

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE MUNDO NOVO
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

WILLIAN MARCONDES CARNEIRO

**ESTUDOS CROMOSSÔMICOS CONVENCIONAIS E
MOLECULARES EM *Moenkhausia sanctaefilomenae*
(CHARACIFORMES, CHARACIDAE): UMA REVISÃO
BIBLIOGRÁFICA**

Mundo Novo - MS

Novembro/2020

WILLIAN MARCONDES CARNEIRO

**ESTUDOS CROMOSSÔMICOS CONVENCIONAIS E
MOLECULARES EM *Moenkhausia sanctaefilomenae*
(CHARACIFORMES, CHARACIDAE): UMA REVISÃO
BIBLIOGRÁFICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Ciências Biológicas, da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Fernandes

Coorientadora: Profa. Dra. Valéria Flávia Batista da Silva

Mundo Novo-MS

Novembro/2020

WILLIAN MARCONDES CARNEIRO

**ESTUDOS CROMOSSÔMICOS CONVENCIONAIS E
MOLECULARES EM *Moenkhausia sanctaefilomenae*
(CHARACIFORMES, CHARACIDAE): UMA REVISÃO
BIBLIOGRÁFICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Licenciatura em Ciências Biológicas.

APROVADO EM 20 de Novembro de 2020

Participação remota por vídeo conferência

Prof. Dr. Carlos Alexandre Fernandes - Orientador - UEM



Participação remota por vídeo conferência

Prof. Dr. Diovani Piscor - UEMS



Participação remota por vídeo conferência

Prof^ª. Dr^ª. Michele Aparecida dos Santos Nobrega-UEMS



* Participação por vídeo conferência de acordo com a INSTRUÇÃO NORMATIVA PROPP/UEMS N° 001, de 07 de maio de 2019, Portaria UEMS N.º 018, de 16 de março de 2020 para enfrentamento à COVID – 19.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela saúde, força e por me ajudar a ultrapassar todos os obstáculos enfrentados ao longo do curso.

À minha mãe Palmira, por acreditar em mim e sempre me incentivar, por suas orações que sem dúvidas foram ouvidas e me ajudaram a trilhar o caminho e chegar até aqui. Sempre que me senti aflito e pensei em desistir, você apareceu e com suas palavras de carinho e sabedoria me ajudaram a recuperar minhas forças.

Agradeço também aos meus familiares pelo incentivo, em especial meus irmãos, pois sem vocês nada disso seria possível.

Sou imensamente grato ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Alexandre Fernandes, por ter aceito o desafio de me orientar nas Iniciações Científicas e no presente trabalho, mas agradeço principalmente sua paciência, seus ensinamentos comigo compartilhados e seus conselhos que foram de grande valia, pois com toda certeza os levarei para a vida.

Estendo os agradecimentos também ao Prof. Dr. Diovani Piscor, por suas orientações nos momentos de ausência do Prof. Dr. Carlos Alexandre, pela sua paciência e ensinamentos que foram de extrema importância no desenvolvimento das Iniciações Científicas como meu Coorientador.

Agradeço à minha amiga “quase irmã” Sidilene Caciano Silva, pela força, pelas longas conversas, pelos trabalhos desenvolvidos juntos, pelos momentos de reclamações e desespero, que sem dúvidas marcaram nossas vidas. Ah, pode ter certeza que sua amizade foi um dos meus maiores incentivos, obrigado por acreditar em mim!!!

Aos meus colegas de laboratório e amigos, Allan, Emily e Matheus, por tudo!!!

Não posso deixar de agradecer outros colegas de turma e amigos de verdade, Andrea dos Santos Gonçalves, que no momento estávamos um pouco afastados, mas que serei eternamente grato por ter sua amizade, também aos colegas e amigos Vrademir O. Custódio, Jéssica Maciel, Diego Faganello e Joyce Luana. Obrigado pelas parcerias de vocês!

A todos os meus colegas de turma, pois o caminho foi longo, mas como sempre nos ajudamos e chegamos até aqui.

A toda equipe de funcionários administrativos da UEMS unidade de Mundo Novo, em especial aos funcionários da biblioteca, da secretaria acadêmica e ao técnico de laboratório, Alexandre.

A todos os professores da UEMS Mundo Novo, em especial aos do curso de Ciências Biológicas, vocês me ensinaram a ver o mundo de outra maneira, com “outros olhos”. Muito obrigado mesmo!!!

À Prof. Dra. Vanessa Daiana Pedrancini, uma das minhas inspirações, que além de uma excelente profissional, tem um coração de ouro e uma humildade incrível.

Também não esquecendo da nossa guerreira, conselheira e confidente tia Tunica, pois a senhora é uma pessoa muito especial e nos impulsiona a conquistar nossos sonhos. Obrigado!

Enfim, a todos que contribuíram para que minha jornada acadêmica fosse possível. Muito obrigado mesmo!!!

Três coisas

De tudo ficaram três coisas:

A certeza de que estamos sempre começando...

A certeza de que precisamos continuar...

A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...

Portanto devemos:

Fazer da interrupção um caminho novo...

Da queda, uma passo de dança...

Do medo, uma escada...

Do sonho, uma ponte...

Da procura, um encontro.

Fernando Sabino

RESUMO

O presente estudo tem como finalidade realizar um levantamento bibliográfico das principais publicações da área de citogenética clássica e molecular para o gênero *Moenkhausia* e para a espécie de *Moenkhausia sanctaefilomenae*. A espécie *M. sanctaefilomenae* pertence a ordem Characiformes, família Characidae e subfamília Stethaprioninae, apresentando uma ampla distribuição pela bacia do Alto Rio Paraná e áreas adjacentes. Quanto a citogenética do grupo, o número diploide do gênero apresenta pouca variação, indo de 48 à 50 cromossomos, com predominância de metacêntricos e submetacêntricos. Com relação a filogenia, o gênero pode ser considerado polifilético. Na espécie *M. sanctaefilomenae*, o cariótipo é conservado em $2n = 50$ cromossomos. A região organizadora de nucléolo (RON) apresentam-se bastante variáveis entre populações da espécie, com sistemas de RON simples e em alguns casos com múltiplas marcações cromossômicas. Em diversos estudos para a espécie a heterocromatina foi evidenciada majoritariamente em regiões centroméricas e pericentroméricas, o que pode ser considerado como característico da espécie. Os cromossomos Bs ou supranumerários são recorrentes no gênero e estão presentes em número variável em *M. sanctaefilomenae*. Em alguns casos os cromossomos Bs apresentam sítios de RON e banda-C, além de genes evidenciados através da Hibridização *in situ* fluorescentes (FISH), o que corrobora com a hipótese de que tais cromossomos podem ter sido originado de pares do complemento A, por meio de possíveis rearranjos cromossômicos. Porém, apesar de existirem diversos estudos cromossômicos para a espécie, é notável que mais estudos que busquem explicar a origem dos cromossomos Bs se fazem necessários, incluindo estudos comparativos com populações de diferentes bacias hidrográficas, pois tais estudos podem contribuir com dados ainda mais sólidos sobre a origem e comportamento desses elementos no genôma de *M. sanctaefilomenae*.

Palavras-chave: Citogenética. Cromossomos B. FISH. Banda C. RON. Filogenética.

SUMÁRIO

1. Introdução	9
2. Objetivos	10
2.1 Objetivo geral	10
2.2 Objetivos específicos	10
3. Metodologia	11
4. Desenvolvimento	11
4.1 Estudos citogenéticos no gênero <i>Moenkhausia</i> e a ocorrência de cromossomos Bs no grupo	11
4.2 Principais estudos filogenéticos moleculares utilizando genes mitocondriais e nucleares no gênero <i>Moenkhausia</i>	18
4.3 Estudos citogenéticos convencionais e moleculares em <i>Moenkhausia sanctaefilomenae</i>	22
4.4 Estudos dos cromossomos supranumerários em <i>Moenkhausia sanctaefilomenae</i>	27
5. Conclusão	30
Referências	31

1. INTRODUÇÃO

A ordem Characiformes é uma das mais numerosas de peixes de água doce, sendo que atualmente apresenta 3756 espécies válidas, distribuídas em 24 famílias diferentes, das quais a mais numerosa é a família Characidae, com 1214 espécies válidas (FRICKE; ESCHMEYER; FONG, 2020). Possui uma ampla distribuição, desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Patagônia, na Argentina e apresenta uma grande diversidade na região tropical da América do Sul (MIRANDE, 2019).

A família Characidae apresenta 10 subfamílias, sendo que a subfamília Stethaprioninae é a que contém o maior número de espécies entre elas, com 611 espécies válidas (FRICKE; ESCHMEYER; FONG, 2020). Os peixes pertencentes a essa subfamília, apresentam tamanhos variando de pequeno a médio porte e podem ser encontrados por exemplo em rios e córregos pertencentes a bacia do Alto Rio Paraná e áreas adjacentes (OTA et al., 2018).

Os membros de Stethaprioninae apresentam características morfológicas peculiares que os distinguem dos demais caracídeos, pois em geral não atingem grande porte, apresentam corpo comprimido e alto, além de possuírem um espinho ósseo situado logo à frente do primeiro raio da nadadeira dorsal, o que foi considerado como sinapomórfico para o grupo (REIS, 1989 apud GARCIA-AYALA, 2018).

Quanto às classificações, muitos integrantes sofreram modificações, sendo inseridos provisoriamente em *Incertae sedis* (dentro de Characidae, ver, LIMA et al, 2003), o que não ocorreu com *Serrapinnus*, pois o mesmo permanece bem definido (com relação a filogenia) em Cheirodontinae. Porém, é notável que as relações filogenéticas entre muitos indivíduos de *Incertae sedis* são bastante complexas e não apresentam uma total definição, uma vez que representam um grupo polifilético, o que tem levado a muitas discussões atualmente (ver, por exemplo, OLIVEIRA et al., 2011; THOMAZ et al., 2015; ROSSINI et al., 2016).

