



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE BRAGANÇA
INSTITUTO DE ESTUDOS COSTEIROS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MURILO FURTADO DO ROSÁRIO

**CARACTERIZAÇÃO COMPARATIVA DOS GENOMAS MITOCONDRIAIS DE
Anableps anableps (LINNAEUS, 1958) E *Anableps microlepis* (MÜLLER E
TROSCHER, 1844) (CYPRINODONTIFORMES: ANABLEPIDAE)**

BRAGANÇA/PA

2026

MURILO FURTADO DO ROSÁRIO

**CARACTERIZAÇÃO COMPARATIVA DOS GENOMAS MITOCONDRIAIS DE
Anableps anableps (LINNAEUS, 1958) E *Anableps microlepis* (MÜLLER E
TROSCHER, 1844) (CYPRINODONTIFORMES: ANABLEPIDAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará – UFPA, *Campus* Universitário de Bragança como requisito final para obtenção de título de licenciada pelo curso de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Nazareno Vallinoto de Souza.

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Petry Corrêa de Sousa.

Coorientadora: Ma. Carla Denise Bessa de Brito.

BRAGANÇA/PA

2026

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F992 Furtado do Rosário, Murilo.
CARACTERIZAÇÃO COMPARATIVA DOS GENOMAS
MITOCONDRIAIS DE *Anableps anableps* (LINNAEUS, 1958) E
Anableps microlepis (MÜLLER E TROSCHER, 1844)
(CYPRINODONTIFORMES: ANABLEPIDAE) / Murilo Furtado
do Rosário. — 2026.

vi, 50 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Marcelo Nazareno Vallinoto de Souza

Coorientador(a): Prof. Dr. Rodrigo Petry Corrêa de Sousa

Trabalho de Curso (Graduação) - Universidade Federal do Pará,
Campus Universitário de Bragança, Faculdade de Ciências
Biológicas, Bragança, 2026.

1. Genética Molecular. 2. Mitogenomas. 3. NGS. 4.
Estuários. 5. Peixe-quatro-olhos. I. Título.

CDD 576

MURILO FURTADO DO ROSÁRIO

**CARACTERIZAÇÃO COMPARATIVA DOS GENOMAS MITOCONDRIAIS DE
Anableps anableps (LINNAEUS, 1958) E *Anableps microlepis* (MÜLLER E
TROSCHER, 1844) (CYPRINODONTIFORMES: ANABLEPIDAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará – UFPA, *Campus* Universitário de Bragança como requisito final para obtenção de título de licenciada pelo curso de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas.

Data da aprovação: 20/07/2026.

Conceito: Excelente.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Marcelo Nazareno Vallinoto de Souza
Orientador - Instituto de Estudos Costeiros/UFPA

Profª. Dra. Aurycéia Jaquelyne Guimarães da Costa
Examinadora Externa - Faculdade de Ciências Médicas/AFYA Bragança

Profª. Ma. Wanny Pâmela Gomes de Lima
Examinadora Externa - Instituto de Estudos Costeiros/UFPA

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais que não mediram esforços para a realização da minha conclusão, bem como aos meus amigos do Laboratório de Evolução, por todo apoio e amparo ao longo desses anos.

AGRADECIMENTOS

A Biologia me cativou desde a infância, desde que tive contato com um casal de grandes pesquisadores e professores, o Prof. Dr. Horácio Schneider e a Prof.^a Dra. Iracilda Sampaio, com os quais pude acompanhar, ainda que brevemente, alguns trabalhos com diversos grupos, como peixes, anfíbios e macacos. Com isso, consegui admirar e entender ainda mais o valor da Biologia na minha vida. Por meio dessas pessoas, que para mim foram amigos incríveis e tão próximos que se tornaram família, mas que também foram, para muitos, professores inesquecíveis, posso me sentir mais realizado com a Biologia e suas belezas, seja no laboratório ou no cotidiano da minha vida. Espero poder aprender e repassar os mais diversos conhecimentos.

Agradeço à minha família, à minha mãe, Maria Natalícia, e ao meu pai, Ricardo, que sempre me incentivaram a seguir os exemplos do Prof. Dr. Horácio Schneider e da Prof.^a Dra. Iracilda Sampaio, nos estudos e na vida. Eles tentaram ao máximo fazer com que eu e minhas irmãs concluíssemos a faculdade. Com isso, faço do sonho deles o meu sonho e o torno real ao ser o filho mais novo e também concluir esta primeira fase do ensino superior.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcelo Nazareno Vallinoto de Souza, e aos meus coorientadores, Prof. Dr. Rodrigo Petry Corrêa de Sousa e Ma. Carla Denise Bessa Brito, agradeço pela oportunidade e pela orientação dedicada ao longo deste trabalho, mas, principalmente, pela paciência, que foi fundamental para a concretização desta pesquisa.

Agradeço também à Universidade Federal do Pará, ao Campus Universitário de Bragança, ao Instituto de Estudos Costeiros, à Faculdade de Ciências Biológicas e, em especial, ao Laboratório de Evolução e a todos os seus integrantes que participaram desta pesquisa.

RESUMO

Nas últimas décadas, o desenvolvimento das tecnologias de Sequenciamento de Nova Geração (NGS), aliado ao avanço de ferramentas bioinformáticas para montagem, anotação e validação de genomas, ampliou significativamente a obtenção de mitogenomas completos, possibilitando análises comparativas da organização gênica, composição nucleotídica, uso de códons, rearranjos e relações filogenéticas em peixes. Apesar desse avanço, a disponibilidade de genomas mitocondriais completos ainda permanece desigual entre os representantes de Teleostei. Na ordem Cyprinodontiformes, embora algumas famílias estejam relativamente bem representadas, outras ainda apresentam escassez de informações mitogenômicas, limitando estudos comparativos e inferências sobre sua história evolutiva. Entre elas destaca-se a família Anablepidae, cujos representantes apresentam adaptações morfológicas e ecológicas singulares, mas permanecem pouco estudados sob a perspectiva genômica. As espécies *Anableps anableps* e *Anableps microlepis*, popularmente conhecidas como tralhotos ou peixes-de-quatro-olhos, apresentam uma adaptação ocular única, caracterizada pela divisão horizontal da córnea e da retina, que permite visão simultânea acima e abaixo da superfície da água. Essas espécies habitam ambientes estuarinos e costeiros da costa norte da América do Sul, desempenham importante papel ecológico nas cadeias tróficas e apresentam potencial como bioindicadoras de alterações ambientais. Entretanto, até o momento, inexistiam descrições de seus genomas mitocondriais completos. Diante dessa lacuna, este trabalho propõe a caracterização dos mitogenomas completos de *A. anableps* e *A. microlepis*. Para isso, os genomas foram montados, anotados e caracterizados quanto à sua organização estrutural, composição nucleotídica e conteúdo gênico, sendo comparados com outros representantes de Cyprinodontiformes para investigar suas relações evolutivas. Os resultados ampliam a representatividade da família Anablepidae em bancos de dados públicos e fornecem uma base para futuros estudos em filogenia, filogeografia, genética da conservação e evolução dos genomas mitocondriais de peixes estuarinos.

Palavras-chave: Genética Molecular; Mitogenomas; NGS; Estuários; Peixe-quatro-olhos.

ABSTRACT

Over the last decades, the development of Next-Generation Sequencing Technologies (NGS), combined with advances in bioinformatics tools for genome assembly, annotation, and validation, has greatly expanded the availability of complete mitochondrial genomes, enabling comparative analyses of gene organization, nucleotide composition, codon usage, gene rearrangements, and phylogenetic relationships in fishes. Despite these advances, the availability of complete mitochondrial genomes remains uneven among teleost lineages. Within the order Cyprinodontiformes, although some families are relatively well represented, others still lack comprehensive mitogenomic data, limiting comparative studies and inferences regarding their evolutionary history. Among these, the family Anablepidae stands out due to its representatives exhibiting unique morphological and ecological adaptations while remaining poorly studied from a genomic perspective. The species *Anableps anableps* and *Anableps microlepis*, commonly known as four-eyed fishes, display a remarkable ocular adaptation characterized by the horizontal division of the cornea and retina, allowing simultaneous vision above and below the water surface. These species inhabit estuarine and coastal environments along the northern coast of South America, play an important ecological role in trophic webs, and have potential as bioindicators of environmental disturbances. However, until now, no complete mitochondrial genomes had been described for these species. To address this gap, the present study provides the complete mitochondrial genome characterization of *A. anableps* and *A. microlepis*. Their mitogenomes were assembled, annotated, and characterized with respect to structural organization, nucleotide composition, and gene content, and subsequently compared with other representatives of Cyprinodontiformes to investigate their evolutionary relationships. The resulting data expand the representation of the family Anablepidae in public databases and provide a valuable genomic resource for future studies on phylogeny, phylogeography, conservation genetics, and the evolution of mitochondrial genomes in estuarine fishes.

Keywords: Molecular Genetics; Mitogenomes; NGS; Estuaries; Four-eyed fish.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	7
1. INTRODUÇÃO GERAL	8
1.1 A importância do genoma mitocondrial em estudos evolutivos	8
1.2 Mitogenômica em peixes e na ordem Cyprinodontiformes	9
1.3 A família Anablepidae e o gênero <i>Anableps</i>	11
2. JUSTIFICATIVA	13
3. OBJETIVOS	14
3.1 Objetivo geral	14
3.2 Objetivos específicos	14
REFERÊNCIAS	14
CAPÍTULO II	18
RESUMO.....	19
1. INTRODUÇÃO	20
2. MATERIAL E MÉTODOS	22
3. RESULTADOS	25
4. DISCUSSÃO	34
5. CONCLUSÕES.....	38
6. AGRADECIMENTOS	38
7. DECLARAÇÃO DE DISPONIBILIDADE DE DADOS	38
8. CONFLITOS DE INTERESSE.....	38
REFERÊNCIAS	39
MATERIAL SUPLEMENTAR	45
CAPÍTULO III	46
1. CONSIDERAÇÕES FINAIS	47

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 A importância do genoma mitocondrial em estudos evolutivos

As mitocôndrias são organelas responsáveis pela maior parte da produção de energia nas células eucarióticas por meio da fosforilação oxidativa (Nunnari; Suomalainen, 2012; Spinelli; Haigis, 2018). Além da produção de ATP, as mitocôndrias participam de processos fundamentais, como a regulação da apoptose, o metabolismo de lipídios, a homeostase do cálcio intracelular e a geração de espécies reativas de oxigênio, desempenhando papel essencial na manutenção da fisiologia celular (Nunnari; Suomalainen, 2012; Spinelli; Haigis, 2018).

Outra característica única das mitocôndrias é a presença de um genoma próprio, denominado DNA mitocondrial (mtDNA), cuja organização é altamente conservada na maioria dos vertebrados (Miya *et al.*, 2013; Satoh *et al.*, 2016). Esse genoma corresponde a uma molécula circular de dupla fita, com aproximadamente 16 a 17 kb, composta por 37 genes, sendo 13 genes codificadores de proteínas envolvidos na cadeia respiratória, 22 genes transportadores de RNA (tRNAs), dois genes ribossômicos (12S e 16S rRNA) e uma região controle rica em elementos regulatórios associados à replicação e à transcrição (Boore, 2006; Miya *et al.*, 2013). Em peixes teleósteos, essa arquitetura é amplamente conservada, embora variações na ordem gênica e na organização estrutural tenham sido registradas em diferentes linhagens, fornecendo importantes informações sobre sua história evolutiva (Satoh *et al.*, 2016).

Comparado ao genoma nuclear, o DNA mitocondrial apresenta características que o tornam especialmente útil em estudos evolutivos, como: a herança predominantemente materna; a ausência ou reduzida ocorrência de recombinação; o elevado número de cópias por célula; e uma taxa de substituição nucleotídica geralmente superior à do DNA nuclear que favorece a recuperação de sinais evolutivos em diferentes escalas temporais (Avice, 2000; Galtier *et al.*, 2009). Essas propriedades fizeram do mtDNA um dos conjuntos de marcadores moleculares mais utilizados em estudos de sistemática, filogenia, filogeografia, genética de populações, delimitação de espécies e biologia da conservação, permitindo inferir padrões de diversificação, conectividade populacional e processos históricos responsáveis pela distribuição da biodiversidade (Avice, 2000; Ballard; Whitlock, 2004).

Nas últimas duas décadas, o desenvolvimento das tecnologias de Sequenciamento de Nova Geração (Next-Generation Sequencing/NGS) revolucionou os estudos genômicos ao permitir a obtenção rápida e econômica de milhões de sequências de DNA simultaneamente (Goodwin; McPherson; McCombie, 2016; Mardis, 2017). Essa mudança reduziu significativamente os custos de sequenciamento e tornou possível obter genomas mitocondriais

completos de modo prático e rápido, ampliando consideravelmente a disponibilidade de dados mitogenômicos para organismos não modelo (Goodwin; McPherson; McCombie, 2016; Heather; Chain, 2016). Associado ao avanço de ferramentas bioinformáticas específicas para montagem, anotação e validação de genomas mitocondriais, o NGS passou a desempenhar papel central na caracterização da diversidade genômica de diferentes grupos de vertebrados (Bernt *et al.*, 2013; Afgan *et al.*, 2018).

Com esse crescente número de mitogenomas disponíveis em bases públicas, tornou-se possível realizar análises comparativas cada vez mais robustas, envolvendo composição nucleotídica, uso preferencial de códons, organização gênica, regiões não codificadoras e padrões de rearranjos gênicos (Satoh *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2024). Essas informações têm contribuído para esclarecer relações filogenéticas controversas, identificar marcadores moleculares diagnósticos e compreender mecanismos associados à evolução dos genomas mitocondriais em diferentes grupos taxonômicos (Miya; Nishida, 2015; Satoh *et al.*, 2016).

Apesar do expressivo avanço da mitogenômica nos últimos anos, muitas linhagens de peixes neotropicais ainda permanecem subamostradas quanto à disponibilidade de genomas mitocondriais completos. Essa lacuna limita comparações evolutivas mais abrangentes e reduz a disponibilidade de marcadores moleculares para estudos filogenéticos e populacionais. Nesse contexto, a montagem e a caracterização de novos mitogenomas representam uma importante fonte de informações para a compreensão da evolução molecular, da organização genômica e da diversificação das espécies, além de fornecerem uma base para investigações em genética evolutiva, taxonomia e conservação (Miya; Nishida, 2015; Li *et al.*, 2024).

