



GOVERNO DO ESTADO DO PIAUÍ
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ-UESPI
CAMPUS ALEXANDRE ALVES DE OLIVEIRA
LICENCIATURA PLENA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



Breno Raphael Freitas de Medeiros

A Citogenética de *Astyanax lacustris* (Lütken, 1875)
Da Lagoa da Prata – Parnaíba, PI, Brasil

Parnaíba - PI

2025

Breno Raphael Freitas de Medeiros

A Citogenética de *Astyanax lacustris* da Lagoa da Prata – Parnaíba, PI, Brasil

Trabalho de conclusão de curso apresentado
ao curso de Licenciatura Plena em Ciências
Biológicas da Universidade Estadual do
Piauí como requisito parcial para a obtenção
do Título de Licenciado em Ciências
Biológicas.

Orientador (a): Alessandra Ribeiro Torres

Parnaíba - PI

2025

M488c Medeiros, Breno Raphael Freitas de.

A Citogenética de *Astyanax lacustris* (Lütken, 1875) Da Lagoa da Prata ? Parnaíba, PI, Brasil / Breno Raphael Freitas de Medeiros.
- 2025.

21f.: il.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Estadual do Piauí - UESPI, Licenciatura em Ciências Biológicas, campus Alexandre Alves de Oliveira, Parnaíba-PI, 2025.
"Orientador: Profª. Drª. Alessandra Ribeiro Torres".

1. RONs. 2. Marcadores Citogenéticos. 3. Characidae. I. Torres, Alessandra Ribeiro. II. Título.

CDD 570

Ficha elaborada pelo Serviço de Catalogação da Biblioteca da UESPI

GRASIELLY MUNIZ OLIVEIRA (Bibliotecário) CRB-3^a/1067

Breno Raphael Freitas de Medeiros
A Citogenética de *Astyanax lacustris* da Lagoa da Prata - Parnaíba, PI, Brasil

Aprovação em: 14/ 06/ 2025

Banca Examinadora

Documento assinado digitalmente
 ALESSANDRA RIBEIRO TORRES
Data: 09/07/2025 20:42:23-0300
Verifique em <https://validar.itid.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Alessandra Ribeiro Torres
Presidente

Documento assinado digitalmente
 FILIPE AUGUSTO GONCALVES DE MELO
Data: 10/07/2025 07:51:52-0300
Verifique em <https://validar.itid.gov.br>

Prof. Dr. Filipe Augusto Gonçalves de Melo
Membro da banca

Documento assinado digitalmente
 LUIZ CARLOS GUILHERME
Data: 09/07/2025 21:00:15-0300
Verifique em <https://validar.itid.gov.br>

Dr. Luiz Carlos Guilherme
Membro da banca

Dedico este trabalho primeiramente a Deus que me proporcionou dias com muita saúde, a minha família pelo apoio incondicional e a mim que em inúmeras vezes se manteve firme até conseguir chegar ao fim da montanha.

Agradecimentos

- Ao Laboratório de Ecologia Aquática - LEA/UFDPar, em especial a Giovanna Ruceline pelo tempo disponibilizado e auxílio.
- Ao IFPI - Instituto Federal do Piauí - Campus Parnaíba – Curso de Química por disponibilização de reagentes.
- Ao Sr. João Batista Almeida Sousa, motorista da UESPI que esteve em todas as coletas apoiando e nos levando.
- Ao meu pai que ajudou na pesca dos exemplares para dar início ao trabalho.
- Ao Sr José Armando de Oliveira – morador próximo a Lagoa da Prata – que ajudou na pesca dos exemplares e disponibilizou de seu tempo para que esse trabalho fosse concluído.
- À minha melhor amiga Vitória, que esteve comigo desde o primeiro dia de laboratório ajudando-me em tudo que precisei e por ter tido paciência comigo.
- À minha amiga Elane que abdicou seu tempo para me ajudar a concluir o trabalho.
- Aos meus amigos que conheci na faculdade, sou grato pela experiência compartilhada com todos eles e em especial aos amigos de sala e de vida, Vitória, Felipe, Kauê e Ramon que fez os dias mais leves.
- À minha orientadora Alessandra Ribeiro Torres por me guiar e apresentar a área de pesquisa que cada vez fico mais apaixonado. Sou grato por aquilo de mais valioso que alguém pode ter, o conhecimento.