O gênero *Moenkhausia* apresenta um número significativo de espécies, atualmente é composto por aproximadamente 90 espécies válidas, as quais se distribuem em bacias importantes da América do Sul, como a bacia dos rios Amazônico, Orinoco, La Plata e San Francisco, além de alguns representantes do gênero na bacia do Alto Rio Paraná, nesse grupo também há conflitos quanto às classificações taxonômicas (VANEGAS-RÍOS; BRITZKE; MIRANDE, 2019; OTA et al, 2018). Os hábitos alimentares podem ser variáveis entre as espécies do gênero, com presença de indivíduos predominantemente insetívoros, como em *Moenkhausia collettii*, *Moenkhausia sanctaefilomenae*, além de espécies generalista (onívora) como em *Moenkhausia intermedia* (OLIVEIRA et al., 2015; TÓFOLI et al., 2010;

BENNEMANN; CASATTI; OLIVEIRA, 2006; MORALLES; RODRIGUES; MACHADO, 2009).

Uma espécie destaque para o gênero *Moenkhausia*, é a *Moenkhausia sanctaefilomenae*, conhecida popularmente como Tetra olho de fogo, ou olho vermelho, devido a coloração dos olhos, pois o mesmo é de porte pequeno (até 7 cm de comprimento) e é utilizado em aquários, apresentando um alto valor comercial em países como o México (ALANIS; SARMA; NANDINI, 2009).

A citogenética clássica e molecular atualmente tem sido extremamente importante na identificação, classificação e estudo evolutivo entre as espécies de peixes de água doce, principalmente naquelas espécies de peixes que apresentam problemas taxonômicos, a citogenética tem sido uma ferramenta muito útil, sendo utilizada no auxílio de identificação destas espécies (BERTOLLO et al., 2017).

Portanto, dada a importância dos estudos citogenéticos clássicos e moleculares em peixes, o presente estudo tem como finalidade realizar um levantamento bibliográfico de tais estudos para a espécie de *M. sanctaefilomenae*, uma vez que o presente trabalho poderá contribuir com futuros estudos citotaxonômicos para este grupo de peixes.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Realizar um levantamento bibliográfico de estudos citogenéticos convencionais e moleculares para a espécie de *M. sanctaefilomenae*, já publicados até o momento, afim de contribuir com futuros estudos citotaxonômicos.

2.2 Objetivos específicos

- Promover pesquisas online em websites de buscas de artigos científicos, como por exemplo: Google acadêmico, Scientific Eletronic Library Online (SciELO) e Web of Science;
- Descrever os principais estudos cromossômicos realizados para o gênero *Moenkhausia*;
- Descrever os principais estudos Filogenéticos realizados para o gênero *Moenkhausia*;
- Descrever os principais estudos cromossômicos convencionais e moleculares em *M. sanctaefilomenae*.

3. METODOLOGIA

O presente trabalho foi realizado através de pesquisas em websites de artigos científicos, como o Google Scholar, ou Google Acadêmico como é conhecido em português, Scientific Eletronic Library Online (SciELO) e Web of Science. Para obtenção dos estudos mais direcionados na área de citogenética clássica e molecular para o gênero *Moenkhausia* e para a espécie *M. sanctaefilomenae* foram utilizadas combinações de palavras como: citogenética (cytogenetics), cariótipo (karyotype), cromossomos (chromosomes), Characiformes, Characidae, *Moenkhausia* e *Moenkhausia sanctaefilomenae*.

4. DESENVOLVIMENTO

4.1 Estudos citogenéticos no gênero *Moenkhausia* e a ocorrência de cromossomos Bs no grupo

Diversos estudos citogenéticos realizados em peixes pertencentes ao gênero *Moenkhausia* tem demonstrado um cariótipo bastante conservado para o grupo, variando de $2n = 48$ à $2n = 50$ cromossomos, com uma predominância de metacêntricos e submetacêntricos (PORTELA-CASTRO; JULIO-JÚNIOR, 2002; DANTAS et al., 2007; FERNANDES; ALVES, 2017).

Apesar da conservação do número diploide no grupo, podem ser observadas distinções na fórmula caritípica de algumas espécies, como por exemplo no estudo realizado por Nascimento (2015), no qual o autor analisou citogeneticamente cinco espécies de *Moenkhausia* (Tabela 1) de diferentes localidades, as quais demonstraram um número diploide de $2n = 50$ cromossomos (Figuras 1 e 2), semelhante aos demais peixes do gênero, porém com diferenças aparentes nas fórmulas cariotípicas e certa variação no número fundamental ($NF = 96$ à 100), o que pode ser atribuído a rearranjos estruturais não-Robertsonianos, como inversões e/ou translocações (Tabela 2). Tais rearranjos, segundo Nascimento (2015) exerceram um importante papel no processo de diferenciação cariotípica no gênero.

Tabela 1 - Espécimes de *Moenkhausia* coletados. LBP: Coleção de Peixes Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, Instituto de Biociências, UNESP; F: fêmeas; M: macho.

Espécies	Coordenadas	Localidade/Município	LBP	N° Amostral	
				M	F
<i>Moenkhausia cosmops</i>	13°38'34.77"S, 58°01'03.02"W	Rio Verde – Campo Novo do Parecis/MT	8164	2	2
<i>M. cf. forestii</i>	14°33'24.43"S, 57°48'45.53"W	Ribeirão do Sapo – Tangará da Serra/MT	19532	4	8
<i>M. oligolepis</i>	14°48'08.33"S, 57°07'25.18"W	Córrego Corredeira – Denise/MT	19530	4	4
	13°41'30.56"S, 57°42'23.28"W	Rio do Sangue – Campo Novo do Parecis/MT	8527	3	4
	10°40'03.63"S, 68°15'43.61"W	Córrego Sem Nome – Xapuri/AC	18576	3	2
<i>M. cf. nigromarginata</i>	13°38'34.77"S, 58°01'03.02"W	Rio Verde – Campo Novo do Parecis/MT	19533	1	2
	13°36'43.82"S, 57°51'28.29"W	Rio Membeca – Campo Novo do Parecis/MT	8525	1	0
<i>Moenkhausia sp.</i>	13°36'43.82"S, 57°51'28.29"W	Rio Membeca – Campo Novo do Parecis/MT	19531	4	1

Fonte: NASCIMENTO, 2015.

Tabela 2 - Dados citogenéticos encontrados nas espécies/populações de *Moenkhausia* analisadas no presente trabalho.

Espécie	Localidade	Fórmula Cariotípica	NF	Cromossomo B
<i>Moenkhausia cosmops</i>	Rio Verde	14m+30sm+6st	100	-
<i>M. cf. forestii</i>	Ribeirão do Sapo	10m+32sm+8st	100	0-3
<i>M. oligolepis</i>	Córrego Corredeira	12m+32sm+6st	100	0-4
	Rio do Sangue			0-3
	Xapuri/AC	10m+26sm+14st		0-2
<i>M. cf. nigromarginata</i>	Rio Membeca	14m+32sm+4a	96	-
	Rio Verde			-
<i>Moenkhausia sp.</i>	Rio Membeca	10m+32sm+8st	100	-

Fonte: NASCIMENTO, 2015.

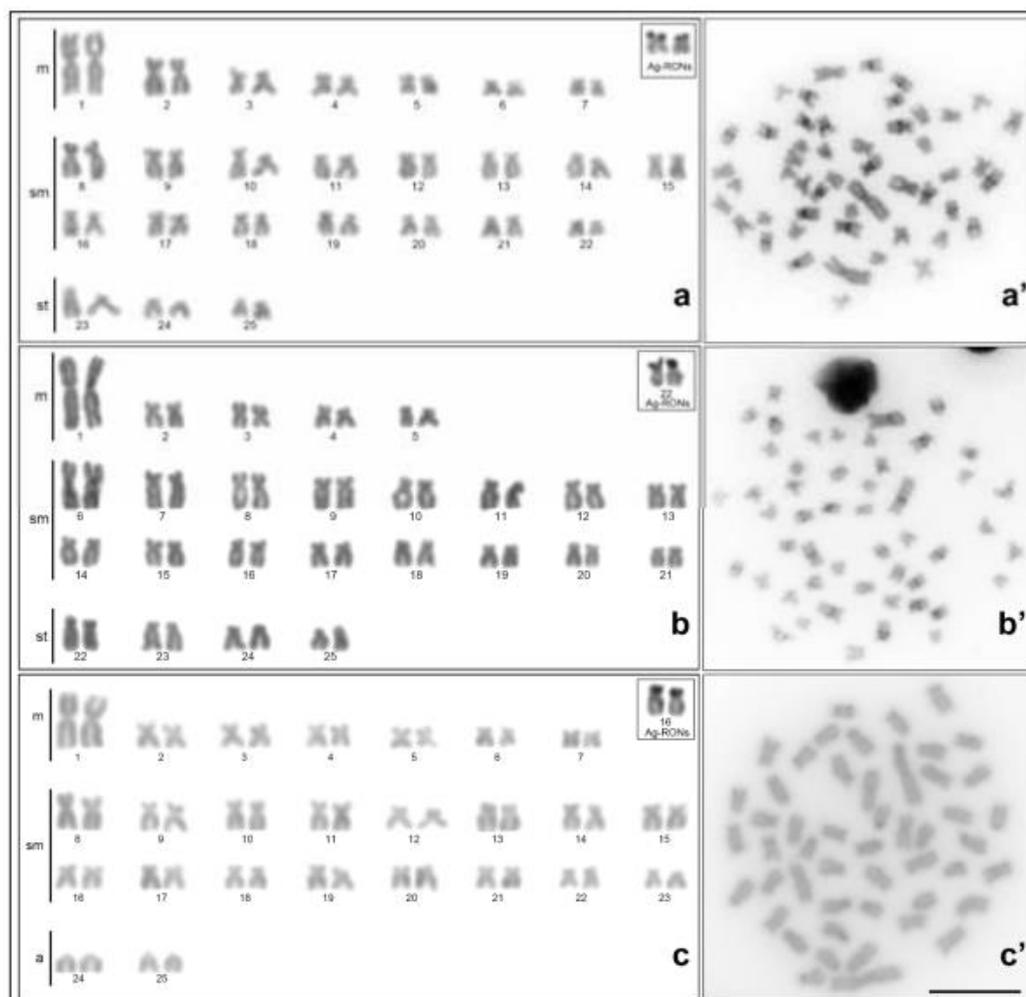


Figura 1 – Cariótipos corados com Giemsa a 5% (a, b e c) e metáfases após bandamento C (a', b' e c') de *Moenkhausia*. Em a *M. cosmops*, b *M. cf. nigromarginata* e em c *Moenkhausia* sp. Nos quadrados o par cromossômico portador das Ag-RONs. A barra equivale a 10 μ m. (NASCIMENTO, 2015).