1.2 Mitogenômica em peixes e na ordem Cyprinodontiformes

Os peixes representam o grupo mais diverso entre os vertebrados, compreendendo mais da metade de todas as espécies viventes descritas (Fricke; Eschmeyer; Van der Laan, 2026). Dentre eles, os Teleostei constituem a maior radiação evolutiva, ocupando praticamente todos os ambientes aquáticos e exibindo ampla diversidade morfológica, fisiológica e ecológica (Near *et al.*, 2012; Hughes *et al.*, 2018). Essa grande diversificação adaptativa tem despertado grande interesse em estudos de sistemática, evolução e biogeografia, tornando os peixes um dos principais modelos para investigações filogenéticas baseadas em dados mitogenômicos, que têm permitido a reconstrução das relações evolutivas entre linhagens, sendo marcadores mais informativos do que genes mitocondriais analisados isoladamente (Miya; Nishida, 2015; Nelson; Grande; Wilson, 2016).

A organização do genoma mitocondrial dos teleósteos é, em geral, altamente conservada, apresentando os 37 genes característicos dos vertebrados distribuídos em uma molécula circular de aproximadamente 16 a 17 kb (Miya *et al.*, 2013; Satoh *et al.*, 2016). Entretanto, estudos comparativos têm demonstrado que algumas linhagens exibem rearranjos gênicos, duplicações, inversões e modificações em regiões não codificadoras, características que podem representar importantes sinapomorfias e contribuir para o entendimento da evolução molecular em peixes (Miya; Nishida, 2015; Li *et al.*, 2024). Além da arquitetura gênica, parâmetros como composição nucleotídica, viés no uso de códons, estruturas secundárias de RNAs transportadores e padrões de seleção natural também têm sido amplamente empregados para investigar processos evolutivos em diferentes grupos de Teleostei (Li *et al.*, 2024).

Entre os teleósteos, a ordem Cyprinodontiformes destaca-se por reunir espécies com grande diversidade ecológica e reprodutiva, distribuídas predominantemente em ambientes dulcícolas, estuarinos e costeiros das regiões tropicais e subtropicais (Pohl *et al.*, 2015). O grupo compreende organismos adaptados a diferentes condições ambientais, incluindo espécies anuais, vivíparas e eurialinas, que têm sido amplamente utilizados em pesquisas sobre evolução, desenvolvimento, ecologia e genética (Reznick *et al.*, 2017). Estudos filogenéticos baseados em caracteres morfológicos e moleculares contribuíram significativamente para o entendimento das relações internas da ordem, embora diversos aspectos de sua história evolutiva ainda permaneçam em discussão (Reznick *et al.*, 2017; Helmstetter *et al.*, 2020).

Apesar do crescimento expressivo da disponibilidade de mitogenomas em peixes, a cobertura taxonômica dentro de Cyprinodontiformes ainda é escassa. Enquanto algumas famílias contam com diversas espécies sequenciadas e caracterizadas, outras permanecem representadas por poucos ou nenhum genoma mitocondrial completo. Essa limitação reduz o potencial de análises comparativas envolvendo evolução da arquitetura mitocondrial, padrões de rearranjos gênicos e reconstruções filogenéticas mais abrangentes, dificultando a compreensão dos processos evolutivos responsáveis pela diversificação desse importante grupo de peixes. Estudos recentes ressaltam que a ampliação da amostragem mitogenômica continua sendo uma das principais demandas para o avanço do conhecimento sobre a evolução dos Cyprinodontiformes (Li *et al.*, 2024; Rodríguez-Machado *et al.*, 2024).

Entre as famílias ainda pouco representadas em estudos mitogenômicos destaca-se Anablepidae, cujos representantes apresentam adaptações morfológicas, fisiológicas e reprodutivas singulares entre os teleósteos (Watanabe *et al.*, 2014). Embora pesquisas envolvendo ecologia, reprodução e genética populacional tenham contribuído para ampliar o conhecimento sobre essas espécies, informações referentes à organização completa de seus

genomas mitocondriais permanecem escassas (Nascimento; Assunção, 2008; Watanabe *et al.*, 2014; Mescouto *et al.*, 2023). Essa lacuna limita comparações evolutivas com outros representantes de Cyprinodontiformes e reforça a importância da obtenção e caracterização de novos mitogenomas, especialmente para espécies neotropicais de interesse ecológico e evolutivo, como *Anableps anableps* e *Anableps microlepis*.

1.3 A família Anablepidae e o gênero *Anableps*

A família Anablepidae é composta atualmente por três gêneros (*Anableps*, *Jenynsia* e *Oxyzygonectes*) e 19 espécies reconhecidas, distribuídas desde o sul do México até o sudeste da América do Sul (Fricke; Eschmeyer; Van der Laan, 2026). Embora relativamente pequena quando comparada a outras famílias de Cyprinodontiformes, Anablepidae representa um dos grupos mais peculiares da ictiofauna neotropical devido às suas adaptações morfológicas, fisiológicas e reprodutivas, que refletem a ocupação de ambientes costeiros e estuarinos altamente dinâmicos (Nelson; Grande; Wilson, 2016; Fricke; Eschmeyer; Van der Laan, 2026).

Entre os representantes da família, o gênero *Anableps* destaca-se por apresentar adaptações únicas entre os vertebrados aquáticos e conhecidos popularmente como tralhosos ou peixes-de-quatro-olhos, denominação associada à característica mais marcante do gênero: a divisão horizontal da córnea e da retina, permitindo a formação simultânea de imagens acima e abaixo da superfície da água (Perez *et al.*, 2017). O gênero compreende três espécies válidas: *Anableps dowii* (Gill, 1861), distribuída ao longo da costa do Pacífico, desde o sul do México até a Guatemala, e *Anableps anableps* (Linnaeus, 1758) e *Anableps microlepis* (Müller; Troschel, 1844), ambas distribuídas na costa atlântica do norte da América do Sul, ocorrendo desde a Venezuela até o litoral norte brasileiro, especialmente nos estados do Amapá, Pará, Maranhão e Piauí (Nascimento; Assunção, 2008; Fricke; Eschmeyer; Van der Laan, 2026).

As espécies do gênero habitam preferencialmente regiões de manguezais, estuários e áreas costeiras influenciadas pelas marés, sendo consideradas eurialinas por tolerarem amplas variações de salinidade ao longo do ciclo de vida (Nascimento; Assunção, 2008; Mescouto *et al.*, 2023). Pesquisas realizadas no estuário amazônico mostram que *A. anableps* e *A. microlepis* vivem frequentemente em simpatria, formando cardumes mistos, embora apresentem diferenças na utilização dos habitats ao longo do ciclo hidrológico (Nascimento; Assunção, 2008). Enquanto *A. microlepis* tende a predominar em períodos de maior salinidade, *A. anableps* torna-se mais abundante durante a estação chuvosa, quando ocorre maior influência de água doce (Nascimento; Assunção, 2008). Essas diferenças sugerem estratégias ecológicas

distintas relacionadas à tolerância ambiental e ao uso dos recursos disponíveis nos estuários amazônicos (Nascimento; Assunção, 2008; Mescouto *et al.*, 2023).

Embora não apresentem grande importância comercial, as espécies de *Anableps* desempenham relevante papel ecológico nos ecossistemas estuarinos, participando das cadeias tróficas como consumidores de algas, invertebrados bentônicos e pequenos organismos aquáticos (Mescouto *et al.*, 2023). Além disso, estudos recentes têm indicado seu potencial como organismos bioindicadores, uma vez que apresentam elevada fidelidade aos ambientes estuarinos e respondem às alterações provocadas por impactos antrópicos, como poluição, expansão urbana, turismo, pesca e degradação dos manguezais (Figueiredo *et al.*, 2019; Guedes; Correia, 2021). A captura incidental durante a pesca artesanal, associada às modificações ambientais que vêm ocorrendo na costa amazônica, reforça a necessidade de ampliar o conhecimento sobre a biologia dessas espécies, fornecendo subsídios para estratégias de conservação e manejo dos ecossistemas costeiros (Figueiredo *et al.*, 2019; Guedes; Correia, 2021; Mescouto *et al.*, 2023).

Nas últimas décadas, estudos envolvendo marcadores moleculares começaram a revelar aspectos importantes da diversidade genética de *Anableps*. Watanabe *et al.* (2014), utilizando sequências da região controle do DNA mitocondrial, identificaram quatro linhagens mitocondriais distintas de *A. anableps* distribuídas ao longo da costa norte brasileira, sugerindo que oscilações do nível do mar durante o Pleistoceno, associadas à baixa capacidade de dispersão da espécie e ao comportamento residente em estuários, desempenharam papel importante na estruturação genética das populações. Apesar desses avanços, o conhecimento genômico do grupo permanece bastante limitado, sendo os estudos concentrados em marcadores mitocondriais parciais, sem informações sobre a organização completa dos genomas mitocondriais.

Nesse contexto, propostas visando a obtenção e a caracterização dos genomas mitocondriais completos de *A. anableps* e *A. microlepis* representam um avanço significativo para o conhecimento da biologia molecular da família Anablepidae. Além de ampliar a disponibilidade de dados genômicos para um grupo ainda pouco representado em bancos de dados públicos, essas informações poderão contribuir para estudos filogenéticos, filogeográficos e taxonômicos, bem como para investigações sobre evolução da arquitetura mitocondrial, identificação de marcadores moleculares e conservação de espécies estuarinas neotropicais.

2. JUSTIFICATIVA

A família Anablepidae reúne espécies que apresentam características morfológicas, ecológicas e reprodutivas singulares entre os teleósteos, tornando-se um importante modelo para investigações sobre adaptação, evolução e diversificação em ambientes estuarinos (Nascimento; Assunção, 2008; Watanabe *et al.*, 2014). Apesar desse potencial científico, o conhecimento genômico disponível para o grupo ainda é limitado quando comparado ao de outras famílias de Cyprinodontiformes, especialmente no que se refere à caracterização de genomas mitocondriais completos. Essa lacuna restringe a realização de análises comparativas robustas e dificulta a compreensão dos processos evolutivos que moldaram a história da família.

Com o desenvolvimento das tecnologias de NGS houve um avanço significativo na obtenção de genomas mitocondriais completos, permitindo a caracterização detalhada da organização gênica, composição nucleotídica, padrões de uso de códons e relações filogenéticas entre diferentes grupos de organismos (Goodwin; McPherson; McCombie, 2016). Em peixes, esses dados têm contribuído para o refinamento de hipóteses filogenéticas, identificação de linhagens evolutivas, delimitação de espécies e desenvolvimento de marcadores moleculares aplicados à genética de populações e à conservação (Miya; Nishida, 2015; Satoh *et al.*, 2016).

Embora estudos anteriores tenham investigado aspectos da ecologia, reprodução e estrutura genética populacional de *Anableps anableps* e *Anableps microlepis*, utilizando principalmente marcadores mitocondriais (Nascimento; Assunção, 2008; Watanabe *et al.*, 2014), ainda não há descrições completas da organização dos genomas mitocondriais. Considerando que essas espécies habitam ecossistemas costeiros e estuarinos sujeitos a intensa pressão antrópica e desempenham importante papel ecológico nesses ambientes, a ampliação do conhecimento genômico torna-se relevante não apenas para estudos evolutivos, mas também para futuras pesquisas voltadas à taxonomia, filogeografia, genética da conservação e monitoramento da biodiversidade.

Dessa forma, este estudo justifica-se por realizar a montagem e a caracterização dos mitogenomas de *A. anableps* e *A. microlepis*, disponibilizando novos genomas mitocondriais completos para a família Anablepidae. Além disso, a obtenção desses dados ampliarão a representatividade do grupo em bancos de dados públicos e fornecerão uma base genômica de referência para estudos comparativos em Cyprinodontiformes, contribuindo para o entendimento da evolução da arquitetura mitocondrial, bem como para futuras investigações em genética de populações, filogeografia e conservação destas espécies estuarinas neotropicais.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Sequenciar e caracterizar os genomas mitocondriais completos de *A. anableps* e *A. microlepis*, descrevendo sua organização estrutural e avaliando seu posicionamento filogenético em relação a outros representantes da ordem Cyprinodontiformes.

3.2 Objetivos específicos

- Montar os genomas mitocondriais completos de *A. anableps* e *A. microlepis* a partir de dados de sequenciamento de nova geração;
- Realizar a anotação dos genes mitocondriais, identificando genes codificadores de proteínas, RNAs transportadores, RNAs ribossômicos e a região controle;
- Caracterizar a organização estrutural dos genomas mitocondriais, incluindo composição nucleotídica, conteúdo gênico, uso de códons e demais características genômicas;
- Investigar as relações filogenéticas, contribuindo para o entendimento da história evolutiva do gênero *Anableps*.

REFERÊNCIAS

AFGAN, Enis et al. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. **Nucleic acids research**, v. 46, n. W1, p. W537-W544, 2018.

AVISE, John C. **Phylogeography: the history and formation of species**. Cambridge, MA: Harvard University Press, 2000.

BALLARD, J. William O.; WHITLOCK, Michael C. The incomplete natural history of mitochondria. **Molecular ecology**, v. 13, n. 4, p. 729-744, 2004.

BERNT, Matthias et al. MITOS: improved de novo metazoan mitochondrial genome annotation. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 69, n. 2, p. 313-319, 2013.

BOORE, Jeffrey L. The use of genome-level characters for phylogenetic reconstruction. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 21, n. 8, p. 439-446, 2006.

FIGUEIREDO, Marina B. et al. Feeding ecology of *Anableps anableps* (Actinopterygii: Cyprinodontiformes: Anablepidae) off the north-eastern coast of Brazil. **Acta Ichthyologica et Piscatoria**, v. 49, p. 213-219, 2019.

FRICKE, Ronald; ESCHMEYER, William N.; VAN DER LAAN, Richard. **Catalog of Fishes: Genera, Species, References. California Academy of Sciences, 2026.** Disponível em: <https://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>. Acesso em: 04 maio 2026.