Resumo

A espécie *Astyanax lacustris* (Characidae) é amplamente distribuída nas bacias hidrográficas da América do Sul e pertence ao complexo *Astyanax bimaculatus*, caracterizado pela presença de mancha umeral. Este estudo teve como objetivo caracterizar citogeneticamente a população de *Astyanax lacustris* da Lagoa da Prata, localizada no município de Parnaíba, Piauí, com foco na determinação do número diplóide e padrão de regiões organizadoras do nucléolo (AgRONs). As análises revelaram número diplóide modal constante de $2n = 50$ cromossomos, sem distinção entre machos e fêmeas, indicando estabilidade cromossômica entre os exemplares analisados. A impregnação por nitrato de prata evidenciou a presença de múltiplos sítios AgRONs, contrastando com o padrão simples descrito em populações de outras regiões do Brasil. Este polimorfismo pode estar associado a pressões seletivas distintas impostas pelas condições ambientais do semiárido nordestino, sugerindo variações adaptativas e possível plasticidade genômica. Os dados obtidos contribuem para o conhecimento da diversidade cromossômica de *A. lacustris*, ressaltando a importância de estudos citogenéticos em populações de diferentes regiões geográficas para a compreensão da estrutura genética e da evolução dos peixes neotropicais.

Palavras-chave: RONs, marcadores citogenéticos, Characidae

Abstract

Astyanax lacustris (Characidae) is widely distributed in South American river basins and belongs to the *Astyanax bimaculatus* complex, characterized by the presence of a humeral spot. This study aimed to cytogenetically characterize a population of *Astyanax lacustris* from Lagoa da Prata, located in the municipality of Parnaíba, Piauí, Brazil, focusing on the determination of diploid number, nucleolus organizer regions (AgNORs) pattern. The analyses revealed a consistent diploid number of $2n = 50$ chromosomes in all specimens, with no differences between sexes, indicating chromosomal stability within the population. Silver nitrate staining revealed the presence of multiple AgNOR sites, in contrast to the simple patterns previously described in populations from other regions of Brazil. This polymorphism may be associated with distinct selective pressures imposed by the semi-arid environmental conditions of the Northeast region, suggesting adaptive variations and possible genomic plasticity. The findings contribute to the understanding of chromosomal diversity in *A. lacustris*, highlighting the importance of regional cytogenetic studies to better comprehend the genetic structure and evolutionary dynamics of Neotropical fish species.

Keywords: NORs, Cytogenetics markers, Characidae

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- <i>Astyanax lacustris</i> medindo 7,4cm, coletado na Lagoa da Prata, Parnaíba (PI).	10
Figura 2- Metáfase de <i>Astyanax lacustris</i> , contendo 50 cromossomos.	
15	
Figura 3- Metáfase e núcleo interfásico corada com nitrato de prata (AGNO3).	
16	

10

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS.....	12
2.1 Objetivo geral	12
2.2 Objetivos específicos	12
3 MATERIAL E MÉTODOS	13
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	14
5 CONCLUSÃO	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18

1 INTRODUÇÃO

A família Characidae constitui um dos grupos de peixes de água doce mais diversos do mundo, com aproximadamente 1.200 espécies descritas, distribuídas em numerosos gêneros. Seus membros apresentam ampla distribuição geográfica, ocorrendo desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Patagônia. As maiores concentrações de diversidade da família encontram-se nas grandes bacias hidrográficas sul-americanas, particularmente nos sistemas dos rios Amazonas, Orinoco e La Plata, que abrigam uma riqueza de espécies notavelmente superior à observada em outras regiões do continente (Mirande, 2010).

