

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ESTRUTURAL, MOLECULAR E GENÉTICA

FRANCIELE FERNANDA KERNISKE

MORFOLOGIA E ASPECTOS REPRODUTIVOS EM UMA POPULAÇÃO
ISOLADA DE *Psalidodon* aff. *fasciatus* NO PARQUE ESTADUAL DE VILA VELHA,
PARANÁ, BRASIL

PONTA GROSSA

2021

FRANCIELE FERNANDA KERNISKE

**MORFOLOGIA E ASPECTOS REPRODUTIVOS EM UMA POPULAÇÃO
ISOLADA DE *Psalidodon* aff. *fasciatus* NO PARQUE ESTADUAL DE VILA VELHA,
PARANÁ, BRASIL**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação com a Universidade Estadual do Centro-Oeste, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas (Área de concentração: Biologia Evolutiva)

Orientador: Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni
Coorientador: Prof. Dr. Igor de Paiva Affonso

PONTA GROSSA

2021

K39 Kemiske, Franciele Fernanda
Morfologia e aspectos reprodutivos em uma população isolada de *Psalidodon*
aff. *fasciatus* no Parque Estadual de Vila Velha, Paraná, Brasil / Franciele
Fernanda Kerniske. Ponta Grossa, 2021.
85 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Área de Concentração:
Biologia Evolutiva), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni.
Coorientador: Prof. Dr. Igor de Paiva Affonso.

1. Endogamia. 2. População natural. 3. Valor adaptativo. 4. Desenvolvimento
gonadal. I. Artoni, Roberto Ferreira. II. Affonso, Igor de Paiva. III. Universidade
Estadual de Ponta Grossa. Biologia Evolutiva. IV.T.

CDD: 581



Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva
Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa (Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética) e a Universidade Estadual do Centro Oeste (Departamento de Ciências Biológicas)



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 07/2021/UEPG

Ata referente à Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, uma Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, pelo(a) candidato(a) **Franciele Fernanda Kerniske**.

Aos trinta e um dias do mês de agosto de dois mil e vinte e um, sob a presidência do(a) Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni em sessão pública por sessão remota, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do(a) aluno(a) **Franciele Fernanda Kerniske**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Área de concentração em Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Prof. Dr. Nivaldo Ferreira do Nascimento (UFRPE), Prof. Dr. Vinícius Abilhoa (MHNCI), Prof. Dr. George Shigueki Yasui (UNESP) – Suplente. Atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e ao candidato das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir o(a) candidato(a) passou a defesa de sua dissertação intitulada: “MORFOLOGIA E ASPECTOS REPRODUTIVOS EM UMA POPULAÇÃO ISOLADA DE *Psolidodon aff. fasciatus* NO PARQUE ESTADUAL DE VILA VELHA, PARANÁ, BRASIL”. Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou a candidata **APROVADA**. A Presidência ressaltou que a obtenção do título de Mestre está condicionada ao disposto da atual aprovação de outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, **com validade de sessenta dias**; assim como comprovante de envio de um artigo científico proveniente de seu trabalho de dissertação a revista com Qualis igual ou superior a B1 (Biodiversidade – Capes) **até o prazo máximo de 90 dias após a defesa**; o não depósito da versão definitiva da Dissertação, bem como as cópias em CD (PDF) com todas as correções feitas e atestadas pelo orientador, assim como o comprovante de envio do artigo nestes prazos, anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Observação (se necessário)

Alteração de Título: sim ☐ não ☒

Novo título: _____

Ponta Grossa, 31 de agosto de dois mil e vinte e um.

Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni (UEPG)

Prof. Dr. Nivaldo Ferreira do Nascimento (UFRPE)

Prof. Dr. Vinícius Abilhoa (MHNCI)

Dedico esse trabalho a minha avó Sofia (in memorian).

AGRADECIMENTOS

O período pandêmico que persistiu ao longo do mestrado, faz com que meus agradecimentos sejam mais significativos. Por isso, agradeço primeiramente pela vida de todos vocês.

Agradeço especialmente ao Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni, meu orientador, pela oportunidade de participar desse projeto, pelo acolhimento no laboratório, paciência com meu processo de amadurecimento como pesquisadora e pelos diversos momentos que além do compartilhamento de conhecimento científico, consistiram em questões humanitárias.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Igor de Paiva Affonso por desde o início ter me incentivado a ir em busca dos meus sonhos.