GALTIER, N. et al. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. **Molecular ecology**, v. 18, n. 22, p. 4541-4550, 2009.

GOODWIN, Sara; MCPHERSON, John D.; MCCOMBIE, W. Richard. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. **Nature reviews genetics**, v. 17, n. 6, p. 333-351, 2016.

GUEDES, Maria Eduarda Gomes; CORREIA, Tiago Gabriel. Plasma energetic substrates and hepatic enzymes in the four-eyed fish *Anableps anableps* (Teleostei: Cyprinodontiformes) during the dry and rainy seasons in the Amazonian Island of Maracá, extreme north of Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 19, n. 4, p. e210078, 2021.

HEATHER, James M.; CHAIN, Benjamin. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. **Genomics**, v. 107, n. 1, p. 1-8, 2016.

HELMSTETTER, Andrew J. et al. Trait evolution and historical biogeography shape assemblages of annual killifish. **Journal of Biogeography**, v. 47, n. 9, p. 1955-1965, 2020.

HUGHES, Lily C. et al. Comprehensive phylogeny of ray-finned fishes (Actinopterygii) based on transcriptomic and genomic data. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 24, p. 6249-6254, 2018.

LI, Manman et al. Comparative genomics of fish: insights into evolutionary processes. **International Journal of Molecular Zoology**, v. 14, 2024.

MARDIS, Elaine R. DNA sequencing technologies: 2006–2016. **Nature protocols**, v. 12, n. 2, p. 213-218, 2017.

MESCOUTO, Niedja Luana da C. et al. Population structure and reproduction of *Anableps microlepis* in an estuary from Amazon. **Revista Uniaraguaia**, p. 176-194, 2023.

MIYA, Masaki et al. Evolutionary origin of the Scombridae (tunas and mackerels): members of a Paleogene adaptive radiation with 14 other pelagic fish families. **PloS one**, v. 8, n. 9, p. e73535, 2013.

MIYA, Masaki; NISHIDA, Mutsumi. The mitogenomic contributions to molecular phylogenetics and evolution of fishes: a 15-year retrospect. **Ichthyological Research**, v. 62, n. 1, p. 29-71, 2015.

NASCIMENTO, Francylenna L.; ASSUNÇÃO, Maria Ivaneide S. Ecologia reprodutiva dos tralhos *Anableps anableps* e *Anableps microlepis* (Pisces: Cyprinodontiformes: Anablepidae) no rio Paracauari, ilha de Marajó, Pará, Brasil. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**, v. 3, n. 3, p. 229-240, 2008.

NEAR, Thomas J. et al. Resolution of ray-finned fish phylogeny and timing of diversification. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 34, p. 13698-13703, 2012.

NELSON, Joseph S.; GRANDE, Terry C.; WILSON, Mark VH. **Fishes of the World**. John Wiley & Sons, 2016.

NUNNARI, Jodi; SUOMALAINEN, Anu. Mitochondria: in sickness and in health. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1145-1159, 2012.

PEREZ, Louise N. et al. Eye development in the four-eyed fish *Anableps anableps*: cranial and retinal adaptations to simultaneous aerial and aquatic vision. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 284, n. 1852, p. 20170157, 2017.

POHL, Moritz et al. Multigene phylogeny of cyprinodontiform fishes suggests continental radiations and a rogue taxon position of *Pantanodon*. **Vertebrate Zoology**, v. 65, p. 37-44, 2015.

REZNICK, David N. et al. The origin and biogeographic diversification of fishes in the family Poeciliidae. **PloS one**, v. 12, n. 3, p. e0172546, 2017.

RODRÍGUEZ-MACHADO, Sheila et al. Disentangling historical relationships within Poeciliidae (Teleostei: Cyprinodontiformes) using ultraconserved elements. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 190, p. 107965, 2024.

SATOH, Takashi P. et al. Structure and variation of the mitochondrial genome of fishes. **BMC genomics**, v. 17, n. 1, p. 719, 2016.

SPINELLI, Jessica B.; HAIGIS, Marcia C. The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. **Nature cell biology**, v. 20, n. 7, p. 745-754, 2018.

WATANABE, Luciana Almeida et al. The past and present of an estuarine-resident fish, the “four-eyed fish” *Anableps anableps* (Cyprinodontiformes, Anablepidae), revealed by mtDNA sequences. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. e101727, 2014.

CAPÍTULO II

Proposta de artigo a ser submetido a revista *Journal of Fish Biology* (A3), fator de impacto 2,0.

Caracterização do genoma mitocondrial completo dos peixes-de-quatro-olhos, *Anableps anableps* e *Anableps microlepis* (Anablepidae; Cyprinodontiformes)

Murilo Furtado do Rosário¹, Carla Denise Bessa de Brito¹, Rodrigo Petry Corrêa de Sousa¹, Marcelo Nazareno Vallinoto de Souza¹

¹Instituto de Estudos Costeiros, Universidade Federal do Pará, Laboratório de Evolução, Bragança-PA, Brazil.

*Autor correspondente: carlabessabrito@gmail.com; +5591989467449.

RESUMO

Os genomas mitocondriais são ferramentas importantes na genômica evolutiva e apresentam informações relevantes para a ecologia e conservação das espécies, mas ainda são pouco descritos para diversas linhagens de peixes neotropicais. Este estudo apresenta a caracterização mitogenômica completa de *Anableps anableps* e *Anableps microlepis*, duas espécies estuarinas residentes emblemáticas da família Anablepidae, conhecidas principalmente por sua adaptação visual única. Utilizando dados obtidos por meio de Sequenciamento de Nova Geração (*Next-Generation Sequencing*, NGS) foi feita a montagem e análise comparativa dos mitogenomas a fim de investigar a organização genômica, a composição de nucleotídeos, o uso de códons e as relações filogenéticas dentro de Cyprinodontiformes. Ambas as espécies exibiram a estrutura canônica do mitogenoma de vertebrados, com genomas circulares (~16,5 kb) contendo 37 genes e uma ordem gênica conservada. Os genomas mostraram um leve viés A+T e o GC-skew negativo (-0,318 e -0,317, *A. anableps* e *A. microlepis* respectivamente) consistente, refletindo a assimetria de fita típica em mitogenomas de teleósteos. Apesar da conservação estrutural geral, foram observadas diferenças sutis na composição de nucleotídeos e nos padrões de uso de códons, particularmente um maior enriquecimento de citosina em *A. microlepis*. O viés de uso de códons foi amplamente impulsionado pela pressão mutacional em vez da seleção adaptativa, com preferência por códons terminados em A ou C. Análises filogenéticas baseadas em mitogenomas completos da ordem Cyprinodontiformes recuperaram *Anableps* como um grupo monofilético, com *A. anableps* e *A. microlepis* formando um clado irmão fortemente suportado. A família Anablepidae foi posicionada como um grupo irmão de Poeciliidae, corroborando hipóteses evolutivas anteriores para a ordem. Essas descobertas preenchem uma

lacuna crítica nos dados mitogenômicos de Anablepidae e fornecem novas informações sobre a evolução do genoma mitocondrial, oferecendo dados para futuros estudos filogenéticos e populacionais em peixes estuarinos.

Palavras-chave: Estrutura genômica; Genômica comparativa; Mitogenomas; Peixes estuarinos; Tralhoto.

1. INTRODUÇÃO

A ordem Cyprinodontiformes compreende um grupo altamente diverso e ecologicamente versátil de peixes teleósteos, amplamente distribuídos em regiões tropicais e subtropicais (Nelson; Grande; Wilson, 2016; Morales *et al.*, 2024). Esse clado tem despertado grande interesse na biologia evolutiva devido à recorrente emergência de características como viviparidade, tolerância a condições ambientais extremas e rápida diversificação de linhagens (Furness *et al.*, 2019). Os representantes da ordem ocupam uma ampla variedade de habitats, desde ambientes estritamente dulcícolas até sistemas hipersalinos e estuarinos (Watanabe *et al.*, 2014; Nelson; Grande; Wilson, 2016), tornando-se modelos importantes para investigações sobre adaptação, diversificação e evolução em ecossistemas dinâmicos.

Dentro de Cyprinodontiformes, a família Anablepidae representa uma linhagem pequena, porém biologicamente singular, composta atualmente por três gêneros viventes: *Anableps*, *Jenynsia* e *Oxyzygonectes* (Nelson; Grande; Wilson, 2016; Amorim; Costa, 2018). Enquanto as espécies de *Jenynsia* estão predominantemente associadas a ambientes dulcícolas do sul da América do Sul, *Anableps* e *Oxyzygonectes* habitam principalmente regiões costeiras e estuarinas neotropicais. Apesar da baixa riqueza específica, os anablepídeos apresentam um conjunto notável de especializações ecológicas e morfológicas, tornando o grupo particularmente relevante para estudos evolutivos, sobre adaptação e biogeografia (Amorim; Costa, 2018).

As espécies do gênero *Anableps*, popularmente conhecidas como “peixes de quatro-olhos”, exibem uma das adaptações morfológicas mais peculiares entre os vertebrados, que são olhos posicionados dorsalmente, com pupilas divididas horizontalmente, permitindo visão simultânea nos ambientes aéreo e aquático (Schwab *et al.*, 2001). Além dessa notável adaptação sensorial, essas espécies apresentam viviparidade, apresentam fecundação interna mediada por um gonopódio (estrutura derivada da nadadeira anal) e exibem assimetria sexual relacionada às estruturas reprodutivas (Torres-Dowdall *et al.*, 2022). Ecologicamente, espécies

de *Anableps* estão intimamente associadas a ambientes estuarinos sujeitos a intensas variações de salinidade, turbidez e temperatura. Essas características, aliadas à ausência de fase larval planctônica e ao reduzido potencial de dispersão, tornam o grupo especialmente interessante para investigações sobre os efeitos da heterogeneidade ambiental na divergência evolutiva (Brenner; Krumme, 2007; Watanabe *et al.*, 2014).

Na costa norte da América do Sul, particularmente na região amazônica, a heterogeneidade geomorfológica e a intensa descarga de água doce do rio Amazonas têm sido apontadas como fatores determinantes na estruturação populacional e na divergência de organismos estuarinos (Carvajal-Vallejos *et al.*, 2014; Watanabe *et al.*, 2014). Nesse contexto, *Anableps anableps* e *Anableps microlepis*, distribuídas ao longo da costa atlântica desde a Venezuela até o norte do Brasil e frequentemente ocorrendo em simpatria, constituem um modelo particularmente relevante para compreender os efeitos de eventos históricos e processos ambientais sobre a diversificação de linhagens costeiras.

Essas espécies apresentam diferenças ecológicas marcantes, enquanto *A. anableps* demonstra maior tolerância a gradientes de salinidade e maior capacidade de ocupação de ambientes interiores estuarinos, *A. microlepis* apresenta distribuição mais associada a águas costeiras salinas. Além disso, estudos recentes têm avaliado o potencial dessas espécies como bioindicadoras de alterações ambientais em ecossistemas estuarinos (Guedes; Correia, 2021). Isso reforça a necessidade de ampliar o conhecimento genômico disponível para o grupo.

Contudo, apesar de sua relevância ecológica e evolutiva, os recursos genéticos disponíveis para Anablepidae ainda permanecem limitados. Estudos prévios concentraram-se majoritariamente em fragmentos de genes mitocondriais para inferências filogeográficas e análises populacionais (Watanabe *et al.*, 2014), restringindo a resolução das interpretações evolutivas e filogenéticas. Além disso, embora abordagens multilocus tenham contribuído para o entendimento das relações de Anablepidae dentro de Cyprinodontoidei (Amorim; Costa, 2018), ainda persistem incertezas relacionadas à história de diversificação do grupo e às relações evolutivas entre suas linhagens. A ausência de genomas mitocondriais completos representa, portanto, uma importante lacuna para estudos comparativos e filogenômicos envolvendo a família.

Os genomas mitocondriais, por sua vez, têm se consolidado como ferramentas amplamente utilizadas em estudos evolutivos e comparativos devido à sua organização relativamente conservada, herança predominantemente materna, elevada taxa de substituição e ausência de recombinação (Bernt *et al.*, 2013). A obtenção de mitogenomas completos permite reconstruções filogenéticas mais robustas, além de possibilitar análises detalhadas da

composição nucleotídica, uso de códons e padrões de seleção atuando sobre genes codificadores de proteínas (Sun *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2024). Em peixes, abordagens mitogenômicas têm sido cada vez mais empregadas em estudos de sistemática, filogeografia e evolução molecular, contribuindo significativamente para o entendimento da história evolutiva de diferentes linhagens (Sato *et al.*, 2016).

É válido destacar que dentro da ordem Cyprinodontiformes, diversas famílias já possuem mitogenomas descritos e utilizados em análises filogenéticas e comparativas, incluindo Poeciliidae, Cyprinodontidae, Aphaniidae e Rivulidae (Gutiérrez *et al.*, 2015; Sung *et al.*, 2016; Ren *et al.*, 2021; López-Solano *et al.*, 2023). Entretanto, até o momento, nenhum mitogenoma completo havia sido descrito para espécies do gênero *Anableps*, limitando análises evolutivas mais abrangentes dentro da ordem.