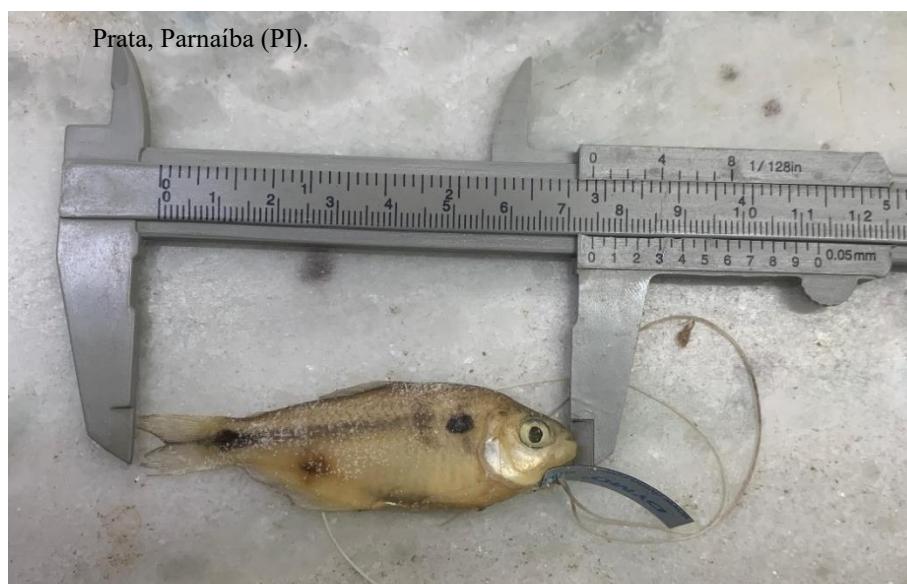
Entre os gêneros de destaque dentro de Characidae, sobressai-se *Astyanax*, um dos mais diversos e amplamente distribuídos, presente em praticamente todas as bacias hidrográficas da América Central e do Sul (Mirande, 2010; Oliveira *et al.*, 2011). Historicamente, a espécie *Astyanax lacustris* foi incluída no complexo *Astyanax bimaculatus*, grupo que contém cerca de 22 espécies sendo algumas delas: *Astyanax abramis*, *A. jacuhiensis*, *A. paraguayensis*, se estendendo por quase todas as drenagens da América do Sul e tem sido objeto de extensos estudos ecológicos, morfológicos e biogeográficos (Lucena e Soares, 2016).

Contudo, revisões filogenéticas recentes demonstraram que o gênero *Astyanax*, conforme anteriormente delimitado, não constitui um grupo monofilético (Terán, Benítez e Mirande, 2020). Como resultado, diversas espécies — em especial aquelas pertencentes aos grupos *scabripinnis* e *fasciatus* foram formalmente transferidas para o gênero *Psalidodon*. Já o grupo *Astyanax bimaculatus*, que inclui *Astyanax lacustris*, foi reconhecido como um clado distinto, porém mantido dentro do gênero *Astyanax* (Terán, Benítez e Mirande, 2020).

Astyanax lacustris possui ampla distribuição geográfica, com ocorrência confirmada em diversas bacias hidrográficas da América do Sul, incluindo os sistemas dos rios São Francisco, La Plata e Paraná (Tonello *et al.*, 2022).

Segundo análises morfológicas realizadas por (Lucena e Soares, 2016), *Astyanax lacustris* apresenta um corpo moderadamente alto e ligeiramente alongado. A espécie possui uma dentição composta por 4 a 6 dentes na série principal, com variação morfológica. A linha lateral é completa, apresentando entre 30 a 39 escamas. O comprimento máximo registrado pelos autores foi de 84,8 mm. Destaca-se a presença de uma mancha umeral preta com formato oval, acompanhada por duas barras verticais de coloração marrom na região umeral (Figura 1). Sua dieta é indicada como onívora, de acordo com informações apresentadas pelos autores. Além disso, foi observado que os machos maduros apresentam ganchos ósseos nas nadadeiras pélvicas e anal, estrutura que está ausente nas fêmeas (Lucena e Soares, 2016).

Figura 1- *Astyanax lacustris* medindo 7,4cm, coletado na Lagoa da



Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Sabemos que a classe mais rica em espécie de vertebrados são os peixes, essa diversidade é devido aos 500 milhões de anos de evolução e por isso, o estudo da ictiocitogenética é de extrema importância, para melhor entendimento da evolução das espécies, da variabilidade genética e a determinação do cariótipo (Rossi, 2021).

A citogenética constitui um campo essencial voltado à análise dos cromossomos, isoladamente ou em conjunto, em diferentes níveis de condensação. Suas investigações abrangem aspectos como, organização estrutural, dinâmica funcional, mecanismos de replicação, além de padrões de variação e trajetórias evolutivas. Nas últimas décadas, essa área tem ganhado destaque, sobretudo por permitir a detecção de alterações numéricas e estruturais frequentemente associadas a processos adaptativos. Na ictiocitogenética, tais modificações adquirem relevância particular devido à notável plasticidade do genoma, que resulta em mudanças cromossômicas. Essa característica favorece eventos evolutivos que impulsionam a diversificação tanto intraespecífica e interespecífica. Nesse cenário, sua utilização revela-se não apenas como ferramenta diagnóstica, mas como instrumento valioso para compreender os mecanismos responsáveis pela especiação e biodiversidade. O acúmulo de dados tem ampliado significativamente o conhecimento sobre a evolução dos peixes, além de oferecer subsídios importantes para estratégias de conservação, especialmente em regiões com alta diversidade e endemismo. Dessa forma, a citogenética, por ser uma ciência básica, fornece subsídios para várias outras e suas aplicações, tais como biologia comparada, sistemática e conservação da ictiofauna (Guerra, 1988; Cioffi *et al.*, 2018).