Aos meus familiares por sempre estarem ao meu lado, sobretudo nos momentos mais difíceis. Em especial à minha mãezinha que sempre se dedicou para que eu atingisse meus objetivos.

Aos meus amigos queridos de longa data por nunca desistirem de mim e vibrarem por cada conquista.

À Bruna Angelina Mayer e à Luz Elena De la Ossa Guerra, mulheres que me inspiram e que foram peças fundamentais para que esse trabalho fosse realizado. Serei eternamente grata por nossa amizade e pelos incontáveis momentos que compartilhamos.

Aos meus colegas de laboratório e de turma, Jhon, Fernanda, Lucieli e Edna, a amizade de vocês tornou essa jornada memorável.

Aos demais colegas de mestrado, por me receberem tão bem e me ensinarem tanto. Sem exceção, todos possuem sua contribuição de forma direta ou indireta.

Ao Jonathan Pena Castro por ter dedicado seu tempo para me ensinar tanta coisa, por sua parceria e paciência.

À Profa. Dra. Rafaela Lopes Falaschi por sempre lembrar da importância das mulheres na ciência e incentivar outras mulheres, e ao Prof. Dr. Mateus Henrique Santos por todas as contribuições e conselhos.

Aos professores da UEPG e de todas as demais instituições que estiveram envolvidas na realização desse projeto. Sou grata por me permitirem utilizar de seus laboratórios e aprender com vocês, mais uma vez atestando de que a ciência é um trabalho em equipe.

À UEPG e a UTFPR por fornecerem toda a infraestrutura e apoio para realização deste trabalho. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa. Aos administradores do Parque Estadual de Vila Velha e aos órgãos responsáveis por viabilizar esse projeto.

“Estou entre aqueles que acham que a ciência tem uma grande beleza.”

Marie Curi

RESUMO

A endogamia tende a reduzir a variabilidade genética intrapopulacional, aumentando a frequência de alelos deletérios que normalmente expressam-se em homozigose recessiva. Por consequência, populações consanguíneas, sobretudo quando pequenas e isoladas, podem sofrer influências negativas no valor adaptativo e vulnerabilidade à extinção. Em populações naturais, devido à mecanismos fisiológicos e comportamentais, espera-se que o endocruzamento seja evitado. Entretanto, os organismos estudados nesse trabalho, caracterizam uma população pequena de peixes neotropicais (*Psalidodon* aff. *fasciatus*), popularmente conhecidos como lambaris, que habitam um ambiente natural com rara configuração geológica em forma de poço (Furna 2 do Parque Estadual de Vila Velha), refletindo em um isolamento intra e interespecífico, sendo assim, a endogamia não pode ser evitada entre esses peixes. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho consistiu na investigação de efeitos do isolamento populacional, considerando aspectos morfológicos e reprodutivos da espécie. Para isto, análises morfométricas foram aplicadas em radiografias digitais a fim de investigar malformações congênitas. Também, foi realizada análise histológica dos órgãos reprodutores, para a caracterização dos estádios de desenvolvimento gonadal. Bem como, determinou-se a razão sexual, a relação peso-comprimento e fator de condição relativo (Kn). Os resultados apontam indivíduos com deformidades na coluna com uma ampla variação no número de vértebras caudais, e deformações corporais suportadas pelo corpo achatado e curvatura na coluna vertebral, o que reflete a ausência de fluxo gênico e endogamia nessa população. Um potencial modelo para estudos em Evo-Devo. A proporção sexual apresentou uma predominância significativa de machos (1M: 0,6 F). A relação peso total e comprimento total foi $W_T = 0.0002 L_T^{2.3039}$, apresentando um crescimento alométrico negativo, indicando, portanto, uma maior alocação de energia no comprimento do que em peso. O bem-estar foi determinado individualmente, não foi observado diferença significativa entre os sexos, ambos com o valor médio de $Kn = 0.95$. Foram caracterizados cinco estádios de desenvolvimento gonadal, sendo: repouso, maduro inicial, maduro, parcialmente vazio e totalmente vazio, semelhante a outros lambaris. Os resultados obtidos sugerem que o isolamento natural esteja se refletindo em efeitos de endogamia, sensivelmente percebido pela ocorrência de malformações congênitas, e isso pode ter implicações para o valor adaptativo da população.