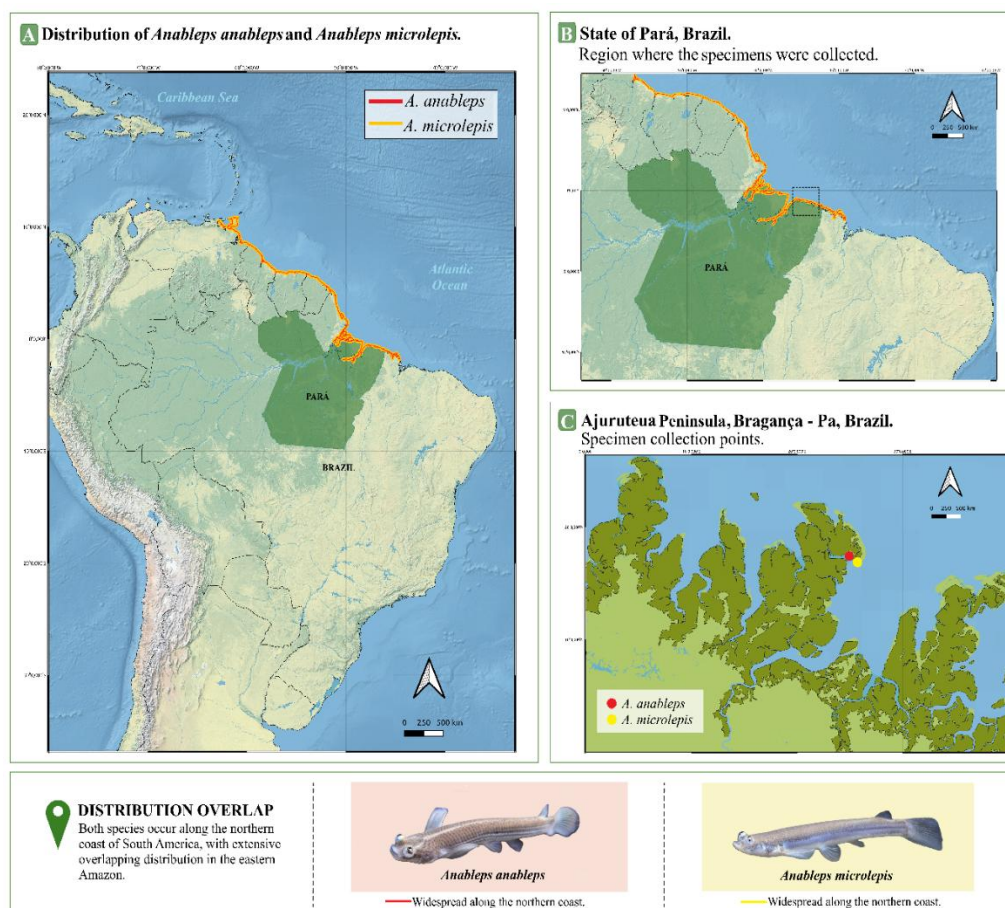
Diante disso, o presente estudo descreve os genomas mitocondriais completos de *A. anableps* e *A. microlepis* obtidos por sequenciamento de nova geração. Além da caracterização da organização genômica, composição de bases e padrões de uso de códons, foram investigadas as relações filogenéticas dentro de Cyprinodontidae com base em dados mitogenômicos. Dessa forma, ao preencher uma importante lacuna de recursos genômicos para Anablepidae, este trabalho fornece novos subsídios para a compreensão da evolução mitocondrial, das relações filogenéticas e da história evolutiva de peixes estuarinos neotropicais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de amostras e extração de DNA

As amostras de tecido muscular de *A. anableps* utilizadas neste estudo estão depositadas no banco de tecidos do Laboratório de Evolução (UFPA–Bragança) e foram previamente analisadas por Watanabe *et al.* (2014). Por sua vez, as amostras de *A. microlepis* foram coletadas, no presente estudo, na Península de Ajuruteua, Bragança, Pará, Brasil (Figura 1B–C). Todas as amostras foram fixadas em etanol a 95% e armazenadas a –20 °C até a realização das análises moleculares. As amostras foram coletadas sob autorização do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), SISBIO licença nº. 92817-1 e do Ministério do Meio Ambiente (MMA) 12773-1.

Figura 1: (A) Distribuição geográfica de *A. anableps* e *A. microlepis* ao longo da costa norte da América do Sul, com destaque para as áreas de ocorrência registradas para ambas as espécies. *A. anableps* está representada em vermelho e *A. microlepis* em amarelo. (B) Estado do Pará, localizado na região Norte do Brasil, indicando a área de coleta dos espécimes utilizada neste estudo. (C) Península de Ajuruteua, município de Bragança, Pará, Brasil, destacando os pontos de coleta dos exemplares analisados.



Fonte: Própria autoria.

A extração do DNA genômico foi realizada utilizando o kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega Corporation, Madison, WI, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. A integridade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com GelRed, enquanto a concentração e a pureza do material foram determinadas por fluorometria em Qubit® 2.0 (Thermo Fisher Scientific) e espectrofotometria em NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific), respectivamente.

Sequenciamento e montagem

O DNA quantificado foi padronizado para a concentração de 20 ng/μL, sendo então utilizado na construção das bibliotecas genômicas conforme o protocolo padrão para o DNA

Prep Tagmentation Kit (Illumina, San Diego, California, USA), com etapa de tagmentação conduzida por 25-30 minutos. O tamanho dos fragmentos foi avaliado em sistema TapeStation 4200 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA), seguido da quantificação das bibliotecas.

O sequenciamento foi realizado na plataforma NextSeq 2000 (Illumina, San Diego, CA, EUA), empregando o kit NextSeq 1000/2000 P2 (300 ciclos), gerando leituras pareadas de 150 pb e tamanhos de inserto variando entre 459 e 526 pb. O sequenciamento de *A. microlepis* foi conduzido no Instituto Vale, Belém - Pa, enquanto do de *A. anableps* foi realizado no Instituto de Estudos Costeiros, Bragança - Pa.

A qualidade das *reads* foram avaliadas com a ferramenta FastQC versão 0.11.9 (disponível em <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) e para eliminar adaptadores, bases de baixa qualidade, leituras com escores Phred inferiores a Q20, sequências curtas (<75 pb) e regiões com nucleotídeos ambíguos foi utilizado o Trimmomatic ver. 0.39 (Bolger; Lohse; Usadel 2014). As montagens dos genomas mitocondriais foram realizadas utilizando o software NovoPlasty (v.4.3.1) (Dierckxsens; Mardulyn; Smits, 2017), empregando o gene *COI* (GenBank: OQ075615.1) como sequência semente para a reconstrução e o genoma mitocondrial não montando disponível no GenBank de *A. anableps* foi usado como referência (GenBank: CM026089.1).

Anotação e análises dos genomas

A anotação dos genomas mitocondriais e as análises das estruturas secundárias dos genes de RNA transportadores (tRNAs) foram realizadas por meio da plataforma online MitoAnnotator (<http://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp>; acesso em 27 de novembro de 2025), do software MITOS2 (Bernt *et al.*, 2013) (<https://gitlab.com/Bernt/MITOS/-/tree/mitos2>; acesso em 31 de maio de 2025). A composição nucleotídica (A, T, C e G) e as assimetrias de bases ($AT\ skew = [A - T]/[A + T]$ e $GC\ skew = [G - C]/[G + C]$), a frequência de aminoácidos e códons e o uso relativo de códons sinônimos (RSCU) foram estimados utilizando o software MEGA X (Kumar *et al.*, 2018).

Análises filogenéticas

As análises filogenéticas foram conduzidas com base nas sequências dos 13 genes codificadores de proteínas. Considerando a ausência de genomas mitocondriais completos disponíveis para espécies de Anablepidae, foram selecionadas 49 mitogenomas revisados e curados pelo NCBI da subordem Cyprinodontoidei (Tabela S1), as quais foram analisadas em

conjunto com os genomas mitocondriais de *A. anableps* e *A. microlepis* obtidos neste estudo, como grupo externo foram selecionados genomas das espécies da subordem Aplocheiloidei (NC032387.1 *Kryptolebias hermaphroditus*, NC003290.1 *Kryptolebias marmoratus*, NC088550.1 *Millerichthys robustus*, NC044433.1 *Aplocheilus lineatus*, NC011176.1 *Aplocheilus panchax*, NC044380.1 *Pachypanchax playfairii*).

As sequências foram alinhadas individualmente utilizando o software MAFFT v7.313 (Katoh; Standley, 2013) e, posteriormente, concatenadas no SequenceMatrix v1.10 (Vaidya; Lohman; Meier, 2011). A matriz concatenada foi empregada na inferência filogenética por máxima verossimilhança (ML) no IQ-TREE v3.0.1 (Nguyen *et al.*, 2015). O suporte estatístico dos nós foi estimado por meio de bootstrap ultrarrápido, com 1.000 pseudorreplicações, e a seleção do modelo evolutivo mais adequado para cada partição foi realizada pelo ModelFinder (Kalyaanamoorthy *et al.*, 2017), integrado ao IQ-TREE.

A inferência bayesiana (IB) foi conduzida no MrBayes v3.2.7 (Ronquist *et al.*, 2012), o modelo de substituição nucleotídica (GTR + I + G) foi o aplicado, com duas execuções independentes de 200 milhões de gerações, amostragem a cada 1.000 gerações e descarte dos primeiros 25% das amostras como burn-in. A convergência das cadeias foi avaliada com base nos valores de tamanho efetivo de amostra (ESS), utilizando o software Tracer v1.7. A visualização final foi realizada no (iTOL) v6 (Letunic; Bork, 2024).

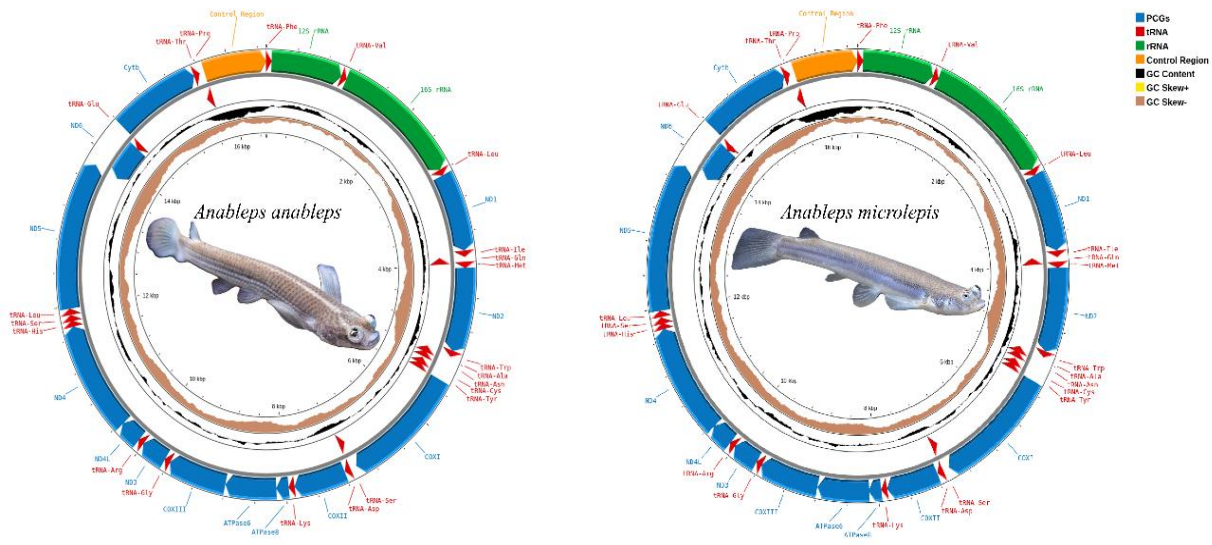
3. RESULTADOS

Organização e composição genômica

A análise dos genomas mitocondriais de *A. anableps* e *A. microlepis* mostrou que seus comprimentos totais são de 16.511 e 16.528 pb (Figura 2), respectivamente, compreendendo 37 genes e uma região não codificante. A estrutura é altamente conservada, com os tipos e a disposição de cada gene em conformidade com a estrutura típica dos genomas mitocondriais de vertebrados (Tabela 1).

A maior parte dos genes está localizada na fita pesada (H), enquanto o gene *nad6* e oito genes de tRNA (*trnP*, *trnS1*, *trnY*, *trnC*, *trnN*, *trnA* e *trnQ*) estão codificados na fita leve (L), padrão igualmente compartilhado entre as duas espécies. A região controle encontra-se posicionada entre os genes *trnP* e *trnF* e por meio da análise dessa região pelo programa Tandem Repeats Finder (<https://tandem.bu.edu/trf/trf.html>), não foram verificadas a presença de sequências repetitivas em nenhuma das espécies.

Figura 2: Mapas dos genomas mitocondriais completos de *A. anableps* e *A. microlepis*, mostrando os genes codificadores de proteínas (PCGs), rRNAs, tRNAs e a região controle. As imagens foram geradas utilizando o servidor online CGView/Proksee (<https://proksee.ca/>).



Fonte: Própria autoria.

Tabela 1: Organização genômica comparativa dos mitogenomas de *A. anableps* e *A. microlepis*. Início:Fim corresponde às posições inicial e final de cada gene no mitogenoma, enquanto Comprimento pb indica o comprimento gênico em pares de bases (pb); valores negativos indicam sobreposição gênica, enquanto valores positivos representam espaçadores intergênicos.