O gênero *Astyanax* apresenta grupos com características citogenéticas particulares. No grupo *Astyanax bimaculatus*, por exemplo, todas as espécies analisadas possuem número

diploide constante de $2n = 50$ cromossomos e um par metacêntrico de grande tamanho, considerado uma simpiesiomorfia (característica ancestral que não distingue um grupo de outro) herdada da família Characidae (Kavalco *et al.*, 2011). Apesar dessa estabilidade no número cromossômico, há ampla variação nas fórmulas cariotípicas, observada entre diferentes espécies do grupo e em populações da mesma espécie (Kavalco *et al.*, 2009). Essas variações são importantes, já que podem ajudar a distinguir espécies crípticas do complexo por meio de marcadores cromossômicos. (Paiz *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2016; Gavazzoni *et al.*, 2018), por exemplo, as RONs podem ser múltiplas ou simples em populações diferentes. Essa variabilidade também pode ser observada na heterocromatina, encontrada em regiões pericentromérica, terminal e intersticial. (Paiz *et al.*, 2015). Para entendermos a variabilidade desse grupo, são utilizadas técnicas da citogenética que nos possibilitam facilitar a distinção entre espécies, além da taxonomia. Entre elas podemos citar o bandeamento cromossômico como por exemplo coloração com fluorocromos base-específicos e hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sonda de rDNA 18S e 28S (Paiz *et al.*, 2015).

Estudos anteriores revelaram que *Astyanax lacustris* possui um número diploide de $2n = 50$ cromossomos, com fórmula cariotípica $10m + 24sm + 6st + 10a$ e $FN = 90$ (Tonello *et al.*, 2022). Entretanto, outros estudos evidenciam a ocorrência de variação cromossômica intraespecífica, com populações apresentando um número diploide de $2n = 48$ cromossomos (*Astyanax asuncionensis*, sinônimo de *Astyanax lacustris*), citótipo $6m + 10sm + 16st + 16a$ e $NF = 80$ (Giongo *et al.*, 2012). Essas diferenças sugerem a presença de uma diversidade citogenética considerável dentro da espécie, possivelmente associada a variações geográficas e processos de especiação críptica.

Neste estudo, registra-se a ocorrência de *Astyanax lacustris* na Lagoa da Prata, um corpo d'água lêntico que integra a bacia hidrográfica do rio Parnaíba, no estado do Piauí. A lagoa está situada no bairro Igaraçu, no município de Parnaíba, a aproximadamente 10 km do centro urbano, e possui relevante importância ecológica, econômica e social para a região. Esse ambiente abriga uma comunidade ribeirinha cuja principal fonte de renda e subsistência está diretamente associada à pesca artesanal, tanto para consumo próprio quanto para fins comerciais (Cunha; Rocha; Perinotto, 2015; Melo *et al.* 2016). Além disso, a Lagoa da Prata desempenha um papel significativo na manutenção da biodiversidade local, atuando como habitat natural para diversas espécies de peixes, incluindo representantes do gênero *Astyanax*. A caracterização citogenética dessas populações contribui não apenas para a compreensão da diversidade genética regional, mas também para subsidiar estratégias de manejo e conservação dos recursos pesqueiros locais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Investigar as características citogenéticas de *Astyanax lacustris*, da população da Lagoa da Prata (Parnaíba, PI), comparando com populações descritas anteriormente.

2.2 Objetivos específicos:

- Definir o número de cromossomos da população em estudo.
- Definir o padrão de distribuição de AgNORs em *A. lacustris*.
- Comparar os dados obtidos no presente trabalho, com estudos anteriores, em população do mesmo gênero nas demais regiões do Brasil.