Palavras-chave: Endogamia. População Natural. Valor Adaptativo. Desenvolvimento Gonadal.

ABSTRACT

Inbreeding decreases intrapopulation genetic variability, increasing the frequency of deleterious alleles that are normally expressed only in recessive homozygosis. Consequently, inbreeding populations, especially when small and isolated, may suffer negative influences on the adaptive value and vulnerability to extinction. In natural populations, due to physiological and behavioral mechanisms, inbreeding is expected to be avoided. However, the organisms studied in this work, characterize a small population of neotropical fish (*Psalidodon aff. fasciatus*), popularly known as lambaris, that live a natural environment with a rare geological configuration, in the shaped of well (*Furna 2 Vila Velha State Park*) reflecting in an intra and interspecific isolation, therefore, inbreeding cannot be avoided among these fish. This way, the objective of this work was to investigate the effects of population isolation, considering morphological and reproductive aspects of the species. To this, morphometric analyzes were applied on digital radiographs in order that investigate congenital malformations. Also, histological analysis of organs reproductive organs was carried out to characterize the stages of gonadal development. Not only, sex ratio, weight-length relationship and relative condition factor (Kn) were determined. The results indicate fish with spinal deformities, including wide variation in the number of caudal vertebrae and corporal deformations related to a flattened body and spinal curvature, reflecting the absence of gene flow and inbreeding in this population. A potential model into Evo-Devo studies. The sexual proportion showed a significant predominance of males (1M: 0,6 F). The total weight and total length relationship was $W_T = 0.0002 L_T^{2.3039}$, showing a negative allometric growth, indicating a greater allocation of energy in length than in weight. Welfare index was determined individually. No significant difference was observed between the sexes, both had a mean value of $Kn = 0.95$. Five stages of gonadal development were characterized being resting, initial ripe, mature, partially spent, totally spent, similar to the other lambaris. The results obtained suggest that the natural isolation is being reflected in inbreeding effects, sensitively perceived by the occurrence of congenital malformations, and this may have implications for the adaptive value of the population.

Keywords: Inbreeding. Natural Populations. Adaptive Value. Gonadal Development

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa representando a localização do PEVV.....	13
Figura 2 - Atrativos PEVV. Em (a) Escultura em arenito com formato de taça, (b) <i>Furna 2</i> no PEVV, (c) Lagoa Dourada.....	14
Figura 3 - Representação das <i>furnas</i> e Lagoa Dourada.....	16
Figura 4 - Bacia total do Rio Guabiroba.....	17
Figura 5 - Microambientes nas lagoas.....	18
Figura 6 - <i>Psalidodon aff. fasciatus</i> coletado na <i>Furna 2</i> do Parque Estadual de Vila Velha, Brasil (CP 8 cm).....	20
Figura 7 - <i>Furna 2</i> do PEVV. Em (a) Imagem aérea, (b) Vista pelo mirante, (c) Interior da <i>furna</i>	28
Figura 8 - Representação das medidas morfométricas aferidas.....	29
Figura 9 - Localização e esquematização das <i>furnas</i> do Parque Estadual de Vila Velha, Paraná, Brasil. Em (a) detalhe da hidrografia da América do Sul, com destaque para o local de coleta. Em (b) perfil das <i>furnas</i> com destaque para a <i>Furna 2</i> representada também em (c). A área sombreada em cada <i>furna</i> representa a água em cada uma, exceto a número 3 que não sofreu processos de inundação pelo lençol freático. Em (d) um exemplar de <i>Psalidodon aff. fasciatus</i> . Bar = 1 cm.....	36
Figura 10 - Marcações anatômicas usadas em radiografias digitais para análises morfométricas. 1: região orbital anterior; 2: região orbital posterior; 3: região dorsal da cabeça; 4: Inserção da região anterior da barbatana dorsal; 5: Região posterior da inserção da barbatana dorsal; 6: Região dorsal do início da nadadeira caudal; 7: Região ventral do início da nadadeira caudal; 8: Região posterior da inserção da nadadeira anal; 9: Região anterior da inserção da nadadeira anal; 10: Inserção da barbatana peitoral; 11: Região ventral da cabeça (1–11 com base em CASTRO et al., 2014). 12: Primeira vértebra pré-caudal; 13: Primeira vértebra caudal; 14: Última vértebra caudal (12–14 com base em BIRD; MABEE, 2003), onde as vértebras pré-caudais são aquelas posteriores ao aparelho de Weber e anteriores às vértebras caudais. As vértebras pré-caudais compreendem centros, arcos e espinhas neurais, e parapófises e costelas. Preventiva e / ou a primeira vértebra caudal pode ser categorizada como uma vértebra “transitória”, exibindo arcos hematóides não fundidos ou parapófises, costelas drasticamente encurtadas e ausência de coluna	