<i>A. anableps</i>					<i>A. microlepis</i>		
Gene	Fita	Início:Fim (Comprimento pb)	Códon de iniciação/ parada	Sobreposição gênica e espaço intergênico (pb)	Início:Fim (Comprimento pb)	Códon de iniciação/ parada	Sobreposição gênica e espaço intergênico (pb)
<i>nad6</i>	-	1069:1591 (523)	ATG/TAA	-1	1024:1546 (523)	ATG/TAG	-1
<i>trnE(ttc)</i>	-	1591:1660 (70)		2	1546:1615 (70)		1
<i>cob</i>	+	1663:2803 (1141)	ATG/TAA	1	1617:2757 (1141)	ATG/TAA	1
<i>trnT(tgt)</i>	+	2805:2877 (73)		-2	2758:2830 (73)		-2
<i>trnP(tgg)</i>	-	2876:2945 (70)		0	2829:2899 (71)		0
<i>Control Region</i>	+	2946:3778 (833)		0	2900:3748 (849)		0
<i>trnF(gaa)</i>	+	3779:3848 (70)		0	3749:3817 (69)		0
<i>rrnS</i>	+	3848:4794 (947)		-1	3817:4763 (947)		-1
<i>trnV(tac)</i>	+	4794:4866 (73)		21	4763:4835 (73)		22

<i>rrnL</i>	+	4888:6560 (1673)		-2	4858:6523 (1666)		-1
<i>trnL2(taa)</i>	+	6559:6633 (75)		0	6523:6597 (75)		0
<i>nad1</i>	+	6633:7608 (976)	ATG/TAG	2	6597:7569 (973)	ATG/TAA	6
<i>trnI(gat)</i>	+	7611:7681 (71)		-2	7576:7645 (70)		-2
<i>trnQ(ttg)</i>	-	7680:7751 (72)		-2	7644:7715 (72)		-2
<i>trnM(cat)</i>	+	7750:7819 (70)		0	7714:7783 (70)		0
<i>nad2</i>	+	7819:8866 (1048)	ATG/TAG	-3	7783:8830 (1048)	ATG/TAG	-3
<i>trnW(tca)</i>	+	8864:8933 (70)		0	8828:8897 (70)		0
<i>trnA(tgc)</i>	-	8936:9005 (70)		0	8900:8969 (70)		0
<i>trnN(gtt)</i>	-	9006:9079 (74)		35	8970:9043 (74)		37
<i>trnC(gca)</i>	-	9115:9179 (65)		0	9081:9146 (66)		0
<i>trnY(gta)</i>	-	9180:9251 (72)		0	9147:9218 (72)		0
<i>cox1</i>	+	9252:10806 (1555)	GTG/TAG	13	9219:10773 (1555)	GTG/TAA	14
<i>trnS2(tga)</i>	-	10820:10891 (72)		2	10787:10858 (72)		2
<i>trnD(gtc)</i>	+	10894:10965 (72)		8	10861:10932 (72)		8
<i>cox2</i>	+	10974:11165 (692)	ATG/AGA	-8	10941:11163 (692)	ATG/AGA	-8
<i>trnK(ttt)</i>	+	11665:11739 (75)		0	11632:11706 (75)		0
<i>atp8</i>	+	11740:11908 (169)	ATG/TAA	-11	11707:11875 (169)	ATG/TAA	-11
<i>atp6</i>	+	11898:12582 (685)	GTG/TAA	-2	11865:12549 (685)	ATG/TAA	-2
<i>cox3</i>	+	12581:13366 (786)	ATG/TAG	-1	12548:13334 (787)	ATG/TAA	-1
<i>trnG(tcc)</i>	+	13366:13438 (73)		0	13333:13405 (73)		0
<i>nad3</i>	+	13438:13789 (352)	ATG/TAG	-3	13405:13756 (352)	ATG/TAG	-3
<i>trnR(tcg)</i>	+	13787:13856 (70)		0	13754:13823 (70)		0
<i>nad4l</i>	+	13856:14153 (298)	ATG/TAA	-8	13823:14120 (298)	ATG/TAA	-8
<i>nad4</i>	+	14146:15527 (1382)	ATG/AGA	-5	14113:15494 (1382)	ATG/AGA	-5
<i>trnH(gtg)</i>	+	15527:15596 (70)		0	15494:15563 (70)		0
<i>trnS1(gct)</i>	+	15596:15664 (69)		8	15563:15631 (69)		13
<i>trnL1(tag)</i>	+	15673:15746 (74)		0	15645:15718 (74)		0
<i>nad5</i>	+	15746:1074 (1840)	ATG/AGA	0	15718:1029 (1840)	ATG/AGA	0

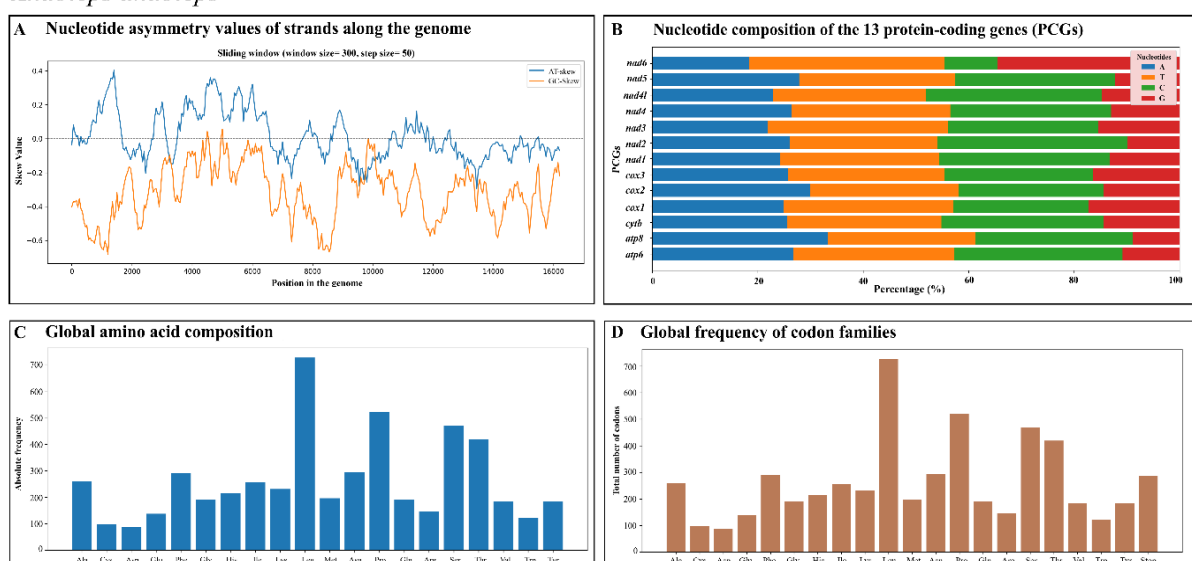
A organização gênica mostrou-se conservada entre *A. anableps* e *A. microlepis*, não sendo detectados eventos de rearranjo. Além disso, os genomas apresentaram elevada compactação, evidenciada pela presença de múltiplas sobreposições gênicas e curtos intervalos intergênicos. Foram identificadas 13 sobreposições gênicas em cada espécie, variando de 1 a 11 pb, com destaque para as sobreposições conservadas entre *atp8–atp6* (11 pb) e *nad4l–nad4* (8 pb) (Tabela 1). Os intervalos intergênicos são predominantemente curtos, em geral inferiores a 40 pb, sendo os maiores localizados entre *trnN–trnC* (35 pb em *A. anableps* e 37 pb em *A. microlepis*) e entre *trnV–rrnL* (21 pb e 22 pb, respectivamente).

Análise da composição de nucleotídeos

A análise da composição nucleotídica revelou predominância de bases A+T em ambas as espécies, caracterizando um viés positivo para AT. O conteúdo de A+T foi de 56,77% em *A. anableps* e 53,39% em *A. microlepis*. De modo geral, as duas espécies apresentaram padrões composicionais semelhantes, com baixa proporção de guanina (14,74% e 15,91%, respectivamente) e enriquecimento relativo em citosina, mais evidente em *A. microlepis* (30,71%) (Figura 3A e 3B).

Figura 3: Caracterização composicional do genoma mitocondrial de *A. anableps*. (A) Valores de assimetria nucleotídica das fitas (AT-skew e GC-skew) ao longo do genoma; (B) proporção de nucleotídeos nos 13 PCGs mitocondriais; (C) composição global de aminoácidos codificados; e (D) frequência global das famílias de códons.

Anableps anableps



Fonte: Própria autoria.

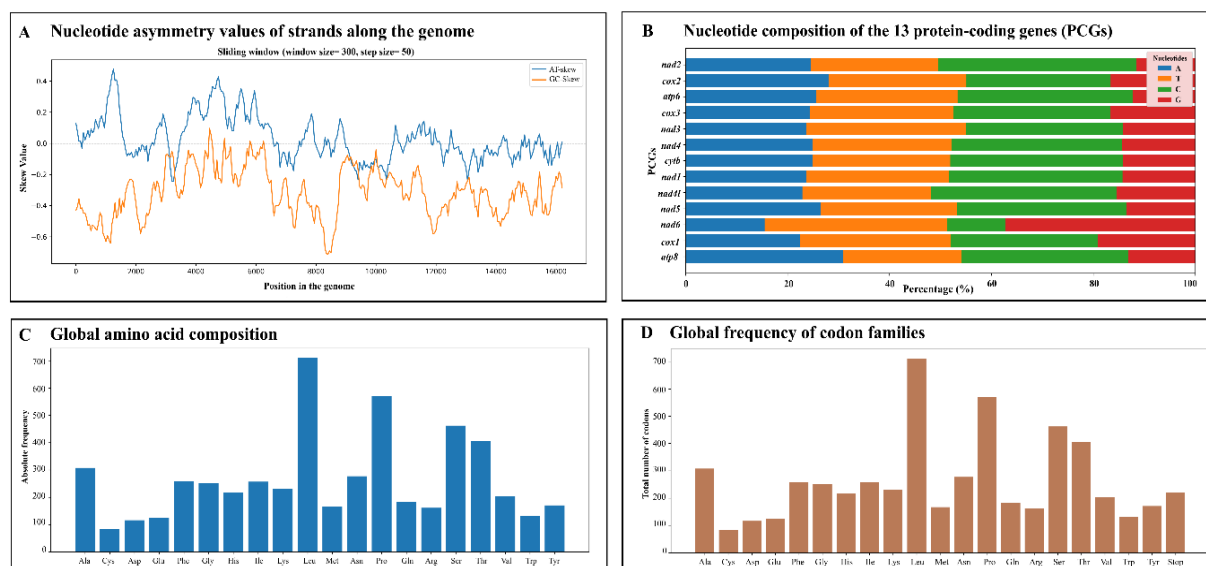
Em *A. anableps*, a composição nucleotídica foi de A (28,76%), T (28,01%), C (28,49%) e G (14,74%), enquanto em *A. microlepis* os valores observados foram A (27,47%), T (25,92%), C (30,71%) e G (15,91%). Esses resultados reforçam a predominância de A+T em relação a G+C em ambos os genomas (Figura 3A e 3B).

Os valores de AT-skew foram positivos nas duas espécies (0,013 em *A. anableps* e 0,029 em *A. microlepis*), indicando leve predominância de adenina sobre timina. Por outro lado, o GC-skew apresentou valores negativos (-0,318 e -0,317, respectivamente), refletindo maior frequência de citosina em relação à guanina (Figura 2 e Figuras 3A-4A).

A análise por janela deslizante evidenciou variações ao longo do genoma para o AT-skew, com alternância entre valores positivos e negativos. Em contraste, o GC-skew manteve-se consistentemente negativo ao longo de todo o genoma, apresentando apenas flutuações locais sem inversões significativas (Figuras 3A e 4A).

Figura 4: Caracterização composicional do genoma mitocondrial de *A. microlepis*. Valores de assimetria nucleotídica das fitas (AT-skew e GC-skew) ao longo do genoma; (B) proporção de nucleotídeos nos 13 PCGs mitocondriais; (C) composição global de aminoácidos codificados; e (D) frequência global das famílias de códons.

Anableps microlepis



Fonte: Própria autoria.

Genes codificadores de proteínas e uso de códons

Os 13 genes codificadores de proteínas (PCGs) apresentaram um tamanho total de 11.447 pb e 11.445 pb em *A. anableps* e *A. microlepis* respectivamente. Em sua maioria,

exibiram códons de iniciação do tipo ATG, com exceções pontuais em *A. anableps*, onde *cox1* e *atp6* utilizaram o códon alternativo GTG (Tabela 1). Em relação aos códons de terminação, observou-se predominância de TAA e TAG, além da ocorrência de AGA (Tabela 1). Adicionalmente, foram identificados eventos de sobreposição entre PCGs e genes de tRNA adjacentes, bem como entre *atp6* e *cox3* em ambas as espécies, refletindo o padrão típico de organização compacta dos genomas mitocondriais de vertebrados.

A composição nucleotídica dos PCGs revelou padrões consistentes entre as duas espécies (Figuras 3B e 4B), com predominância de adenina (A) e citosina (C) na maioria dos genes e menor proporção relativa de guanina (G). Esse padrão é particularmente evidente nos genes do complexo NADH desidrogenase (*nad1–nad5* e *nad4l*), que apresentaram enriquecimento em citosina e baixa frequência de guanina, em concordância com o viés negativo de GC-skew observado em nível genômico. Comparativamente, *A. microlepis* apresentou discreto aumento no conteúdo de citosina em relação a *A. anableps*.

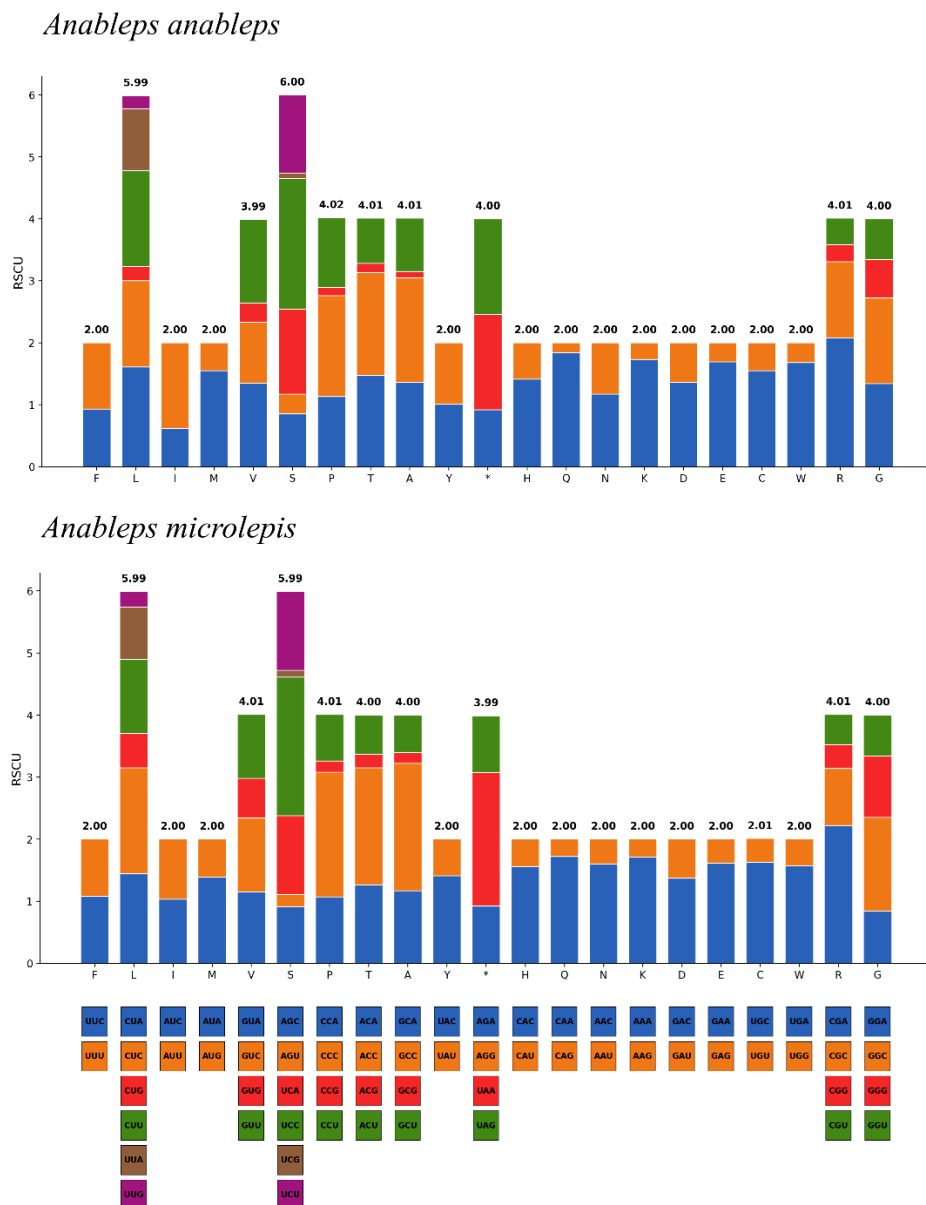
Os genes do complexo citocromo c oxidase (*cox1–cox3*) e *cytb* exibiram distribuição mais equilibrada entre A, T e C, embora mantendo proporções reduzidas de G. Genes de menor tamanho, como *atp8*, apresentaram maior variabilidade composicional, com enriquecimento em adenina, enquanto *atp6* mostrou distribuição mais homogênea entre as bases. O gene *nad6*, localizado na fita leve, destacou-se por apresentar padrão distinto, com menor proporção de adenina e maior frequência de timina e guanina, refletindo a assimetria de fita característica desse gene.