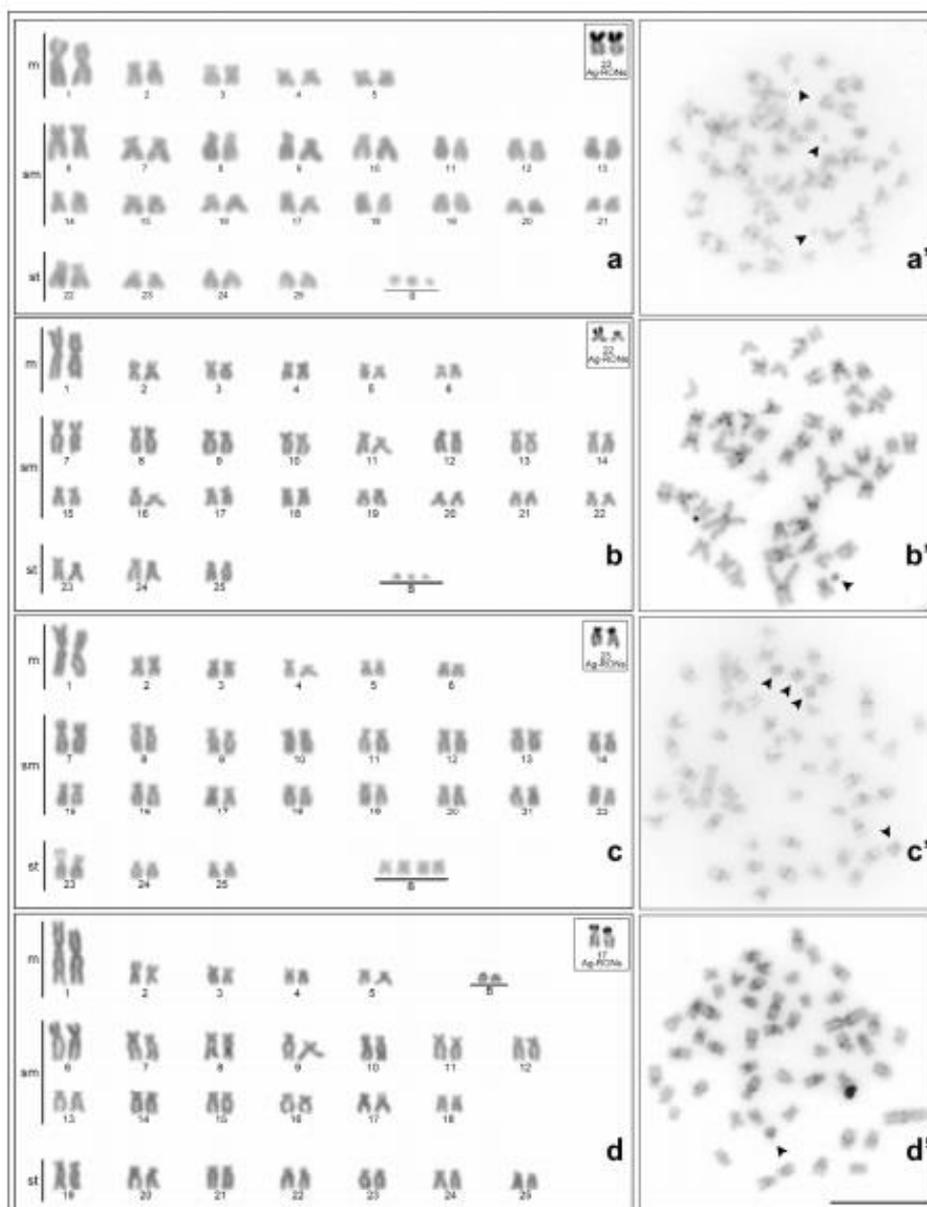


Figura 2 - Cariótipos corados com Giemsa a 5% (a, b e c) e metáfases após bandamento C (a', b' e c') de *Moenkhausia*. Em a *M. cf. forestii*; b *M. oligolepis* do Rio do Sangue; c *M. oligolepis* do Córrego Corredeira e em d *M. oligolepis* do Xapuri/AC; Em destaque os cromossomos B encontrados. As cabeças de seta indicam o cromossomo B. Nos quadrados o par cromossômico portador das Ag-RONs. A barra equivale a 10 μ m. (NASCIMENTO, 2015).

Estudos realizados utilizando marcadores para a região organizadora de nucléolo (RON), demonstra que em diversos representantes do gênero *Moenkhausia* há presença de sistema de RON simples com um par de cromossomos marcados, seja metacêntrico, submetacêntrico ou subtelo-cêntrico. Por exemplo, no estudo realizado por Portela-Castro e Júlio-Júnior (2002), os indivíduos de *M. sanctaefilomenae* e *M. intermedia* apresentaram marcações nos pares cromossômicos 13 e 12 respectivamente (Figura 3), evidenciando sistema de RON simples, o que também é expresso nas Figuras 1 e 2 pertencentes ao estudo de Nascimento (2015) para todas as espécies por ele analisadas.

Quanto a localização da heterocromatina constitutiva mostradas pela técnica de bandeamento C (estudo de NASCIMENTO, 2015) se mostra em blocos heterocromáticos centroméricos e pericentroméricos na maioria dos cromossomos em espécies como *M. cosmops*, *M. cf. nigromarginata*, *Moenkhausia* sp., *M. cf. forestii* e *M. oligolepis* (Figura 1 e 2), corroborando também com estudos como de Hashimoto et al., (2012), no qual a distribuição heterocromática é bastante semelhante.

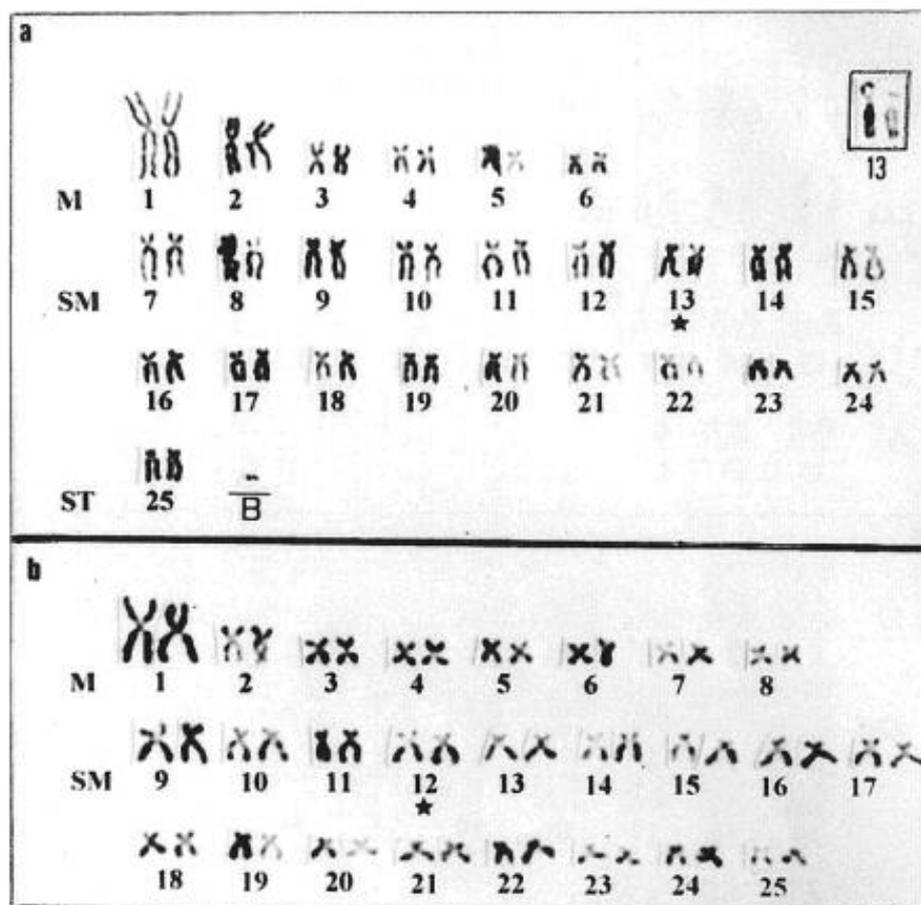


Figura 3 – Cariótipos corados com Giemsa, (a) *Moenkhausia sanctaefilomenae* e (b) *M. intermedia*. em detalhe, par 13 mostrando um heteromorfismo de constrição secundária. (PORTELA-CASTRO; JÚLIO-JÚNIOR, 2002).

Os estudos moleculares utilizando a técnica de FISH com sondas de DNAr 5S, realizados por Nascimento (2015) demonstram uma distribuição bastante particular desse sítio para cada uma das espécies por ele estudadas, por exemplo, em *M. cosmops* foi observado nas regiões pericentroméricas dos pares 1 e 2, em *M. cf. nigromarginata* nas regiões centroméricas dos pares 24 e 25, em *Moenkhausia* sp. nas regiões pericentroméricas dos pares 1 e 6 e em *M. cf. forestii* nas regiões centroméricas dos pares 1, 2, 6, 8 e 10.

Já para *M. oligolepis* a FISH marcou diferentes localizações do DNAr 5S nas três populações analisadas, sendo que na população do Rio do Sangue no município de Campo

Novo do Parecis/MT, as quatro marcações observadas foram nas regiões centroméricas dos pares 1 e 7, já na população do Córrego Corredeira no município de Denise/MT, os sítios marcados se apresentaram nas regiões centroméricas e pericentroméricas de 17 cromossomos diferentes e na população de um córrego sem nome, no município de Xapuri/AC, os sítios marcados se apresentaram dispersos em regiões centroméricas e pericentroméricas em até 21 cromossomos. A notável variação apresentada pelos sítios de DNAr 5S nas espécies estudadas comprova uma intensa dinâmica evolutiva destes sítios para o grupo (NASCIMENTO, 2015).