vertebral. As vértebras caudais compreendem centros, arcos neurais e espinhas neurais e arcos hematosos e espinhas.....	37
Figura 11 - Padrões anatômicos estabelecidos para <i>Psalidodon aff. fasciatus</i> da <i>Furna 2</i> , com base na morfologia da coluna vertebral estabelecida por imagens de Raio-X. (a) Padrão normal (Pn) – indivíduos sem nenhuma deformação; (b) Malformação leve (Mm) – mínimo desvio da coluna vertebral; (c) Malformação acentuada (Sm) –alto desvio da coluna.....	39
Figura 12 - Coluna vertebral deformada de <i>Psalidodon aff. fasciatus</i> mostrando anormalidades na região da nadadeira caudal, como extra-ossificações e fusões das vértebras caudais, compressões vertebrais, anomalias neurais e hemais da coluna vertebral, defeitos de ossificação em hipurais e malformação da nadadeira caudal.....	40
Figura 13 - Análises multivariadas de <i>Psalidodon aff. fasciatus</i> da <i>Furna 2</i> de acordo com as deformidades. (A) Análise de componentes principais (PCA). (B) Análise de variáveis canônicas (CVA). Representação da deformação (azul escuro) de cada PC (variável canônica) em relação à configuração de referência (azul claro) nos peixes.....	41
Figura 14 - Análise de variáveis canônicas de <i>Psalidodon aff. fasciatus</i> . Representação da deformação (azul escuro) de cada CV (variável canônica) em relação à configuração de referência (azul claro) nos peixes. (<i>furna</i> , F) = exemplares fêmeas da <i>Furna 2</i> ; (<i>furna</i> , M) = exemplares machos da <i>Furna 2</i> ; (Mogi, I) = exemplares do Rio Mogi-Guaçu com sexo indeterminado.....	42
Figura 15 - Ovários de <i>Psalidodon aff. fasciatus</i> corados com HE. I – Estádio repouso contendo oócito perinuclear inicial e avançado, com citoplasma basofílico e vários nucléolos no núcleo (em destaque), II – Estádio maduro inicial além de oócitos perinucleares apresenta oócitos pré-vitelogênicos com alvéolos corticais característicos (em destaque - flecha), III – Estádio maduro predominância de oócitos vitelogênicos preenchidos por grânulos de vitelo, III* - Imagem macroscópia de ovário maduro, pronto para desova, IV – Estádio parcialmente vazio com oócitos em todas as fases de crescimento e também folículos pós-ovulatórios (em destaque – flecha), V – Estádio totalmente vazio contendo oócitos perinucleares, folículo pós-ovulatório e oócito atrésico (em destaque).....	51