A análise da composição de aminoácidos indicou que a leucina foi o aminoácido mais abundante em ambas as espécies (ocorrendo de 726 em *A. anableps* e 710 em *A. microlepis*), seguida por prolina, serina e treonina, enquanto triptofano, cisteína e ácido aspártico apresentaram baixa frequência (Figura 3C e 4C). O número total de aminoácidos codificados pelos genes mitocondriais foi de 5.216 em *A. anableps* e 5.288 em *A. microlepis*. Pequenas diferenças interespecíficas foram observadas, como um leve aumento na frequência de alanina e glicina em *A. microlepis*, porém a composição proteica geral mostrou-se altamente conservada. Esse padrão foi consistente com o perfil de uso de códons (Figura 3D e 4D).

A análise do uso relativo de códons sinônimos (Relative Synonymous Codon Usage, RSCU) revelou padrões semelhantes entre *A. anableps* e *A. microlepis* (Figura 5), com maior viés associado a aminoácidos de alta degenerescência, como leucina e serina. Para leucina, códons como CUA, CUC, CUU e UUA foram mais frequentemente utilizados, enquanto para serina observou-se predominância de códons das famílias UCN e AGC. Aminoácidos como

prolina, treonina e alanina também apresentaram viés no uso de códons, com preferência por códons terminados em A ou C. Em contraste, aminoácidos com baixa degenerescência, como metionina e triptofano, apresentaram valores de RSCU próximos de 1, conforme esperado. Entre os códons de parada, UAA foi o mais frequentemente utilizado. Comparativamente, *A. microlepis* apresentou leve intensificação no uso de códons ricos em citosina, enquanto *A. anableps* exibiu maior frequência relativa de códons terminados em adenina em algumas famílias de aminoácidos.

Figura 5: Uso relativo de códons sinônimos (RSCU) nos 13 PCGs de *Anableps*.



Fonte: Própria autoria.

Gene de RNA de transferência (tRNA) e RNA ribossômico (rRNA)

Os 22 genes de RNA transportador (tRNA) foram identificados nos genomas mitocondriais de *A. anableps* e *A. microlepis*, apresentando comprimentos que variaram de 65 a 75 pb em *A. anableps* e de 66 a 75 pb em *A. microlepis*. Os maiores genes corresponderam a *trnL2(taa)* e *trnK(ttt)* (75 pb), enquanto *trnC(gca)* apresentou o menor comprimento (65–66 pb) (Tabela 1). De modo geral, a maioria dos tRNAs apresentou tamanhos próximos a 70–73 pb, com pequenas variações entre as espécies em genes como *trnP* e *trnF*, sem alterações significativas no padrão global.

A organização dos genes de tRNA mostrou-se altamente conservada entre as espécies. Os genes *trnE(ttc)*, *trnP(tgg)*, *trnQ(ttg)*, *trnA(tgc)*, *trnN(gtt)*, *trnC(gca)* e *trnY(gta)* estão localizados na fita leve (L), enquanto os demais encontram-se na fita pesada (H), padrão típico observado em genomas mitocondriais de vertebrados (Tabela 1).

As estruturas secundárias dos tRNAs apresentaram elevado grau de conservação, com a maioria dos genes exibindo a conformação típica em trevo (cloverleaf), composta pelos braços aceitador, DHU, anticódon e TΨC. Uma exceção foi observada para o *trnS1(gct)*, que não apresentou o braço DHU (Figura S1), característica recorrente em mitogenomas de vertebrados. Além disso, foram identificados pareamentos não canônicos (wobble) em diferentes regiões estruturais, especialmente nos braços aceitador e do anticódon, os quais podem contribuir para maior flexibilidade estrutural sem comprometer a funcionalidade dessas moléculas. De modo geral, não foram observadas diferenças estruturais relevantes entre as espécies, indicando alto grau de conservação.

Os genes ribossomais *12S rRNA (rrnS)* e *16S rRNA (rrnL)* também apresentaram organização conservada, estando localizados na fita pesada e separados pelo gene *trnV(tac)*. O gene *rrnS* apresentou comprimento de 947 pb em ambas as espécies, enquanto *rrnL* apresentou 1673 pb em *A. anableps* e 1666 pb em *A. microlepis* (Tabela 1).

Análises filogenéticas

A análise filogenética recuperou uma topologia bem resolvida, inferida por meio dos métodos de ML e BI, cujos resultados foram amplamente congruentes com a maioria dos nós apresentando elevados valores de suporte estatístico, superiores a 90% de bootstrap e 0.9 de probabilidade posterior (Figura 6). As espécies de *Anableps* formaram um clado bem suportado, inserido dentro de um agrupamento mais amplo de Cyprinodontiformes.

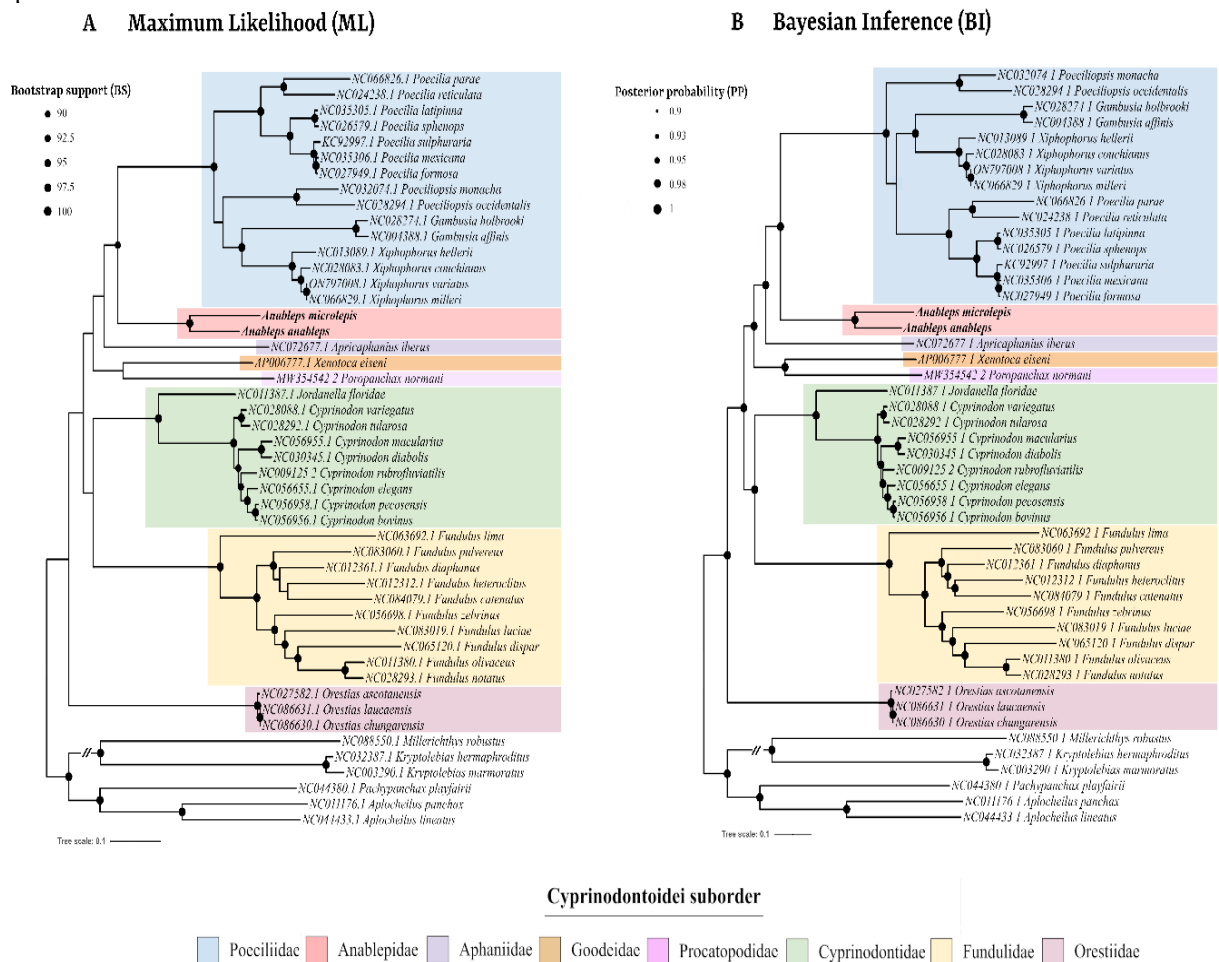
Especificamente, *A. anableps* e *A. microlepis* foram recuperadas como espécies irmãs, formando um subclado com alto suporte estatístico, o que reforça sua proximidade evolutiva.

O clado de *Anableps* foi posicionado como grupo-irmão de representantes da família Poeciliidae, corroborando a hipótese de que Anablepidae constitui o grupo-irmão de Poeciliidae dentro das linhagens neotropicais de Cyprinodontóidei.

Os valores de suporte obtidos ao longo da árvore (>90 bootstrap e 0.9 de probabilidade posterior) indicam alta confiabilidade na recuperação dos clados, evidenciando a robustez das inferências filogenéticas baseadas em genomas mitocondriais completos. A utilização de espécies da família Rivulidae e Aplocheilidae pertencente a subordem Aplocheiloidei, como grupo externo permitiu o adequado enraizamento da árvore e evidenciou a separação entre os clados dentro de Cyprinodontóidei.

Em conjunto, nossos resultados mostram a proximidade filogenética entre Anablepidae e Poeciliidae, em concordância com hipóteses evolutivas previamente propostas para o grupo.

Figura 6: Relações filogenéticas inferidas para Anablepidae e outros representantes de Cyprinodontiformes com base no conjunto de dados concatenados de 13 PCGs. A reconstrução filogenética foi realizada utilizando os métodos de Inferência Bayesiana (BI) (A) e Máxima Verossimilhança (ML) (B). Os valores de suporte nos nós correspondem às probabilidades posteriores para BI e aos valores de bootstrap para ML, apenas valores >90 são apresentados.



Fonte: Própria autoria.

4. DISCUSSÃO

Caracterização e comparação entre genomas de *Anableps*

Este estudo apresenta os genomas mitocondriais completos de *A. anableps* e *A. microlepis*, constituindo a primeira caracterização mitogenômica detalhada para a família Anablepidae baseada em dados de NGS. Investigações anteriores com este grupo baseavam-se majoritariamente em marcadores mitocondriais parciais, o que limitava a resolução de inferências evolutivas mais robustas (Watanabe *et al.*, 2014). Nesse contexto, a disponibilização de mitogenomas completos representa um avanço significativo para estudos comparativos e filogenéticos dentro de Cyprinodontiformes.

Os genomas mitocondriais de ambas as espécies apresentaram organização típica de vertebrados, composta por 13 PCGs, 22 genes de tRNA, dois genes de rRNAs e uma região controle. A ordem gênica e a distribuição entre as fitas foram totalmente conservadas e consistentes com o padrão descrito para outros representantes de Cyprinodontiformes (Gutiérrez *et al.*, 2015; Quezada-Romegialli *et al.*, 2016; Lema *et al.*, 2016; Sung *et al.*, 2016; Ren *et al.*, 2021). O tamanho genômico (~16,5 kb) está dentro da faixa esperada tanto para peixes teleósteos quanto mais especificamente para Cyprinodontiformes (Lema *et al.*, 2016; Sung *et al.*, 2016; Ren *et al.*, 2021), reforçando a estabilidade estrutural dos mitogenomas nesse grupo.

A ausência de rearranjos gênicos em *Anableps* reforça o elevado conservadorismo estrutural observado em mitogenomas de teleósteos. Em peixes, eventos de rearranjo mitocondrial tendem a ocorrer de maneira pontual e frequentemente estão associados a linhagens com taxas evolutivas aceleradas ou histórias evolutivas particulares (Tan *et al.*, 2025). Dessa forma, a manutenção da ordem gênica ancestral em *Anableps* sugere forte estabilidade estrutural ao longo da diversificação da linhagem.