A utilização das sondas de DNAr 18S para marcação cromossômica demonstra que na grande maioria das espécies do gênero *Moenkhausia*, há apenas um par de cromossomos marcados, como por exemplo em *M. intermedia*, *Moenkhausia* sp. (Figura 4B-C) e *M. dichroua* (DANTAS et al., 2007; PAIZ, 2013).

Porém, apesar da aparente conservação do sítio 18S em apenas um par cromossômico, em *M. sanctaefilomenae* tal sítio se apresenta em vários cromossomos (Figura 4A) o que pode ser um indicador de rearranjos cromossômicos na espécie (DANTAS et al., 2007).

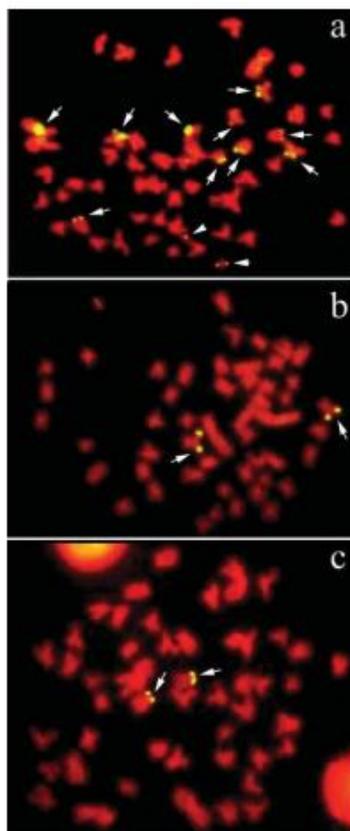


Figura 4. Hibridização *in situ* fluorescente nos cromossomos dos espécimes de *Moenkhausia sanctaefilomenae* (a), *Moenkhausia intermedia* (b) e *Moenkhausia* sp. (c). A cabeça da seta indica localização do DNAr 18S sobre os microcromossomos B. Barra = 5 μ m. (DANTAS et al., 2007).

Uma característica comum a várias espécies de *Moenkhausia* é a ocorrência de cromossomos supranumerários, os chamados cromossomos Bs (Figuras 2, 3, 4 e 5 extraídas dos trabalhos de PORTELA-CASTRO; JULIO-JÚNIOR, 2002; DANTAS et al., 2007; NASCIMENTO, 2015). Tais cromossomos se apresentam em diversas formas e números e podem ser considerados como elementos dispensáveis do genôma, além disso, estão presente em cerca de 15% dos eucariotos (CAMACHO et al., 2000; SERRANO, 2013).

Os cromossomos supranumerários presentes em *Moenkhausia* tem sido alvo de constantes estudos, os quais buscam inferir as possíveis origens dos mesmos. Em *M. oligolepis*, por exemplo, os cromossomos Bs encontrados por Nascimento (2015) são de diferentes morfologias, variando de microcromossomos B a cromossomos B-metacêntrico e B-acrocêntrico, tais variações morfológicas ocorreram entre populações. Já em *M. cf. forestii* os cromossomos Bs são microcromossomos. Os polimorfismos cromossômicos podem estar atrelados a rearranjos cromossômicos, acúmulo de DNA repetitivos e processos de heterocromatização (CAMACHO, 2005).

A utilização da FISH permitiu mapear sítios de genes como DNAr 18S, histona H1 e snDNA U2 nos cromossomos Bs de *M. oligolepis* e *M. cf. forestii* (Figura 5), o que sugere uma possível origem intraespecífica de tais elementos. Sequências repetitivas de DNA em cromossomos do complemento A, segundo o autor, também podem estar ligadas ao processo de formação dos cromossomos supranumerários em *Moenkhausia* (NASCIMENTO, 2015).

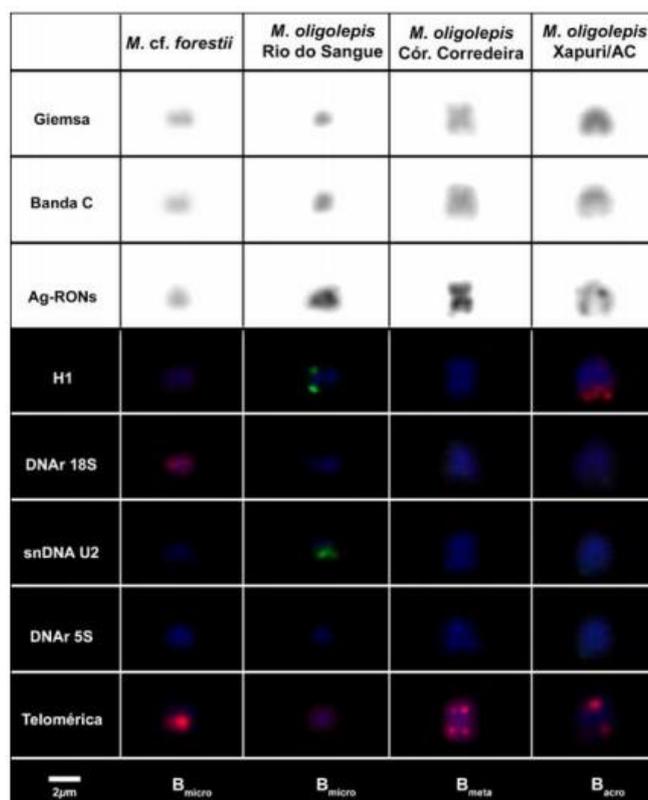


Figura 5. Cromossomos B de *Moenkhausia* analisados no presente trabalho, após a aplicação de diferentes técnicas citogenéticas (NASCIMENTO, 2015).

4.2 Principais estudos filogenéticos moleculares utilizando genes mitocondriais e nucleares no gênero *Moenkhausia*

Estudos filogenéticos moleculares utilizando sequências parciais do gene mitocondrial Citocromo C Oxidase subunidade I (COI) demonstram a existência de conflitos taxonômicos no gênero *Moenkhausia* (o qual é polifilético), por exemplo, espécies como *M. oligolepis* no estudo de Benine et al., (2009) apresentam uma distância genética significativa, formando então diferentes clados, um clado de *M. oligolepis* para a bacia do rio Araguaia, um clado de *M. oligolepis* para a bacia do rio Paraguai e um clado de *M. oligolepis* para a bacia Amazônica, sugerindo desta forma que a espécie estudada corresponde a um complexo de espécies (podendo corresponder a 3 espécies diferentes) e não apenas uma espécie (figura 6). Já as espécies de *M. forestii* e *M. sanctaefilomenae* apresentaram-se em apenas um clado cada uma.



Fig. 4. Maximum Parsimony consensus tree for the mitochondrial gene Cytochrome Oxidase I. Numbers represent values of 1000 bootstrap replicates.

Figura 6. Árvore de consenso de máxima parcimônia para o gene mitocondrial Citocromo C Oxidase subunidade I (COI). Os Números representam valores de 1000 réplicas de bootstrap (BENINE et al., 2009).

Um outro estudo realizado por Mota et al., (2018) confirmou essa hipótese de que *M. oligolepis* deve corresponder a uma complexo de espécies (Figura 7). Nesse mesmo estudo, os autores utilizando o gene COI e o íntron 1 do gene nuclear S7, delimitaram as espécies *Hemigrammus marginatus* e *Moenkhausia bonita* e confirmaram suas identidades. Estas espécies são muito similares morfológicamente, o que causa erros de identificação taxonômica apenas utilizando caracteres morfológicos.

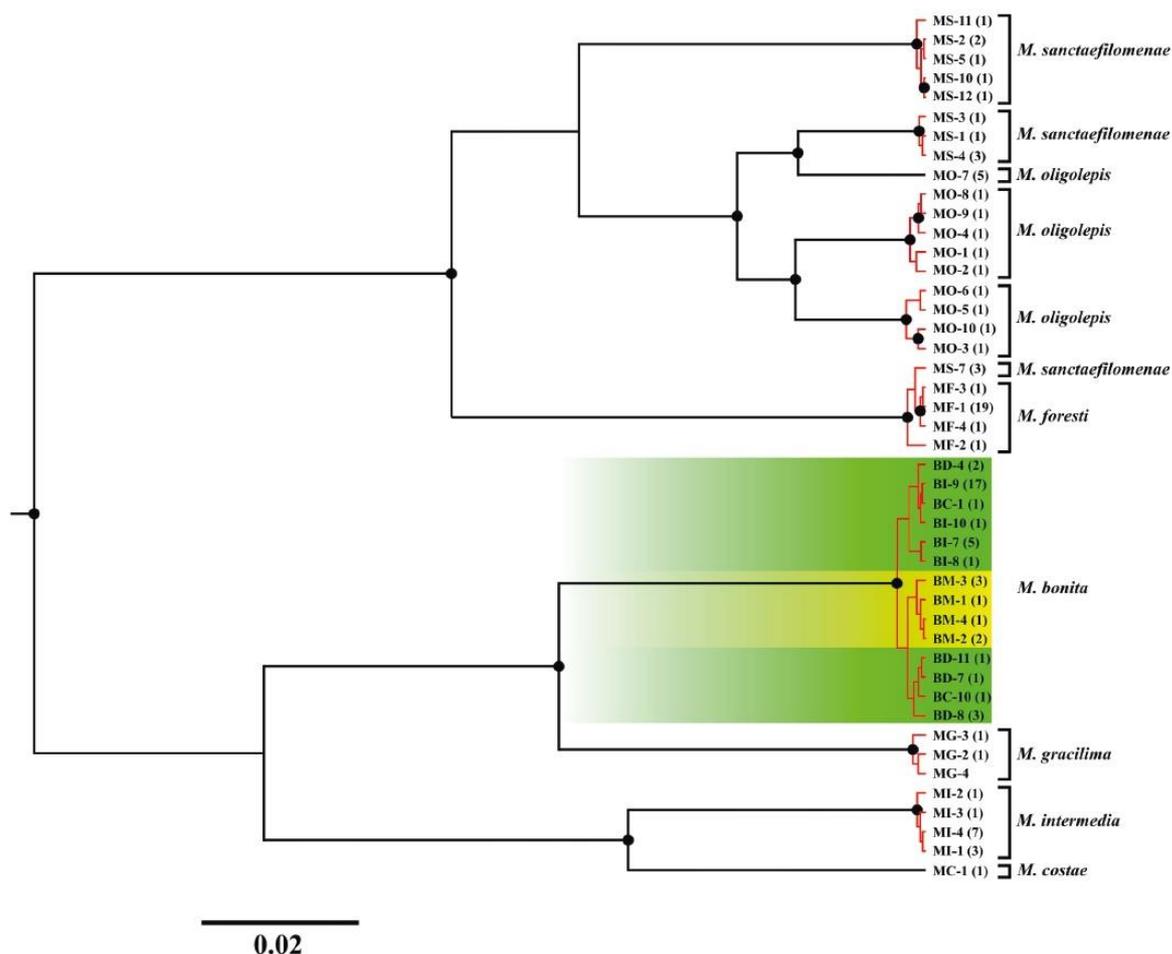


Figura 7. Árvore ultramétrica bayesiana do gene COI e delimitação de OTUs de *Moenkhausia*, de acordo com o teste GMYC (os espécimes em vermelho representam o mesmo cluster inferido pelo GMYC). Os círculos representam uma probabilidade a posteriori > 95%. Apenas as sequências do COI dos espécimes de *M. bonita* foram obtidas neste estudo, as demais foram obtidas no Genbank (Tabela SI). Verde: *Moenkhausia bonita* do alto rio Paraná. Amarelo: *Moenkhausia bonita* da localidade-tipo (MOTA et al., 2018).