Figura 16 - Distribuição de frequências percentuais dos estádios de maturação gonadal para as fêmeas de <i>Psalidodon</i> aff. <i>fasciatus</i> de acordo com as estações do ano (Verão - janeiro a fevereiro, outono - abril a junho, inverno - julho a setembro, verão - outubro a dezembro).....	52
Figura 17 - Testículos de <i>Psalidodon</i> . aff. <i>fasciatus</i> corados com HE. I – Estádio repouso organizado em cistos contendo espermatogônias no túbulo seminífero e lúmen ocluído, II – Estádio maduro inicial com presença de espermatozoides em pequena proporção dentro do lúmen e cistos de células espermatogênicas no túbulo seminífero, III – Estádio maduro exibindo lúmen repleto de espermatozoides embutidos na secreção de acidófilos e alguns cistos de células espermatogênicas, IV – Estádio parcialmente vazio contendo poucos espermatozoides, V – Estádio totalmente vazio apenas com espermatozoides residuais. Flecha= espermatogônias, *=espermatozoides.....	53
Figura 18 - Distribuição de frequências percentuais dos estádios de maturação gonadal para os machos de <i>Psalidodon</i> aff. <i>fasciatus</i> de acordo com as estações do ano (Verão - janeiro a fevereiro, outono - abril a junho, inverno - julho a setembro, verão - outubro a dezembro).....	54
Figura 19 - Distribuição da frequência relativa de machos e fêmeas de <i>P. aff fasciatus</i> coletados na <i>Furna 2</i> do PEVV no período 2019-2020.....	55
Figura 20 - Representação gráfica da relação peso-comprimento para ambos os sexos agrupados <i>P. aff. fasciatus</i> da <i>Furna 2</i> do PEVV.....	56
Figura 21 - Valores individuais do fator de condição relativo (K_n), em torno do valor padrão ($K_n = 1,0$), em relação ao peso total.....	57
Figura 22 - Média mensal de temperatura do ar para o município de Ponta Grossa no período de 02/2019 a 01/2020.....	58
Figura 23 - Média mensal de precipitação para o município de Ponta Grossa no período de 02/2019 a 01/2020.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comprimento padrão e peso total dos espécimes.....	38
Tabela 2 - Teste de independência Qui-Quadrado entre o número de machos e fêmeas de <i>Psolidodon</i> aff. <i>fasciatus</i> com padrões de anomalias vertebrais. Porcentagens relativas entre parentêses.....	39
Tabela 3 - Razão sexual de <i>Psolidodon</i> aff. <i>fasciatus</i>	55

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	13
1.1 CARACTERIZAÇÃO DO PARQUE ESTADUAL DE VILA VELHA	13
1.1.1 Aspectos gerais do parque	13
1.1.2 Furnas	15
1.1.3 Ictiofauna do PEVV	16
1.2 DIVERSIDADE E RECLASSIFICAÇÃO DA ESPÉCIE <i>Astyanax fasciatus</i>	19
1.3 OCORRÊNCIA DE <i>Psalidodon</i> aff. <i>fasciatus</i> NA REGIÃO DO PEVV	20
1.4 ENDOGAMIA NA NATUREZA.....	21
1.5 BIOLOGIA REPRODUTIVA DE TELEÓSTEOS COM ÊNFASE NOS CARACÍDEOS.....	23
1.5.1 Razão sexual	24
1.5.2 Relação peso-comprimento e fator de condição (K)	25
2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	27
2.1 JUSTIFICATIVA	27
2.2 OBJETIVOS	27
2.2.1 Objetivo geral	27
2.2.2 Objetivos específicos	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 LOCAL DE AMOSTRAGEM E AMOSTRAS	28
3.2 PARÂMETROS BIOMÉTRICOS.....	29
3.3 EXAMES RADIOGRÁFICOS.....	29
3.4 MORFOMETRIA GEOMÉTRICA	30
3.5 RAZÃO SEXUAL	30
3.6 HISTOLOGIA DAS GÔNADAS	31
3.7 RELAÇÃO PESO-COMPRIMENTO E FATOR DE CONDIÇÃO RELATIVO (KN).....	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5 CONCLUSÃO GERAL	63
REFERÊNCIAS	64
ANEXOS	78