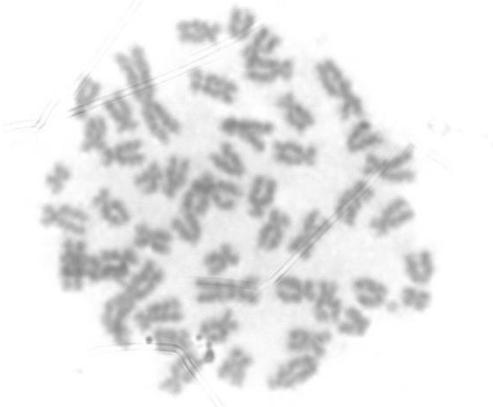
3 MATERIAL E MÉTODOS

Os exemplares *Astyanax lacustris* foram coletados na Lagoa da Prata (-2.970792,41.786726), município de Parnaíba (PI), com uma tarrafa de malha de 1,5cm. Foram coletados 10 espécimes por coleta e mantidos em aquários aerados até o momento da eutanásia. O lisado bacteriano BronchoVaxon 0,7% (granulado, 3,5mg – TAKEDA) (1,0mL/100g do peso do peixe) foi injetado intraperitonealmente para estimular a produção de células sanguíneas e após 21 horas aplicou-se colchicina 0,0125% (1,0mL/100g do peso do peixe) para interromper as células em metáfase. Alguns exemplares foram enviados para o Laboratório de Ictiologia da UESPI, Campus Alexandre Alves de Oliveira, no município de Parnaíba (PI) para identificação. Para obter os cromossomos mitóticos e determinar o número de cromossomos, utilizou-se a técnica descrita por Bertollo, Takahashi e Moreira-Filho (1978); com modificações. Após a aplicação intraperitoneal de solução de colchicina, realizou-se a eutanásia dos peixes que foram anestesiados com benzocaína (100mg/mL), de acordo com a Resolução nº 714 CFMV (2002). Seus rins cefálicos foram retirados e colocados em uma placa de Petri com solução de cloreto de Potássio 0,75M para hipotonização das células. O material fixado em uma solução de metanol/ácido acético de proporção 3:1, foi armazenado em tubos plásticos de 2mL em freezer -20°C. Pingou-se uma pequena porção da amostra em uma lâmina de vidro, corada com Giemsa 5% por 10 minutos e analisada em microscópio óptico (MO), utilizando a objetiva de 100x. Para a detecção das NORs, o material foi submetido a tratamento com as soluções de nitrato de Prata 50% e gelatina 2%, e levado à estufa aquecida a 65°C por aproximadamente 15 minutos. Depois de lavar a lâmina em água corrente e secá-la ao ar, a amostra foi analisada em MO, conforme a técnica descrita por Howell e Black (1980), com algumas modificações.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos na análise citogenética dos exemplares de *Astyanax lacustris* coletados na Lagoa da Prata, observou-se um número diplóide modal de $2n = 50$ cromossomos, sem distinção de sexo (figura 2). Tal constatação sugere a ausência de variação cromossômica intraespecífica nos indivíduos analisados nesta localidade.

Figura 2- Metáfase de *Astyanax lacustris*, contendo 50 cromossomos.