No entanto, em um estudo mais abrangente para o gênero, Mariguela et al., (2013) utilizando sequências de genes mitocondriais (16S rRNA e cytb) e genes nucleares (Myh6, RAG1 e RAG2), comprovou que *Moenkhausia* é um grupo polifilético, pois todas as espécies por eles estudadas pertencem ao clado C, porém se distribuem em cinco grupos (clados) monofiléticos, nos quais há também a presença de outros gêneros diferentes (Figura 8), indicando a necessidade de uma ampla revisão para o grupo.

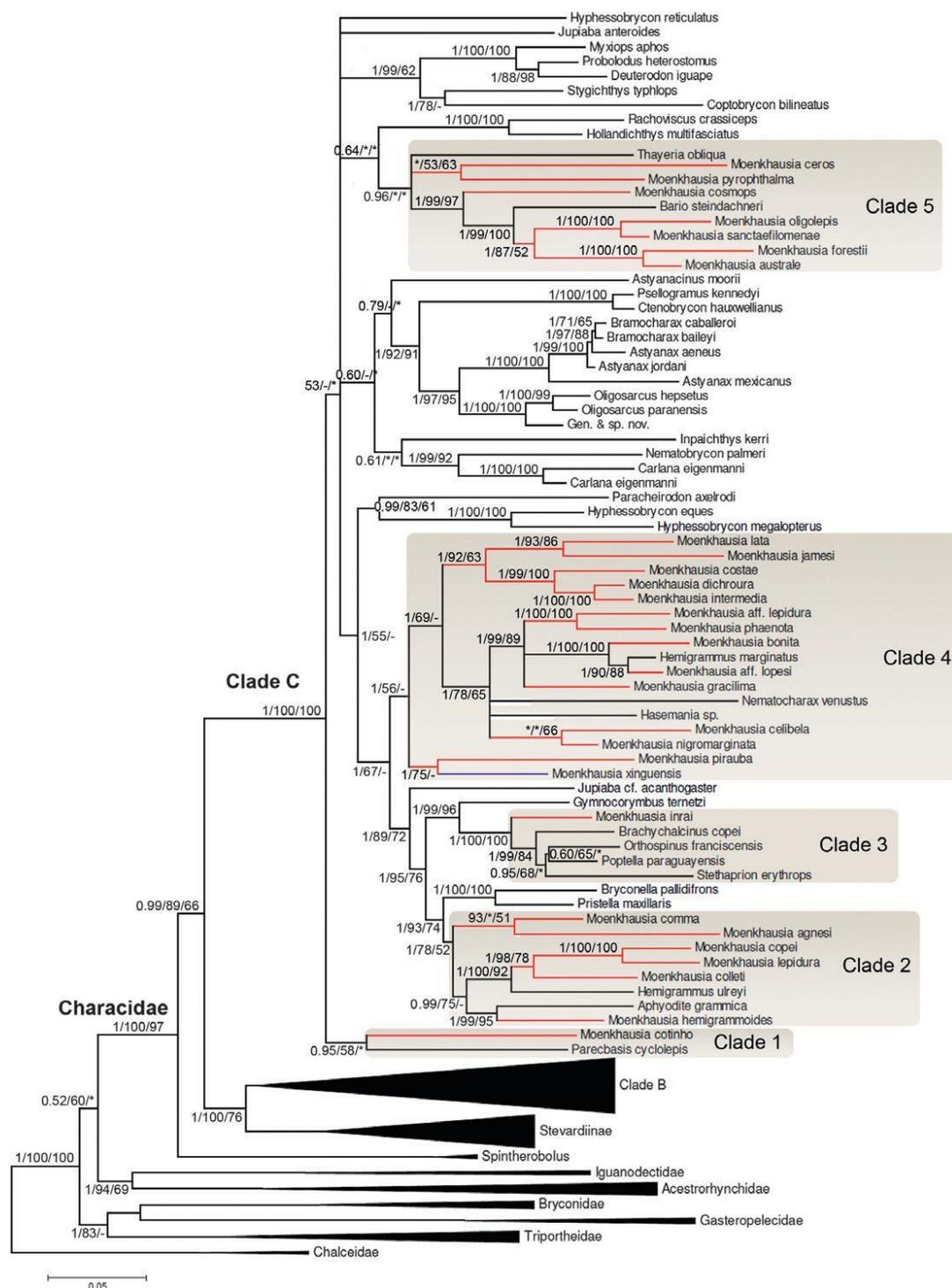


Figura 8. Árvore de resumo mostrando as relações entre as linhagens principais em Characidae, obtidas por uma análise particionada de máxima verossimilhança (ML) de o conjunto de dados concatenados e enfatizando a relação entre as espécies do Clade C, no qual todas as espécies de *Moenkhausia* estão distribuídas. Uma série de três números (por exemplo, 1/100/87) em cada um dos nós principais representam a probabilidade posterior para aquela divisão obtida na análise bayesiana (B), a porcentagem de suporte de bootstrap obtida por ML e a porcentagem de suporte de bootstrap obtida pela parcimônia máxima (MP) análise, respectivamente (1000 réplicas de bootstrap). Os travessões representam valores <0,5 (B) ou 50% (ML, MP). Os asteriscos representam nós que não foram obtidos pelo B ou MP análises. Os cladogramas marcados em vermelho correspondem às espécies de *Moenkhausia* diferentes de *M. xinguensis*, a espécie-tipo do gênero, que é colorido em azul (MARIGUELA et al., 2013).

4.3 Estudos citogenéticos convencionais e moleculares em *Moenkhausia sanctaefilomenae*

A espécie *Moenkhausia sanctaefilomenae* apresenta um número diploide de $2n = 50$ cromossomos, com predominância de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos (Figura 8), tal característica aparenta ser conservada para a espécie (PORTELA-CASTRO; JÚLIO-JÚNIOR, 2002; HASHIMOTO et al., 2012; FERNANDES; ALVES, 2017).

Os sítios evidenciados através da técnica impregnação por nitrato de prata da região organizadora de nucléolo (RON) apresentam-se bastante variáveis entre populações da espécie, por exemplo em estudos como de Fernandes e Alves (2017) expressos na figura 9, apenas o par cromossômico 24 foi marcado, o que caracteriza-se como sistema de RON simples, no entanto, em estudos com a mesma espécie de uma população pertencente à bacia do rio Tietê, em São Paulo, Hashimoto et al., (2012) encontrou resultados diferentes com metafases apresentando múltiplos sítios de RONs marcados, apesar de haver destacado apenas o par cromossômico número 6 como o principal portador do sítio RON ativo (Figura 10).

Os blocos de heterocromatina constitutiva evidenciados através do bandeamento-C estão localizados majoritariamente em regiões centroméricas e pericentroméricas (Figura 9), o que pode ser atribuído como uma característica altamente conservada para a espécie, podemos observar tal infomação por meio de diversos estudos para a espécie *M. sanctaefilomenae*, tais como os de Portela-Castro e Júlio-Júnior (2002), Dantas et al., (2007), Hashimoto et al., (2012) e Fernandes e Alves (2017).