A presença de sobreposições gênicas e intervalos intergênicos curtos evidencia a natureza compacta dos genomas mitocondriais de vertebrados, frequentemente associada a pressões seletivas por eficiência funcional (Yu *et al.*, 2021; Tian *et al.*, 2022). A região controle, localizada entre *trnP* e *trnF*, não apresentou repetições *in tandem* em nenhuma das espécies. Embora tais elementos sejam frequentemente relatados em mitogenomas de peixes e possam estar relacionados à regulação da replicação e transcrição, sua ausência em *Anableps* sugere que tais mecanismos podem depender predominantemente de elementos conservados, em vez de variações estruturais associadas a regiões repetitivas. De fato, a região controle em vertebrados frequentemente contém elementos conservados, como sequências associadas ao

término da replicação (TAS) e blocos conservados (CSBs), que desempenham papel central na iniciação da replicação e transcrição mitocondrial (Bessa-Brito *et al.*, 2026). Assim, a ausência de repetições *in tandem* em *Anableps*, podem refletir em uma maior estabilidade evolutiva da região controle ou uma característica específica da linhagem.

A composição nucleotídica revelou um claro viés para A+T em ambas as espécies, característica amplamente observada em genomas mitocondriais de vertebrados (Qin *et al.*, 2024; Balcázar *et al.*, 2026). Os valores positivos de AT-skew indicam uma leve predominância de adenina em relação à timina, enquanto os valores negativos de GC-skew refletem maior frequência de citosina em relação à guanina (Balcázar *et al.*, 2026). Essa assimetria composicional é geralmente associada ao mecanismo de replicação assimétrica do DNA mitocondrial, no qual a exposição diferencial das fitas às condições mutagênicas resulta em desequilíbrios na frequência de nucleotídeos (Yu *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2024).

A depleção acentuada de guanina, especialmente nos genes codificadores de proteínas, reforça o papel predominante de pressões mutacionais na conformação da composição de bases (Yu *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2024). As pequenas diferenças observadas entre as espécies, como o maior conteúdo de citosina em *A. microlepis*, provavelmente refletem dinâmicas mutacionais específicas de linhagem, e não processos adaptativos marcantes a nível genômico.

Uso de códons, pressões seletivas e variabilidade molecular

Os genes codificadores de proteínas apresentaram, em sua maioria, códons de iniciação do tipo ATG, com ocorrências pontuais do códon alternativo GTG, padrão já descrito em outros mitogenomas de Cyprinodontiformes (Lema *et al.*, 2016; Sung *et al.*, 2016; Ren *et al.*, 2021). Os códons de terminação foram predominantemente TAA e TAG, em concordância com o padrão típico de expressão gênica mitocondrial (Qi *et al.*, 2026).

A análise do uso de códons revelou preferência por códons terminados em A ou C, refletindo o viés composicional do genoma e sendo consistente com as restrições impostas pela assimetria das fitas (Li *et al.*, 2024). Os valores de RSCU indicam que o viés mutacional exerce papel central na determinação do uso de códons. No entanto, não se pode descartar completamente a influência de seleção translacional, uma vez que diferenças no uso de códons entre espécies marinhas e eurialinas tem sido associadas à seleção por maior eficiência traducional em contextos ambientais específicos (Uddin; Chakraborty, 2017; Sebastian; Sukumaran; Gopalakrishnan, 2022). Contudo, embora as espécies de *Anableps* analisadas ocupem distintos ambientes, essa possível influência deve ser interpretada com cautela, dado o predomínio do viés mutacional observado.

Conservação estrutural de tRNAs e rRNAs

Os genes de tRNA apresentaram alto grau de conservação estrutural, com a maioria exibindo a conformação típica em folha de trevo. A ausência do braço DHU no *trnS1* foi observada em ambas as espécies, padrão amplamente reportado em mitogenomas de vertebrados e que não compromete a funcionalidade dessas moléculas, uma vez que estruturas alternativas podem garantir o reconhecimento pelas aminoacil-tRNA sintetases mitocondriais (Fiteha; Magdy, 2022). A presença de pareamentos não canônicos (wobble) em diferentes regiões estruturais sugere maior flexibilidade molecular, característica comum em tRNAs mitocondriais (Qi *et al.*, 2026). Essa plasticidade estrutural é considerada uma adaptação típica dos tRNAs mitocondriais, permitindo a manutenção da funcionalidade mesmo diante de simplificações estruturais, em um contexto de genoma altamente compacto (Li *et al.*, 2025; Qi *et al.*, 2026).

Os genes ribossomais (*rrnS* e *rrnL*) também apresentaram organização conservada, reforçando seu papel essencial na tradução mitocondrial. A elevada conservação desses elementos reflete fortes restrições funcionais, uma vez que alterações estruturais podem comprometer diretamente a eficiência do processo de síntese proteica e metabolismo mitocondrial (Hori; Engel; Kobayashi, 2023).

Implicações filogenéticas e contexto evolutivo de Anablepidae

A análise filogenética baseada em genomas mitocondriais completos para as duas espécies de Anablepidae preenche uma lacuna relevante dentro de Cyprinodontiformes, uma vez que diversas outras famílias da ordem, como Poeciliidae, Cyprinodontidae, Aphaniidae e Rivulidae, já possuem mitogenomas descritos e análises filogenéticas conduzidas nesse nível taxonômico (Gutiérrez *et al.*, 2015; Fast; Rakestraw; Sandel, 2023; López-Solano *et al.*, 2023). Nesse contexto, a obtenção dos mitogenomas completos para essas espécies representa uma contribuição significativa para a compreensão evolutiva do grupo, somando-se ao crescente número de genomas mitocondriais disponíveis para estudos comparativos e filogenômicos em Cyprinodontiformes.

A reconstrução filogenética baseada em genomas mitocondriais completos resultou em uma topologia bem suportada, consistente com hipóteses filogenéticas previamente propostas com base em dados moleculares multilocus e mitogenômicos para Cyprinodontiformes (Near *et al.*, 2012; Betancur-R *et al.*, 2013; Hughes *et al.*, 2018).

O posicionamento de Anablepidae como grupo-irmão de Poeciliidae está em concordância com estudos prévios (Amorim; Costa, 2018), reforçando a afinidade evolutiva entre essas linhagens dentro de Cyprinodontoides. Essa relação pode estar associada a processos históricos que moldaram a diversificação de linhagens neotropicais, incluindo eventos paleogeográficos como transgressões marinhas e a dinâmica de ambientes costeiros e estuarinos (Amorim; Costa, 2018; Sferco *et al.*, 2018; Sferco *et al.*, 2021; Rodríguez-Machado *et al.*, 2023; Morales *et al.*, 2024).

Em relação a Anablepidae, a diferenciação genética entre *A. anableps* e *A. microlepis* pode estar relacionada à dinâmica histórica dos ambientes estuarinos ao longo da costa norte da América do Sul (Watanabe *et al.*, 2014). Estudos anteriores identificaram linhagens mitocondriais distintas em *Anableps*, associadas a oscilações do nível do mar durante o Pleistoceno-Holoceno e à complexidade geomorfológica dos sistemas estuarinos, que podem atuar como barreiras ou facilitadores do fluxo gênico (Watanabe *et al.*, 2014). Esses processos podem ter contribuído tanto para a divergência intra quanto interespecífica dentro do gênero.

Apesar da alta resolução proporcionada pelos genomas mitocondriais completos, é importante reconhecer suas limitações. O DNA mitocondrial constitui um único locus herdado maternalmente e, portanto, pode não refletir integralmente a história evolutiva das espécies. Processos como introgressão, hibridização e retenção incompleta de linhagens podem gerar discordâncias entre sinais genealógicos. Nesse contexto, a integração de dados nucleares torna-se essencial para validar e refinar as relações filogenéticas aqui propostas, uma vez que marcadores multilocus são menos suscetíveis a vieses associados à herança uniparental e permitem uma reconstrução mais robusta da história evolutiva.

Em geral, este estudo amplia os recursos genômicos disponíveis para Cyprinodontiformes e preenche uma lacuna crítica para Anablepidae. Ao fornecer os estes mitogenomas completos para a família, estabelece uma base sólida para futuros estudos comparativos, filogenéticos e populacionais. Assim, este trabalho não apenas reforça hipóteses previamente estabelecidas para Anablepidae, como também amplia o entendimento das relações evolutivas dentro de Cyprinodontiformes, destacando a importância da incorporação de dados mitogenômicos em estudos filogenéticos do grupo.

5. CONCLUSÕES

Este estudo apresenta novos genomas mitocondriais completos para espécies da família Anablepidae, ampliando significativamente os recursos genômicos disponíveis para Cyprinodontiformes. Os resultados revelam um alto grau de conservação estrutural, com organização gênica típica de vertebrados, forte viés para A+T e padrões consistentes de assimetria nucleotídica. Os padrões de uso de códons foram majoritariamente explicados pelo viés mutacional, embora a possível influência de fatores ecológicos não possa ser completamente descartada.

A reconstrução filogenética baseada em genomas mitocondriais completos, com os 13 PCGs concatenados e inferidas por Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana, confirmou a proximidade evolutiva entre Anablepidae e Poeciliidae. Esses achados reforçam hipóteses evolutivas previamente propostas para o grupo e destacam a utilidade de dados mitogenômicos na resolução de relações filogenéticas em peixes teleósteos.

A elevada conservação na organização gênica, na composição nucleotídica e no uso de códons entre as duas espécies corrobora sua proximidade evolutiva e fornece um referencial molecular sólido para futuros estudos de filogeografia, taxonomia integrativa e evolução mitocondrial em Cyprinodontiformes, contribuindo para o entendimento da diversidade genética de peixes em ambientes costeiros e estuarinos da região neotropical.

6. AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação pelo apoio financeiro concedido.

7. DECLARAÇÃO DE DISPONIBILIDADE DE DADOS

Os dados gerados neste estudo serão disponibilizados publicamente no repositório NCBI/GenBank.

8. CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, Pedro F.; COSTA, Wilson JEM. Multigene phylogeny supports diversification of four-eyed fishes and one-sided livebearers (Cyprinodontiformes: Anablepidae) related to major South American geological events. **PLoS One**, v. 13, n. 6, p. e0199201, 2018.
- BALCÁZAR, Oscar David Albito et al. The Complete Mitogenome of Two *Trachinotus* Species and a Phylogenetic Analysis of the Pompano Subfamily Trachinotinae. **Diversity**, v. 18, n. 2, p. 88, 2026.
- BERNT, Matthias et al. MITOS: improved de novo metazoan mitochondrial genome annotation. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 69, n. 2, p. 313-319, 2013.
- BESSA-BRITO, Carla et al. Comparative synthesis of tandem repeats in the control region of *Epinephelus* mitogenomes (Peciformes: Epinephelidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 49, n. Suppl 1, p. e20250240, 2026.
- BETANCUR-R, Ricardo et al. The tree of life and a new classification of bony fishes. **PLoS currents**, v. 5, p. ecurrents.tol.53ba26640df0ccaee75bb165c8c26288, 2013.
- BOLGER, Anthony M.; LOHSE, Marc; USADEL, Bjoern. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114-2120, 2014.
- BRENNER, Matthias; KRUMME, Uwe. Tidal migration and patterns in feeding of the four-eyed fish *Anableps anableps* L. in a north Brazilian mangrove. **Journal of Fish Biology**, v. 70, n. 2, p. 406-427, 2007.
- CARVAJAL-VALLEJOS, F. M. et al. Genetic structure in the Amazonian catfish *Brachyplatystoma rousseauxii*: influence of life history strategies. **Genetica**, v. 142, n. 4, p. 323-336, 2014.
- DIERCKXSENS, Nicolas; MARDULYN, Patrick; SMITS, Guillaume. NOVOPlasty: de novo assembly of organelle genomes from whole genome data. **Nucleic acids research**, v. 45, n. 4, p. e18-e18, 2017.

FAST, Kayla M.; RAKESTRAW, Alex W.; SANDEL, Michael W. Complete mitochondrial genome of a livebearing freshwater fish (Cyprinodontiformes: Poeciliidae): *Poecilia parae*. **Mitochondrial DNA Part B**, v. 8, n. 2, p. 215-219, 2023.

FITEHA, Yosur G.; MAGDY, Mahmoud. The Evolutionary dynamics of the mitochondrial TRNA in the Cichlid Fish Family. **Biology**, v. 11, n. 10, p. 1522, 2022.

FURNESS, Andrew I. et al. How conflict shapes evolution in poeciliid fishes. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 3335, 2019.

GUEDES, Maria Eduarda Gomes; CORREIA, Tiago Gabriel. Plasma energetic substrates and hepatic enzymes in the four-eyed fish *Anableps anableps* (Teleostei: Cyprinodontiformes) during the dry and rainy seasons in the Amazonian Island of Maracá, extreme north of Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 19, n. 4, p. e210078, 2021.

GUTIÉRREZ, Verónica et al. First complete mitochondrial genome of the South American annual fish *Austrolebias charrua* (Cyprinodontiformes: Rivulidae): peculiar features among cyprinodontiforms mitogenomes. **BMC genomics**, v. 16, n. 1, p. 879, 2015.

HORI, Yutaro; ENGEL, Christoph; KOBAYASHI, Takehiko. Regulation of ribosomal RNA gene copy number, transcription and nucleolus organization in eukaryotes. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 24, n. 6, p. 414-429, 2023.

HUGHES, Lily C. et al. Comprehensive phylogeny of ray-finned fishes (Actinopterygii) based on transcriptomic and genomic data. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 24, p. 6249-6254, 2018.

KALYAANAMOORTHY, Subha et al. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. **Nature methods**, v. 14, n. 6, p. 587-589, 2017.

KATOH, Kazutaka; STANDLEY, Daron M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 4, p. 772-780, 2013.

KUMAR, Sudhir et al. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular biology and evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547-1549, 2018.

LEMA, Sean C. et al. Sequencing and characterization of the complete mitochondrial genome of the endangered Devils Hole pupfish *Cyprinodon diabolis* (Cyprinodontiformes: Cyprinodontidae). **Mitochondrial DNA Part B**, v. 1, n. 1, p. 705-707, 2016.

LETUNIC, Ivica; BORK, Peer. Interactive Tree of Life (iTOL) v6: recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool. **Nucleic acids research**, v. 52, n. W1, p. W78-W82, 2024.