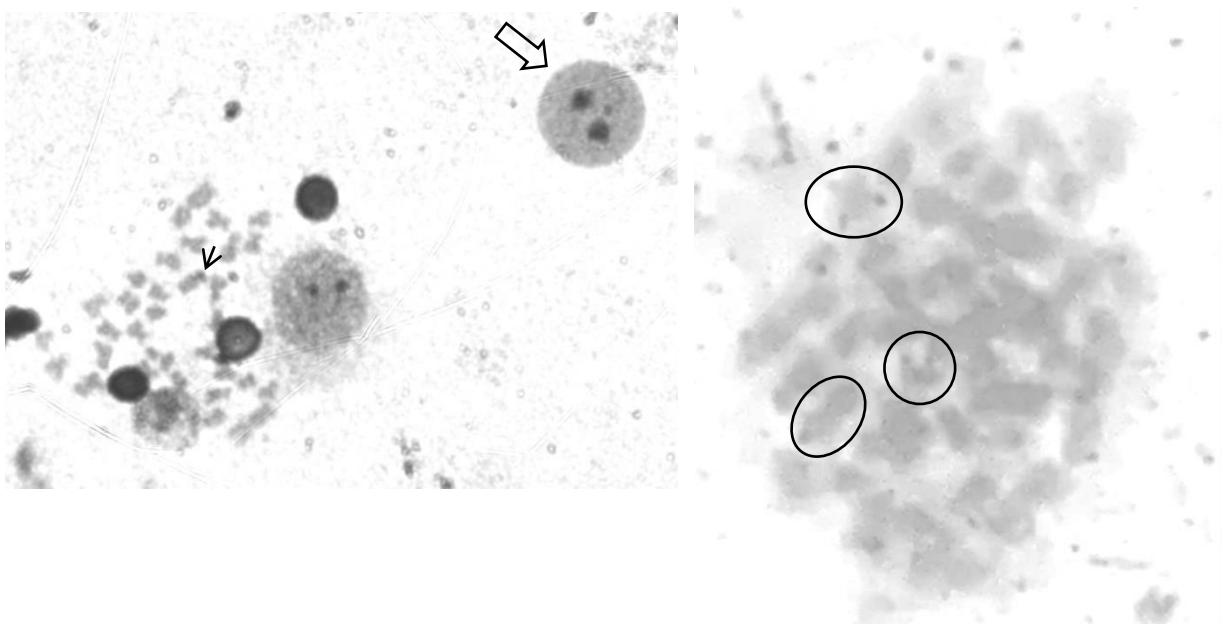


Fonte: Elaborado pelo autor (2025).

Esses dados estão em conformidade com estudos anteriores realizados com populações morfologicamente semelhantes, atribuídas ao mesmo táxon. As populações oriundas de Paraitinga (Salesópolis, SP – Alto Rio Tietê) e Pilar do Sul (SP – Rio Paranapanema), apresentaram a mesma contagem cromossômica de $2n = 50$ em todas as amostras (Kavalco *et al.*, 2011). Resultados similares foram encontrados em indivíduos coletados em quatro pontos distintos da Lagoa de Itaipu (Santa Helena, PR), os quais também apresentaram número diplóide constante de $2n = 50$ (Tonello *et al.* (2022). Contudo, na população do córrego São José, microbacia do Rio Sepotuba (Tangará da Serra, MT), foram encontrados três citótipos, sendo um com $2n = 48$ cromossomos e dois com 50 cromossomos, porém fórmulas cariotípicas diferentes; evidenciando a diversidade cariotípica regional (Giongo *et al.* (2012).

Adicionalmente, a distribuição das RONs, reveladas por impregnação com nitrato de Prata, associadas aos genes ribossômicos 18S revelaram padrões variáveis entre RONs simples e múltiplas, localizadas predominantemente em regiões teloméricas (Neto *et al.* (2009).

Figura 3– Metáfase e núcleo interfásico corada com nitrato de Prata (Ag-NO_3). Em “A”, a seta fina destaca o cromossomo marcado e a larga o núcleo com três nucléolos. Em “B” os círculos destacam os cromossomos marcados.



Fonte: Elaborada pelo autor (2025).

No presente estudo, observou-se a presença de RONs múltiplas, com apenas um cromossomo marcado, na figura 3''A'' e 3 cromossomos marcados na figura 3''B''. O nucléolo é formado por DNA ribossômico, que forma as regiões organizadoras de nucléolo, RNA ribossômico recémformado e proteínas relacionadas à transcrição. Assim, quando a célula está em interfase, as RON se associam formando os nucléolos. Por isso, quando temos mais de dois nucléolos, podemos afirmar que temos mais de duas RONs e consequentemente mais de um par de cromossomos portadores dessa região (Figura 3''A'').

Estudos anteriores indicam que *Astyanax lacustris* apresenta, predominantemente, um padrão simples de regiões organizadoras do nucléolo (AgNOR) (Tonello *et al.*, 2022; Gavazzoni *et al.*, 2018; Paiz *et al.* 2015). No entanto, o presente estudo identificou um padrão distinto, caracterizado pela ocorrência de múltiplos sítios AgNOR, evidenciando um polimorfismo citogenético na população analisada. Tal variação pode estar associada a processos adaptativos decorrentes das diferentes condições ambientais às quais as populações estão submetidas. Enquanto os registros anteriores referem-se a exemplares provenientes das regiões Sul e Sudeste do Brasil, a população aqui analisada é oriunda da Região Nordeste, onde o clima semiárido e os fatores ecológicos locais impõem pressões seletivas distintas. Essas diferenças ambientais podem influenciar mecanismos regulatórios e estruturais dos cromossomos, incluindo alterações na expressão e localização de genes ribossomais, refletindo em variabilidade intraespecífica. Assim, os dados sugerem que a diversidade cromossômica observada pode estar relacionada a processos microevolutivos e à plasticidade genômica da espécie frente a diferentes contextos ecológicos.