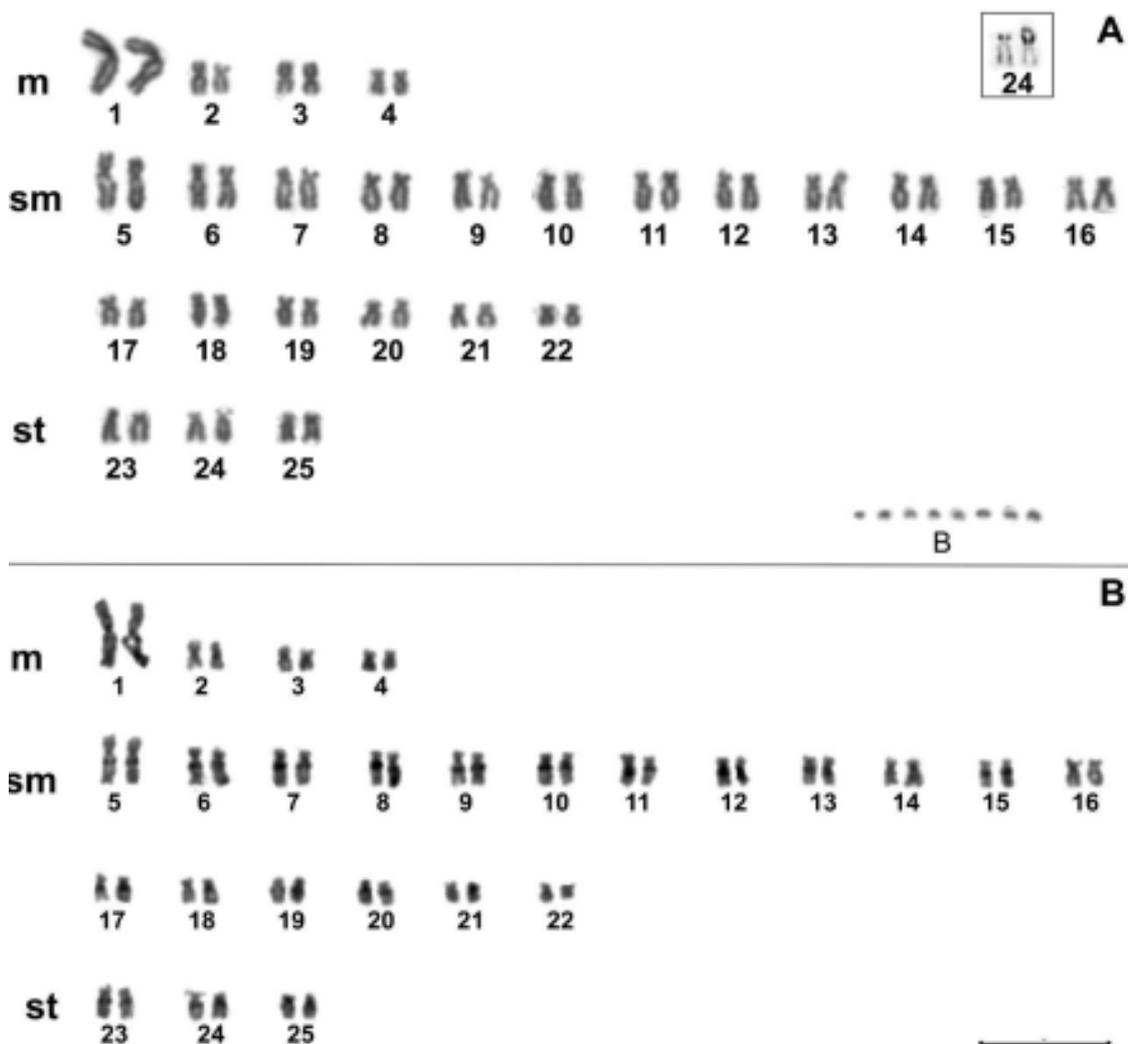


Figura 9. Cariótipos de *Moenkhausia sanctaefilomenae* corados com Giemsa em (a) e com banda C em (b). Destacado em (a) 8 microcromossomos B. Na caixa os cromossomos portadores da RON (par 24). Barra =10 μ m (FERNANDES e ALVES, 2017).

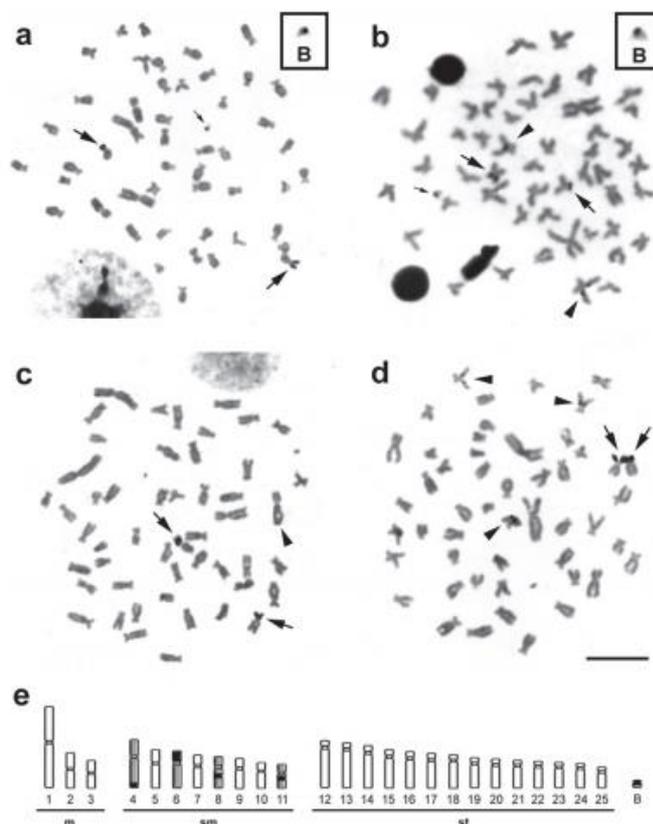


Figura 10. Metáfases de *Moenkhausia sanctaefilomenae* submetidos a coloração por Nitrato de prata. Em (a) e (b), as metáfases de um indivíduo mostram variação intraindividual de RONS ativos. As caixas exibem cromossomos B com atividade nucleolar. Em (c) e (d), metáfases de diferentes amostras demonstram variabilidade interindividual para as NORs. Em (e), a representação esquemática mostra os cromossomos portadores de NOR (4, 6, 8, 11 e B). As setas principais indicam os principais cromossomos portadores de NOR (cromossomos 6). As setas menores mostram a atividade nucleolar nos microcromossomos B (a) e (b). Pontas de flecha exibem RONS menores que demonstram um padrão variável de atividade em diferentes cromossomos. Barras = 10 μ m (HASHIMOTO et al., 2012).

Os estudos moleculares utilizando marcadores de DNAr 18S demonstram uma variação interpopulacional quanto a localização de tais sítios em *M. sanctaefilomenae*, por exemplo no estudo de Utsunomia et al., (2016) em uma população do rio Novo, em São Paulo, apenas o par cromossômico número 6 apresentou marcação no braço curto (Figura 11), já em outra população do rio Batalha, em São Paulo (estudadas pelo mesmo autor), várias marcações foram identificadas em regiões terminais dos pares cromossômicos número 13, 14, 15 e 17, além de marcações em apenas um cromossomo dos pares 2, 12, 20, 22, 24 e 25 (Figura 11). As múltiplas marcações de DNAr 18S encontradas são um possível indicativo de ocorrência de rearranjos cromossômicos que podem ter ocasionado a transposição e/ou dispersão do DNAr pelo genôma da espécie (DANTAS et al., 2007).

No mesmo estudo Utsunomia et al., (2016) utilizando marcadores para os genes de

DNAr 5S e histona H3 observou diferenças interpopulacionais quanto ao número de sítios, o que indica que não há uma conservação desse número na espécie. No entanto, as marcações para U2 snDNA se demonstraram com o mesmo padrão de distribuição cromossômica em ambas as populações (Figura 11).

Já os sítios de DNAs satélites (satDNAs) MS3 e MS7 são variáveis entre as populações, uma vez que para a população do rio Batalha 13 pares de cromossomos apresentaram marcações em regiões pericentroméricas do sítio MS3 e apenas 6 pares na população do rio Novo, além disso, os sítios de MS7 não variaram entre as populações, ambas apresentaram 15 pares de cromossomos com marcações em regiões teloméricas (pode ser observado figura 11 extraída do estudo de UTSUNOMIA et al., 2016).

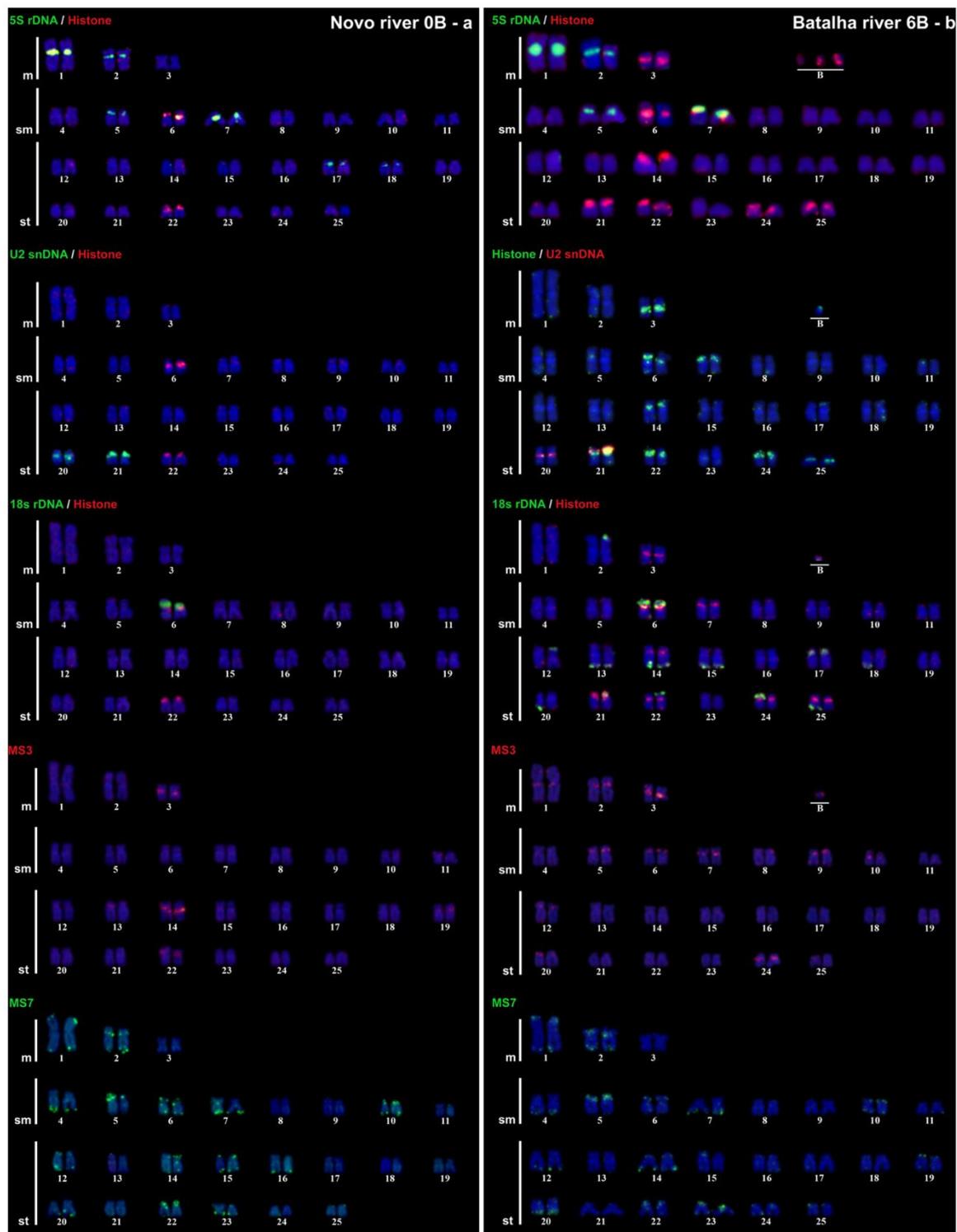


Figura 11. Cariótipos de *M. sanctaefilomenae* construídos a partir de células metafásicas mitóticas submetidas a FISH com diferentes sondas repetitivas de DNA.

a) População do rio Novo. b) População do rio Batalha. Observe a distribuição diferencial de genes de histonas H3 e clusters de DNAr 5S e 18S nos cromossomos A em ambas as populações (UTSUNOMIA et al., 2016).