LI, Jia-Yu et al. The First Complete Mitogenome Characterization and Phylogenetic Implications of *Elops machnata* (Teleostei: Elopiformes: Elopidae). **Biology**, v. 14, n. 7, p. 739, 2025.

LI, Manman et al. Comparative genomics of fish: insights into evolutionary processes. **International Journal of Molecular Zoology**, v. 14, 2024.

LÓPEZ-SOLANO, Alfonso et al. Complete mitochondrial genome of the Spanish toothcarp, *Aphanius iberus* (Valenciennes, 1846)(Actinopterygii, Aphaniidae) and its phylogenetic position within the Cyprinodontiformes order. **Molecular Biology Reports**, v. 50, n. 4, p. 2953-2962, 2023.

MESCOUTO, Niedja Luana da C. et al. Population structure and reproduction of *Anableps microlepis* in an estuary from Amazon. **Revista Uniaraguaia**, p. 176-194, 2023.

MIYA, Masaki et al. Evolutionary origin of the Scombridae (tunas and mackerels): members of a Paleogene adaptive radiation with 14 other pelagic fish families. **PloS one**, v. 8, n. 9, p. e73535, 2013.

MORALES, Pamela et al. Genomes of the *Orestias* pupfish from the Andean Altiplano shed light on their evolutionary history and phylogenetic relationships within Cyprinodontiformes. **BMC genomics**, v. 25, n. 1, p. 614, 2024.

NASCIMENTO, Francylenna L.; ASSUNÇÃO, Maria Ivaneide S. Ecologia reprodutiva dos tralhos *Anableps anableps* e *Anableps microlepis* (Pisces: Cyprinodontiformes: Anablepidae) no rio Paracauari, ilha de Marajó, Pará, Brasil. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**, v. 3, n. 3, p. 229-240, 2008.

NEAR, Thomas J. et al. Resolution of ray-finned fish phylogeny and timing of diversification. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 34, p. 13698-13703, 2012.

NELSON, Joseph S.; GRANDE, Terry C.; WILSON, Mark VH. **Fishes of the World**. John Wiley & Sons, 2016.

NGUYEN, Lam-Tung et al. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. **Molecular biology and evolution**, v. 32, n. 1, p. 268-274, 2015.

QI, Qian et al. Identified Optimal Codons and Phylogenetic Relationship in *Pseudobagrus* Species Based on Complete Mitogenomes. **Animals**, v. 16, n. 2, p. 279, 2026.

QIN, Qiang et al. Characterization of the complete mitochondrial genome of *Schizothorax kozlovi* (Cypriniformes, Cyprinidae, Schizothorax) and insights into the phylogenetic relationships of Schizothorax. **Animals**, v. 14, n. 5, p. 721, 2024.

QUEZADA-ROMEGIALLI, Claudio et al. The complete mitochondrial genome of the endemic and threatened killifish *Orestias ascotanensis Parenti*, 1984 (Cyprinodontiformes, Cyprinodontidae) from the High Andes. **Mitochondrial DNA Part A**, v. 27, n. 4, p. 2798-2799, 2016.

REN, Chuanchen et al. The complete mitochondrial genome of *Poropanchax normani* and phylogenetic studies of Cyprinodontidae. **Mitochondrial DNA Part B**, v. 6, n. 10, p. 2796-2798, 2021.

REZNICK, David N. et al. The origin and biogeographic diversification of fishes in the family Poeciliidae. **PloS one**, v. 12, n. 3, p. e0172546, 2017.

RODRÍGUEZ-MACHADO, Sheila et al. Disentangling historical relationships within Poeciliidae (Teleostei: Cyprinodontiformes) using ultraconserved elements. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 190, p. 107965, 2024.

RODRÍGUEZ-MACHADO, Sheila et al. Phylogeography of *Limia vittata* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae): geographical distribution of mitochondrial haplotypes is comparable to other Cuban poeciliids. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 140, n. 3, p. 459-470, 2023.

RONQUIST, Fredrik et al. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic biology**, v. 61, n. 3, p. 539-542, 2012.

SATOH, Takashi P. et al. Structure and variation of the mitochondrial genome of fishes. **BMC genomics**, v. 17, n. 1, p. 719, 2016.

SCHWAB, Ivan R. et al. Evolutionary attempts at 4 eyes in vertebrates. **Transactions of the American Ophthalmological Society**, v. 99, p. 145, 2001.

SEBASTIAN, Wilson; SUKUMARAN, Sandhya; GOPALAKRISHNAN, A. Comparative mitogenomics of Clupeoid fish provides insights into the adaptive evolution of mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) genes and codon usage in the heterogeneous habitats. **Heredity**, v. 128, n. 4, p. 236-249, 2022.

SFERCO, Emilia et al. The eldest grandmother, late Miocene† *Jenynsia herbsti* sp. nov. (Teleostei, Cyprinodontiformes), and the early diversification of the Anablepidae. **Journal of Vertebrate Paleontology**, v. 41, n. 6, p. e2039168, 2021.

SFERCO, Emilia et al. The rise of internal fertilization in the Anablepidae (Teleostei, Cyprinodontiformes): two new genera and species from the Miocene of Tucumán, Argentina. **Papers in Palaeontology**, v. 4, n. 2, p. 177-195, 2018.

SUN, Cheng-He et al. Mitochondrial genome structures and phylogenetic analyses of two tropical characidae fishes. **Frontiers in Genetics**, v. 12, p. 627402, 2021.

SUNG, Chia-Hsuan et al. The complete mitochondrial genome of *Poecilia formosa* (Actinopterygii: Cyprinodontiformes: Poeciliidae). **Mitochondrial DNA Part A**, v. 27, n. 6, p. 4331-4332, 2016.

TAN, Suxu et al. Comprehensive analysis of 111 Pleuronectiformes mitochondrial genomes: insights into structure, conservation, variation and evolution. **BMC genomics**, v. 26, n. 1, p. 50, 2025.

TIAN, Ran et al. Evolutionary impacts of purine metabolism genes on mammalian oxidative stress adaptation. **Zoological Research**, v. 43, n. 2, p. 241, 2022.

TORRES-DOWDALL, Julián et al. Genetic assimilation and the evolution of direction of genital asymmetry in anablepid fishes. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 289, n. 1974, p. 20220266, 2022.

UDDIN, Arif; CHAKRABORTY, Supriyo. Synonymous codon usage pattern in mitochondrial CYB gene in pisces, aves, and mammals. **Mitochondrial Dna Part A**, v. 28, n. 2, p. 187-196, 2017.

VAIDYA, Gaurav; LOHMAN, David J.; MEIER, Rudolf. SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. **Cladistics**, v. 27, n. 2, p. 171-180, 2011.

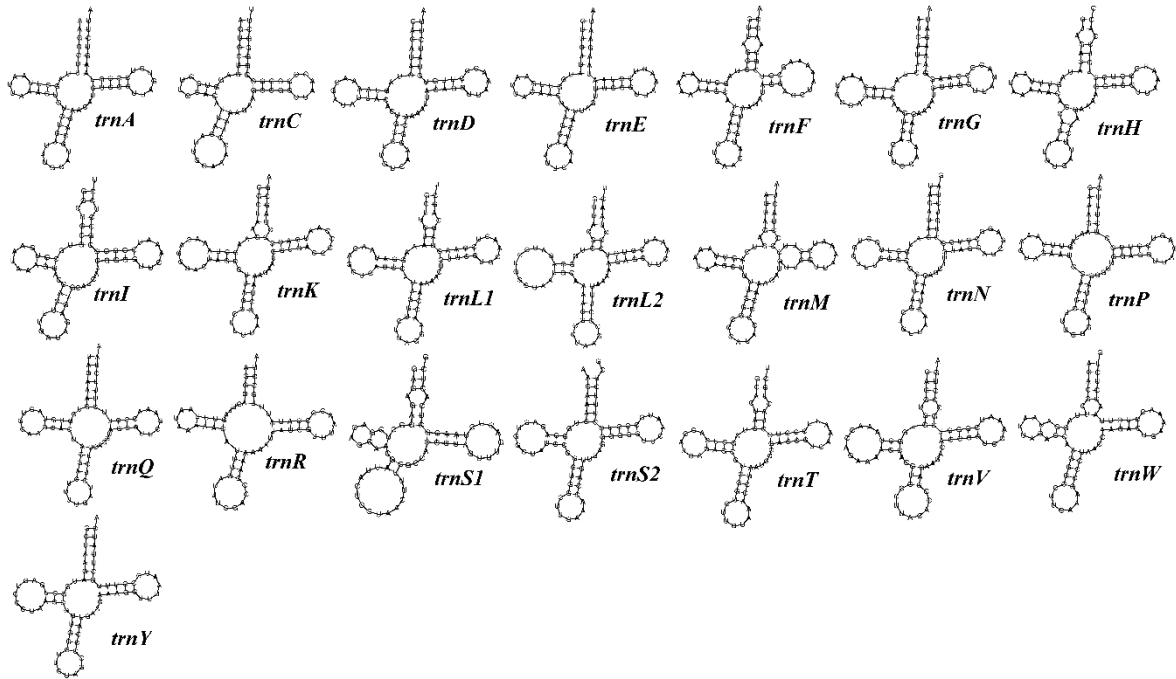
WATANABE, Luciana Almeida et al. The past and present of an estuarine-resident fish, the “four-eyed fish” *Anableps anableps* (Cyprinodontiformes, Anablepidae), revealed by mtDNA sequences. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. e101727, 2014.

YU, Jiaojiao et al. Characterization of the complete mitochondrial genome of *Otus lettia*: Exploring the mitochondrial evolution and phylogeny of owls (Strigiformes). **Mitochondrial DNA Part B**, v. 6, n. 12, p. 3443-3451, 2021.

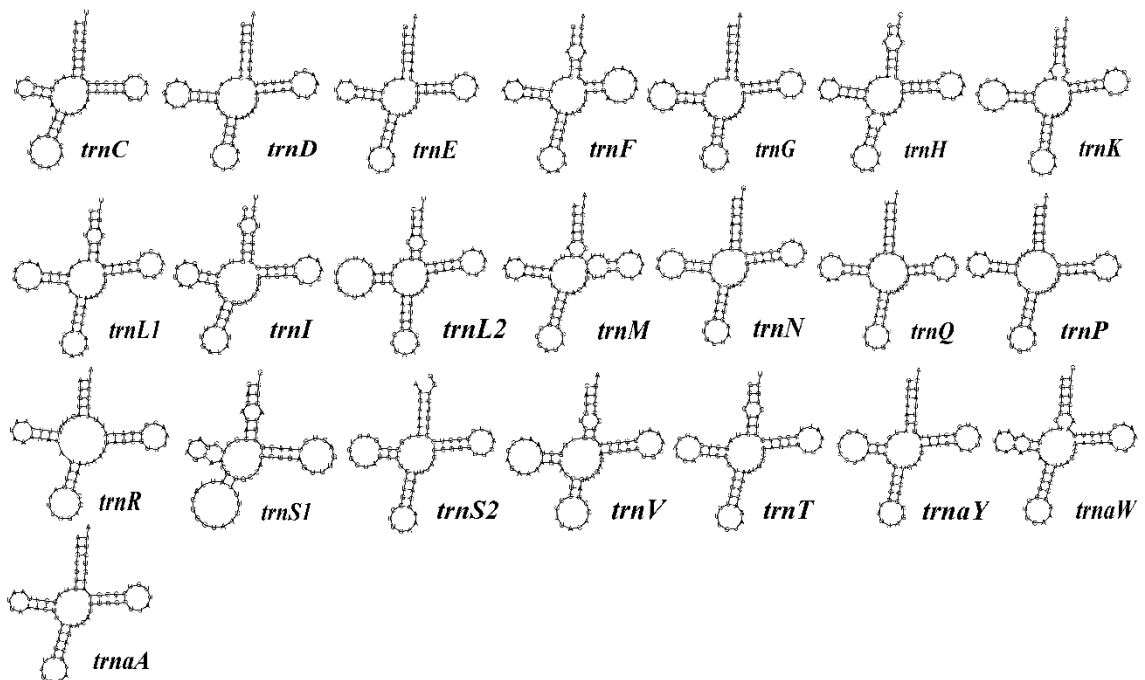
MATERIAL SUPLEMENTAR

Figura S1: Estruturas secundárias dos 22 genes de RNA de transferência (tRNA) mitocondrial de *Anableps*.

Anableps anableps



Anableps microlepis



Fonte: Autor (2026).

CAPÍTULO III

1. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho atingiu todos os objetivos propostos, resultando na caracterização completa dos genomas mitocondriais de *Anableps anableps* e *Anableps microlepis*. A montagem, anotação e caracterização dos mitogenomas permitiram descrever sua organização estrutural, composição nucleotídica, conteúdo gênico e padrões de uso de códons, ampliando o conhecimento genômico sobre a família Anablepidae.

Os mitogenomas de ambas as espécies apresentaram a organização típica dos vertebrados, composta por 37 genes e uma região controle, com elevada conservação na ordem gênica e na distribuição dos genes entre as fitas, corroborando o padrão previamente descrito para representantes de Cyprinodontiformes. Além disso, a composição nucleotídica revelou predominância de A+T e características estruturais semelhantes entre as duas espécies, evidenciando a conservação evolutiva de seus genomas mitocondriais.

As análises filogenéticas, baseadas nos genomas mitocondriais completos, confirmaram a proximidade evolutiva entre as famílias Anablepidae e Poeciliidae, reforçando hipóteses previamente propostas para a ordem Cyprinodontiformes. Dessa forma, os resultados obtidos demonstram o potencial dos mitogenomas completos como fonte de informações para estudos filogenéticos e evolutivos.

Por fim, os dados gerados ampliam a representatividade da família Anablepidae em bancos de dados públicos e constituem uma importante base para futuras pesquisas em filogenia, genômica comparativa, genética da conservação e evolução de peixes estuarinos. Além disso, este estudo reforça a eficiência das tecnologias de Sequenciamento de Nova Geração e das ferramentas bioinformáticas na obtenção e caracterização de genomas mitocondriais completos, contribuindo para o avanço do conhecimento sobre a biodiversidade genética dos peixes neotropicais.