XY sex microchromosome system? *Cells* 9(9): 2088.
- Vicari, M.R.; Almeida, M.C.D.; Bertollo, L.A.C.; Moreira-Filho, O. Artoni, R.F. 2006. Cytogenetic analysis and chromosomal characteristics of the polymorphic 18S rDNA in the fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetics and Molecular Biology* 29(4): 621–625.
- Vidal, A.C.B.; Junior, S.S.D.V.; Oliveira, M.M.; Carvalheira, G.M.G. 2017. Citogenética: da teoria cromossômica da hereditariedade à citogenética. In: Aragão, F.J.L.; Moreira, J.R.

- (Ed.). Mendel: das leis da hereditariedade à engenharia genética. Edição 1. Embrapa, p.101-137.
- Voltolin, T.A.; Penitente, M.; Mendonça, B.B.; Senhorini, J.A.; Foresti, F.; Porto-Foresti, F. 2013. Karyotypic conservatism in five species of *Prochilodus* (Characiformes, Prochilodontidae) disclosed by cytogenetic markers. *Genetics and Molecular Biology* 36(3): 347-352.
- Wang, M.; Lemos, B.; Eng, C. 2017. Ribosomal DNA copy number amplification and loss in human cancers is linked to tumor genetic context, nucleolus activity, and proliferation. *PLoS Genet* 13(9): e1006994.
- Welcomme, R.L. 1985. *River fisheries*. Rome: FAO Fisheries Technical Papers.
- Wells, R.A.; Germino, G.G.; Krishna, S.; Buckle, V.J.; Reeders, S.T. 1990. Telomere-related sequences at interstitial sites in the human genome. *Genomics* 8: 699–704.
- Yano, C.F.; Poltronieri, J.; Bertollo, L.A.C.; Artoni, R.F.; Liehr, T.; Cioffi, M.B. 2014. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in *Triplotheus trifurcatus* (Characidae, Characiformes): insights into the differentiation of the Z and W chromosomes. *PLoS One* 9(3): e90946.