5 CONCLUSÃO

Esse estudo evidencia a estabilidade do número diplóide ($2n = 50$) nos exemplares de *Astyanax lacustris* da Lagoa da Prata, em Parnaíba (PI), corroborando com dados já descritos para outras populações da espécie em diferentes regiões do Brasil. No entanto, a detecção de polimorfismo nas regiões organizadoras do núcleo (RONs), com a presença de múltiplos sítios AgNOR, revela uma importante variabilidade citogenética intraespecífica, ainda pouco documentada para populações do Nordeste brasileiro. Tal variação pode refletir adaptações a condições ecológicas específicas da região. A diversidade nos padrões de RONs observada reforça a plasticidade genômica de *A. lacustris* e aponta para a relevância de estudos citogenéticos como ferramenta auxiliar na compreensão da estrutura populacional, dinâmica evolutiva e possíveis processos de especiação criptica. Assim, este trabalho contribui com dados inéditos para a citogenética da ictiofauna nordestina e destaca a importância de investigações regionais para o aprimoramento do conhecimento sobre a biodiversidade genética dos peixes neotropicais. Considerando a variabilidade nos padrões de RONs detectada em *Astyanax lacustris*, recomenda-se a continuidade das investigações por meio da aplicação da técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH), utilizando sondas específicas para genes ribossomais (como 18S e 5S rDNA) e outros elementos repetitivos. A utilização dessa abordagem permitirá uma caracterização mais precisa da distribuição e organização cromossômica desses marcadores, contribuindo para a identificação de possíveis diferenças estruturais entre populações e os potenciais processos de diferenciação populacional e especiação criptica. Esses dados poderão fornecer subsídios relevantes para a compreensão da estrutura genética de *A. lacustris*, especialmente em populações do Nordeste brasileiro, ainda pouco exploradas sob a perspectiva citogenética.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERTOLLO, L. A. C., TAKAHASHI, C. S., MOREIRA-FILHO, O. Citotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erytrinidae). **Braz. J. of Gen.**, v: 1 (2). p. 103-120, 1978.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. **RESOLUÇÃO Nº 714**, de 20 de junho de 2002. Módulo II – Ética e Profissões.

CUNHA, J. M. A.; ROCHA, R. R. N.; PERINOTTO, A. R. C. O desenvolvimento do turismo rural com perspectivas sustentáveis para a comunidade Lagoa da Prata – Parnaíba/Piauí. **Revista de Turismo Contemporâneo**, [S. l.], v. 3, n. 1, 2015.

SILVA, L. L. L. *et al.* Chromosomal characterization in two species of an *Astyanax bimaculatus* complex (Characidae, Characiformes) using different techniques of chromosome banding. **Cytotechnology**, v. 68, p. 1277–1286, 2016. DOI: 10.1007/s10616015-9888-3. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10616-015-9888-3>. Acesso em: 10 jun. 2025.

CIOFFI, M. B. *et al.* Conventional Cytogenetic Approaches—Useful and Indispensable Tools in Discovering Fish Biodiversity. **Curr Genet Med Rep**, v. 6, p. 176–186, sep.2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40142-018-0148-7>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40142-018-0148-7>. Acesso em: 09 jun. 2025.

NETO, M. F. *et al.* Comparative cytogenetics among populations of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae, Incertae sedis). **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, n. 4, p. 792-796, oct. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1415-47572009005000078>. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1415-47572009005000078>. Acesso em: 05 jun. 2025.

GIONGO, P. *et al.* Diversidade cariotípica de *Astyanax asuncionensis* (Teleostei, Characiformes) na microbacia do rio Sepotuba (Alto Paraguai). **Evolução e Conservação da Biodiversidade**, Rio Paranaíba, Vol. 3., n. 2, p. 53-58, ago./ dez. 2012. DOI: 10.7902/ecb.v3i2.9 Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/265728043_Karyotipic_diversity_of_Astyanax_asuncionensis_Teleostei_Characiformes_from_Sepotuba_river_microbasin_Upper_Paraguai_basin. Acesso em: 10 jun. 2025.