4.4 Estudos dos cromossomos supranumerários em *Moenkhausia sanctaefilomenae*

A ocorrência de cromossomos B é frequente na espécie, variando de 0 a 8 cromossomos, seja inter ou intraindividual (Tabela 3), além disso, os cromossomos supranumerários apresentam diferentes padrões de bandas – C, com presença de cromossomos B eucromáticos, parcialmente heterocromático e totalmente heterocromáticos que sugere uma composição de DNA diferente nesses cromossomos, especialmente de sequências repetitivas (Figura 12) (HASHIMOTO et al., 2012).

No entanto, no estudo realizado por Fernandes e Alves (2017), em uma população da bacia do Alto Rio Paraná, os cromossomos B apresentaram-se totalmente eucromáticos, corroborando apenas parcialmente com os dados do estudo de Hashimoto et al., (2012), mostrando que também pode haver diferenças interpopulacional quanto a presença ou não de heterocromatina nesses elementos supranumerários.

Tabela 3 – Contagem de Metáfases para 13 espécimes de *Moenkhausia sanctaefilomenae* demonstrando a variação nos números do microcromossomo B.

Specimen identification	Number of B microchromosomes per cell									Number of cells counted
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	
849	6	12	22	-	-	-	-	-	-	40
852	2	32	36	10	-	-	-	-	-	80
853	9	70	-	-	-	-	-	-	-	79
857	3	3	6	10	9	9	2	-	-	42
887	-	3	12	22	4	2	7	13	2	65
888	-	6	6	41	5	10	-	-	-	68
889	-	3	12	63	11	3	-	-	-	92
1233	-	4	10	24	26	29	13	4	-	110
1235	1	6	31	79	15	8	-	-	-	140
1240	8	31	33	26	3	-	-	-	-	101
1241	9	137	175	4	-	-	-	-	-	325
1242	24	85	27	-	-	-	-	-	-	136
1246	5	25	4	5	4	1	-	-	-	44

Fonte: HASHIMOTO et al., 2012.

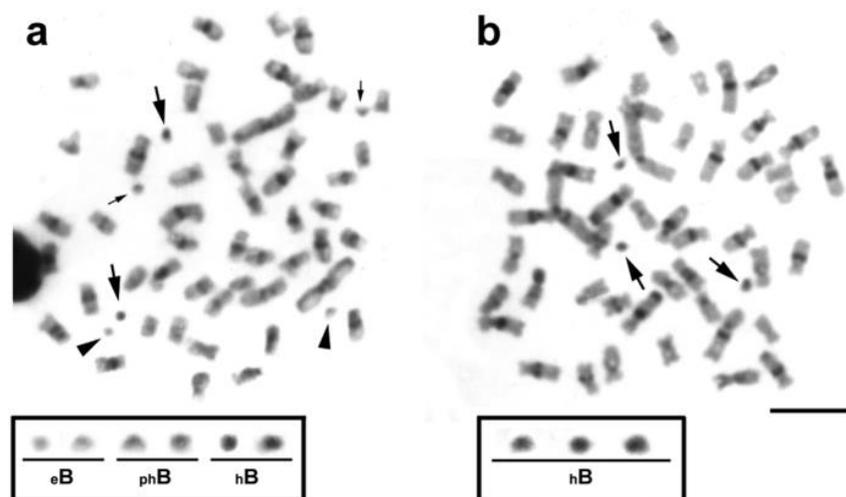


Figura 12. Metafases de espécimes de *Moenkhausia sanctaefilomenae* após técnica de bandeamento C. Em (a), a metafase mostra microcromossomos eucromáticos (e B), parcialmente heterocromáticos (ph B) e totalmente heterocromáticos (h B). Em (b), a metafase demonstra apenas cromossomos B heterocromáticos. As caixas mostram cromossomos B aumentados. Setas maiores e menores indicam microcromossomos B totalmente e parcialmente heterocromáticos, respectivamente. As pontas de seta exibem microcromossomos B eucromáticos. Barras = 10 μ m (HASHIMOTO et al., 2012)

Quanto os sítios de RON mostrados pela impregnação de nitrato de prata em cromossomos B, aparentemente não são estáveis na espécie, por exemplo, no estudo de Fernandes e Alves (2017) não houve sítios evidenciados por tal técnica, já na população da bacia do rio Tietê estudadas por Hashimoto et al., (2012) cromossomos B foram totalmente corados.

Porém, apesar de genes ribossômicos estarem presentes nos cromossomos B, a sonda de DNAr 18s evidencia sítios não ativos desse gene, também em uma população de *M. sanctaefilomenae* da bacia do rio Tietê (SCUDELER et al., 2015). Segundo o mesmo autor, os cromossomos B podem ter originado de cromossomos do complemento A portadores da NOR, através de possíveis rearranjos cromossômicos.

Buscando explicar a origem dos cromossomos B, Utsunomia et al., (2016) encontrou fortes evidências de que os cromossomos supranumerários da população por ele estudada teve origem de um único par, pois o par cromossômico número 6 apresentou todas as mesmas sequências repetitivas de DNA dos cromossomos B (genes de histonas H3, DNAr 18S e satDNAs MS3 e MS7), o que reforça a hipótese de que a origem dos cromossomos B se dá através cromossomos do complemento A (Figura 13).

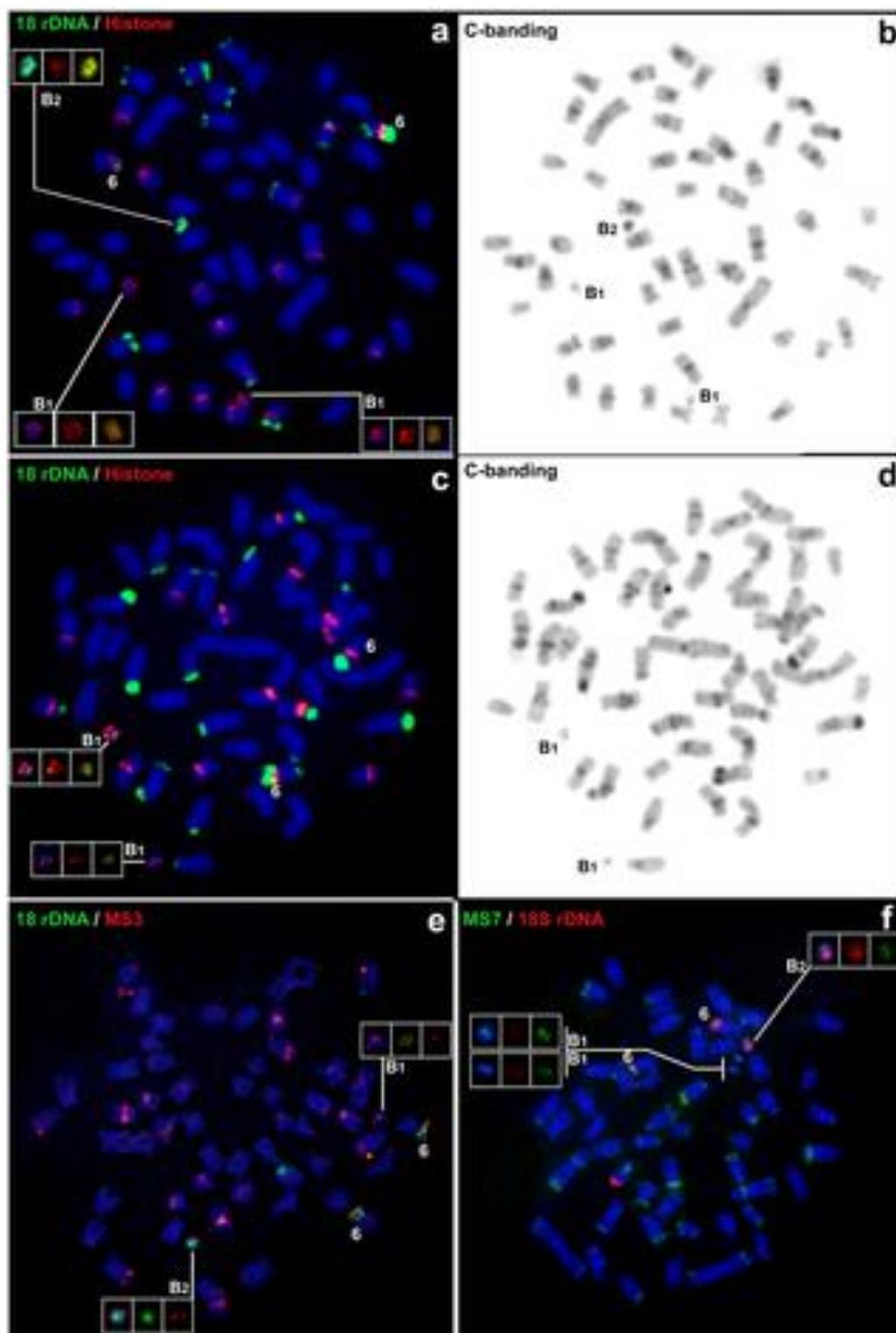


Figura 13. Placas de metafase *M. sanctaefilomenae* do rio Batalha após FISH com diferentes sondas repetitivas e bandamento C sequencial para mostrar o agrupamento de DNAr 18S, histonas H3 e satDNAs em diferentes cromossomos B. Observe que B 1 é eucromático mostrando pequenos blocos de DNAr 18S, e B 2 é heterocromático mostrando grandes quantidades de DNAr 18S (UTSUNOMIA et al., 2016).