GAVAZZONI, M. *et al.* Morphologically cryptic species of the *Astyanax bimaculatus* “caudal peduncle spot” subgroup diagnosed through cytogenetic characters. **Zebrafish**, v. 00, p. 382–88, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1089/zeb.2018.1574>. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/324426338_Morphologically_Cryptic_Species_of_the_Astyanax_bimaculatus_Caudal_Peduncle_Spot_Subgroup_Diagnosed_Through_Cytogenetic_Characters. Acesso em: 05 jun. 2025.

TERÁN, G. E.; BENITEZ, M. F.; MIRANDE, J. M. Opening the Trojan horse: phylogeny of *Astyanax*, two new genera and resurrection of *Psalidodon* (Teleostei: Characidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, V. 190, p. 1217–1234, apr. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlaa019>. Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/340715967_Opening_the_Trojan_horse_phylogeny_of_Astyanax_two_new_genera_and_resurrection_of_Psalidodon_Teleostei_Characidae. Acesso em: 10 jun. 2025.

HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Controlled silverstaining of nucleolus organizer regions with a protective coloidae developer: a 1-step method. **Experientia**, v.36, n.8, p. 1014-1015, jan. 1980.

KAVALCO, K. F. *et al.* *Astyanax hastatus* Myers, 1928 (Teleostei, Characidae): a new species complex within the genus *Astyanax*? **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, n. 3, p. 477-483, jul. 2009. DOI:10.1590/S1415-47572009005000055. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/51187898_Astyanax_hastatus_Myers_1928_Teleostei_Characidae_A_new_species_complex_within_the_genus_Astyanax. Acesso em: 11 jun. 2025.

KAVALCO, K. F. *et al.* Comparative Cytogenetics and Molecular Phylogeography in the Group *Astyanax altiparanae* – *Astyanax aff. bimaculatus* (Teleostei, Characidae). **Cytogenetic and Genome Research**, v. 134, p. 108-119, may. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1159/000325539>. Disponível em: <https://karger.com/cgr/articleabstract/134/2/108/61594/Comparative-Cytogenetics-andMolecular?redirectedFrom=fulltext>. Acesso em: 10 jun. 2025.

Lucena, C. A; Soares, H. G. Review of species of the *Astyanax bimaculatus* caudal peduncle spot
subgroup sensu Garutti & Langeani (Characiformes, Characidae) from the rio La Plata and rio São Francisco drainages and coastal systems of southern Brazil and Uruguay. **Zootaxa**. 2016 Jan 28;4072(1):101-25. doi: 10.11646/zootaxa.4072.1.5. PMID: 27395912.

Melo, F. A; *et al.* (2017). Fish fauna of the lower course of the Parnaíba river, northeastern Brazil. **Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão**. 38. 363-400.

MIRANDE, J. M. Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. **Neotropical Ichthyology**, v. 8, n. 3, p. 385–568, jan. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1679-62252010000300001>. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/307168728_Phylogeny_of_the_family_Characidae_Teleostei_Characiformes_from_characters_to_taxonomy. Acesso em: 10 jun. 2025.

Oliveira, C. *et al.* 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. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-275>. Disponível em: <https://bmcecoevol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2148-11-275>. Acesso em: 10 jun. 2025.

PAIZ, L. M. *et al.* Basic cytogenetics and physical mapping of ribosomal genes in four *Astyanax* species (Characiformes, Characidae) collected in middle Paraná River, Iguassu National Park: Considerations on taxonomy and systematics of the genus. **Comp Cytogenet**, v. 9, p. 51–65, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v9i1.9002>. Disponível em: <https://compcytogen.pensoft.net/articles.php?id=4703>. Acesso em: 08 jun. 2025.

ROSSI, A.R. Fish Cytogenetics: Present and Future. **Genes** **2021**, v. 12, n. 7, p. 983, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes12070983>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4425/12/7/983>. Acesso em: 05 jun. 2025.

TONELLO, S. *et al.* High rDNA polymorphisms in *Astyanax lacustris* (Characiformes: Characidae): new insights about the cryptic diversity in *A. bimaculatus* species complex with emphasis on the Paraná River basin. **Neotrop Ichthyol**, v. 20, 2 ed., 2022. DOI: <https://doi.org/10.1590/1982-0224-2021-0147>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/ni/a/rRRYBXPB7yLy446nvSdJDSy/?lang=en>. Acesso em: 10 jun. 2025.