5. CONCLUSÃO

Os estudos convencionais e moleculares no gênero *Moenkhausia* demonstram um cariótipo relativamente conservado, com predominância de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos. Já os sítios de DNAr 5S são notavelmente variáveis, demonstrando uma intensa dinâmica evolutiva destes sítios para o grupo. As marcações de DNAr 18S revalaram marcações simples em apenas um par cromossômico em grande parte das espécies, com exceção de *M. sanctaefilomenae*.

Com relação a filogenia do gênero, o grupo pode ser definido como polifilético, sendo necessário mais estudos com uma ampla revisão para *Moenkhausia*.

Os diversos estudos citogenéticos em *M. sanctaefilomenae* demonstram uma estabilidade do número diploide da espécie, porém, com relação a região organizadora de nucléolos (RON) evidenciadas com nitrato de prata, nota-se que há variação entre populações, algumas apresentam sistema de RON simples e outras múltiplas, porém sempre com apenas um par cromossômico com sítios ativos.

Entretanto, a heterocromatina constitutiva é bastante conservada em regiões centroméricas e pericentroméricas, o que aparentemente é característico da espécie.

Há evidências de que os cromossomos supranumerários, característicos da espécie, tenham surgido a partir de cromossomos do complemento A.

Apesar de existirem diversos estudos cromossômicos para a espécie, é notável que mais estudos que busquem explicar a origem dos cromossomos B se fazem necessários, incluindo estudos comparativos com populações de diferentes bacias hidrográficas, pois tais estudos podem contribuir com dados ainda mais sólidos sobre a origem e comportamento desses elementos no genôma de *M. sanctaefilomenae*.

REFERÊNCIAS

- ALANIS, J. G.; SARMA, S. S. S.; NANDINI, S. Prey selectivity and functional response by larval red-eyed tetra *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Steindachner, 1907) (Characiformes: Characidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 5, p. 1209-1216, 2009.
- BENINE, R. C.; MARIGUELA, T. C.; OLIVEIRA, C. New species of *Moenkhausia* Eigenmann, 1903 (Characiformes: Characidae) with comments on the *Moenkhausia oligolepis* species complex. **Neotropical Ichthyology**, v. 7, n. 2, p. 161-168, 2009.
- BENNEMANN, S. T.; CASATTI, L.; OLIVEIRA, D. C. Alimentação de peixes: proposta para análise de itens registrados em conteúdos gástricos. **Biota Neotropica**, v. 6, n. 2, p. 1-8, 2006.
- BERTOLLO, L. A. C.; CIOFFI, M. B.; GALLETI-JUNIOR, P. M.; FILHO, O. M. Contributions to the cytogenetics of the Neotropical fish fauna. **Comparative Cytogenetics**, v. 11, n. 4, p. 665, 2017.
- CAMACHO, J. P. M. Cromossomos B. In: **A evolução do genoma**. Academic Press, p. 223-286, 2005.
- CAMACHO, J. P. M.; SHARBEL, T. F.; BEUKEBOOM, L. W. Evolução do cromossomo B. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Série B: Ciências Biológicas**, v. 355, n. 1394, p. 163-178, 2000.
- DANTAS, E. S. O.; VICARI, M. R.; SOUZA, I. L.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L. A. C.; ARTONI, R. F. Cytotaxonomy And Karyotype Evolution In *Moenkhausia* Eigenmann, 1903 (Teleostei, Characidae). **The nucleus**, v. 50, n. 3, p. 505-518, 2007.
- FERNANDES, C. A.; ALVES, D. S. Occurrence of Multiple Euchromatic B Microchromosomes in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Pisces, Characidae) from the Upper Paraná River Basin, Brazil. **Cytologia**, v. 82, n. 5, p. 547-550, 2017.
- FRICKE, R.; ESCHMEYER, W. N.; FONG, J. D. Catalog of Fishes. Disponível em: <<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>> Acesso em 01 de março de 2020.
- GARCIA-AYALA, J. R. **Revisão Taxonômica da Subfamília Stethaprioninae (Teleostei: Characiformes, Characidae)**. 2018. 238 f. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências de Botucatu, 2018.
- HASHIMOTO, D. T.; VOLTOLIN, T. A.; PAES, A. D. N. V. A.; FORESTI, F.; BORTOLOZZI, J.; PORTO-FORESTI, F. Cytogenetic analysis of B chromosomes in one population of the fish *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Steindachner, 1907)(Teleostei, Characiformes). **Comparative Cytogenetics**, v. 6, n. 2, p. 141, 2012.
- PAIZ, L. M. **Citogenética como ferramenta no estudo da biodiversidade de lambaris (Characiformes: Characidae) coletados à jusante do Rio Iguaçu, Parque Nacional do Iguaçu, Brasil**. 2013. 79 f. Dissertação (mestrado)-Universidade Estadual do Oeste do

Paraná, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Cascavel, 2013.

LIMA, F. C. T.; MALABARBA, L. R.; BUCKUP, P. A.; DA SILVA, J. F. P.; VARI, R. P.; HAROLD, A. et al. Genera *incertae sedis* in Characidae. In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. E.; FERRARIS Jr., C. J., (Eds.). **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: Edipucrs. p. 106–169, 2003.

MARIGUELA, T. C.; BENINE, R. C.; ABE, K. T.; AVELINO, G. S.; OLIVEIRA, C. Molecular phylogeny of *Moenkhausia* (Characidae) inferred from mitochondrial and nuclear DNA evidence. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 51, n. 4, p. 327-332, 2013.

MIRANDE, J. M. Morfologia, moléculas e filogenia de Characidae (Teleostei, Characiformes). **Cladistics**, v. 35, n. 3, p. 282-300, 2019.

MORALLES, A. C.; RODRIGUES, T.; MACHADO, C. A. S. Análise do conteúdo estomacal de *Moenkhausia intermedia* (Eigenmann, 1908) (characiformes: characidae), proveniente da lagoa do diogo, bacia do rio Mogiguaçu, Luís Antônio, Estado de São Paulo. **Nucleus**, v. 6, n. 2, p. 1-14, 2009.

MOTA, T. F. M.; FABRIN, T. M. C.; DEPRÁ, G. C.; GASQUES, L. S.; OLIVEIRA, A. V.; PAVANELLI, C. S.; PRIOLI, S. M. A. P.; PRIOLI, A. J. Molecular characterization of *Moenkhausia* (Pisces: Characiformes) populations with different lateral line developmental levels. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 3, p. 2815-2825, 2018.

NASCIMENTO, C. N. **Descrição cariótica e novas ocorrências de cromossomos supranuméricos em *Moenkhausia Eigenmann, 1903* (Characiformes: Characidae)**. 2015. 56 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências de Botucatu, 2015.

OLIVEIRA, C.; AVELINO, G. S.; ABE, K. T.; MARIGUELA, T. C.; BENINE, R. C.; ORTÍ, G.; VARI, R. P.; CASTRO, R. M. C. Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. **BMC Evolutionary Biology**. v. 11, p. 275, 2011.

OLIVEIRA, V. A. M.; FRANCO, A. A.; SANTOS, R. C. D.; BORGES, F. V.; BORGES, M. J. D. S. Aspectos da dieta natural de duas espécies do gênero *Moenkhausia eigenmann, 1903* (Characiformes: Characidae) do Parna Juruena, Mato Grosso. **III Seminário de Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos. Cáceres**, v. 2, n. 1, 2015.

OTA, R. R.; DEPRÁ, G. C.; GRAÇA, W. F.; PAVANELLI, C. S. Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes: revised, annotated and updated. **Neotropical Ichthyology**, v. 16, n. 2, 2018.

PORTELA-CASTRO, A. L. B.; JÚLIO-JÚNIOR, H. F. Karyotype relationships among species of the subfamily Tetragonopterinae (Pisces, Characidae): Cytotaxonomic and evolution aspects. **Cytologia**. v. 67, p. 329-336, 2002.

ROSSINI, B. C.; OLIVEIRA, C. A. M.; MELO, F. A. G. D.; BERTACO, V. D. A.; ASTARLOA, J. M. D. D.; ROSSO, J.J. FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Highlighting *Astyanax*

species diversity through DNA barcoding. **PLoS ONE**. v. 11, p. 1-20, 2016.

SCUDELER, P. E. S.; DINIZ, D.; WASKO, A. P.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Whole chromosome painting of B chromosomes of the red-eye tetra *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Teleostei, Characidae). **Comparative Cytogenetics**, v. 9, n. 4, p. 661, 2015.

SERRANO, É. A. **Origens dos cromossomos B em espécies de Characidium (Characiformes, Crenuchidae) baseada em pintura cromossômica, sequências de rDNA e histonas**. 2013. 107 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências de Botucatu, 2013.

THOMAZ, A. T.; ARCILA, D.; ORTÍ, G.; MALABARBA L. R. Molecular phylogeny of the subfamily Stevardiinae Gill, 1858 (Characiformes: Characidae): classification and the evolution of reproductive traits. **BMC Evolutionary Biology**. v. 15, p.146, 2015.

TÓFOLI, R. M.; HAHN, N. S.; ALVES, G. H.; NOVAKOWSKI, G. C. Uso do alimento por duas espécies simpátricas de *Moenkhausia* (Characiformes, Characidae) em um riacho da Região Centro-Oeste do Brasil. **Iheringia, Série Zoologia**, v. 100, n. 3, p. 201-206, 2010.

UTSUNOMIA, R.; SILVA, D. M. Z. A.; RUIZ-RUANO, F. J.; ARAYA-JAIME, C.; PANSONATO-ALVES, J. C.; SCACCHETTI, P. C.; HASHIMOTO, D. T.; OLIVEIRA, C.; TRIFONOV, V. A.; PORTO-FORESTI, F.; CAMACHO, J. P. M.; FORESTI, F. Uncovering the ancestry of B chromosomes in *Moenkhausia sanctaefilomenae* (Teleostei, Characidae). **PLoS One**, v. 11, n. 3, p. 1-20, 2016.

VANEGAS-RÍOS, J. A.; BRITZKE, R.; MIRANDE, J. M. Geographic variation of *Moenkhausia bonita* (Characiformes: Characidae) in the rio de la Plata basin, with distributional comments on *M. intermedia*. **Neotropical Ichthyology**, v. 17, n. 1 p. 1-16, 2019.