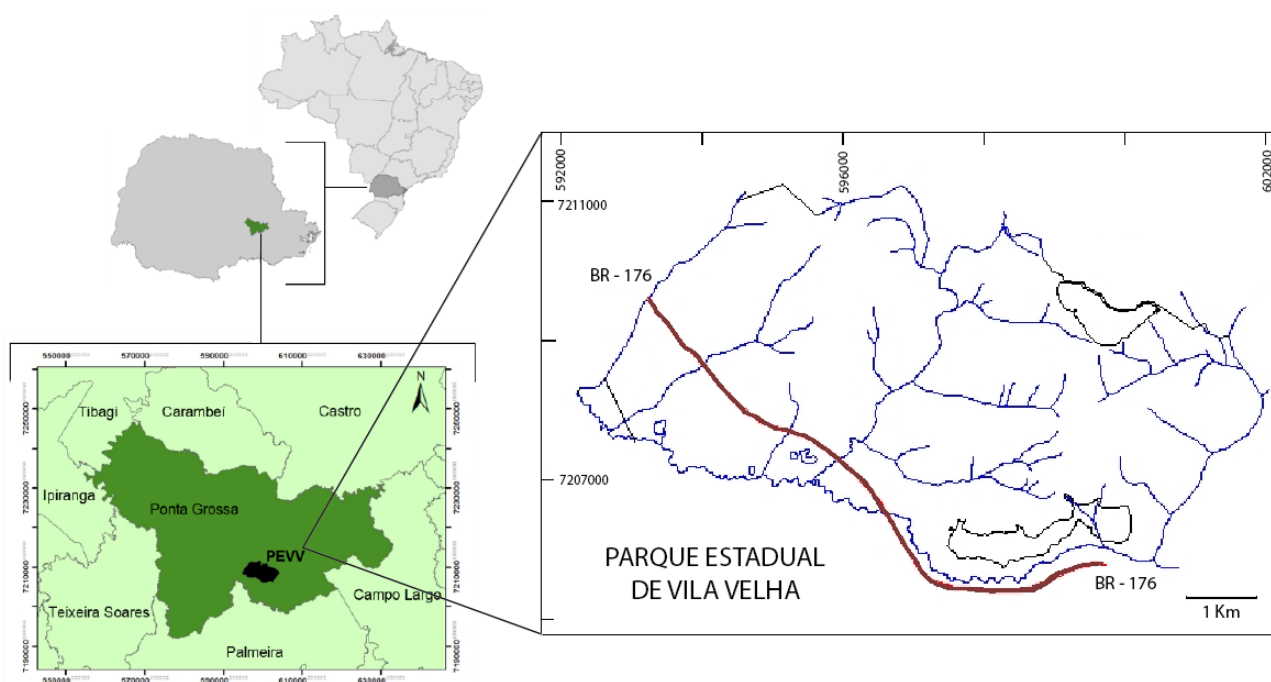
1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 CARACTERIZAÇÃO DO PARQUE ESTADUAL DE VILA VELHA

1.1.1 Aspectos gerais do parque

O Parque Estadual de Vila Velha (PEVV) abrange uma área de 3.122,11 ha, localiza-se entre as coordenadas 25°12'34'' e 25°15'35'' S, 49°58'04'' e 50°03'37'' W no segundo planalto paranaense (Figura 1), região dos Campos Gerais, município de Ponta Grossa (CAMPOS; DALCOMUNE, 2011). Encontra-se no curso superior da bacia do rio Tibagi, e envolve a bacia do rio Quebra Perna e do rio Guabirola (CAMPOS; DALCOMUNE, 2011). O clima no local é do tipo Cfb, de acordo com a classificação de Koeppen, clima temperado, com temperatura média anual de 17,8° C (CAMPOS; DALCOMUNE, 2011). A precipitação anual média é de 1554 mm, sendo janeiro e agosto os meses mais chuvoso e seco, respectivamente (IAP, 2004).

Figura 1 – Mapa representando a localização do PEVV.



Fonte: Adaptado de IAP (2004); KOVALSYKI (2016)

O PEVV foi instituído como Unidade de Conservação (UC) no ano de 1953, visando garantir a conservação de seu rico patrimônio natural (MELO et al., 2011). A UC tem grande relevância científica e turística, pois abriga diferentes ecossistemas, relevos de exceção, e

espécies endêmicas de flora e fauna (MELO et al., 2011). Dentre as formas características de relevo existentes no PEVV, podem ser citados, os escarpamentos, morros, testemunhos, fendas e *furnas* (MELO et al., 2011). Os atrativos que se destacam estão retratados na Figura 2.

Figura 2 – Atrativos PEVV. Em (a) Escultura em arenito com formato de taça, (b) *Furna 2* no PEVV, © Lagoa Dourada.



Fonte: A autora

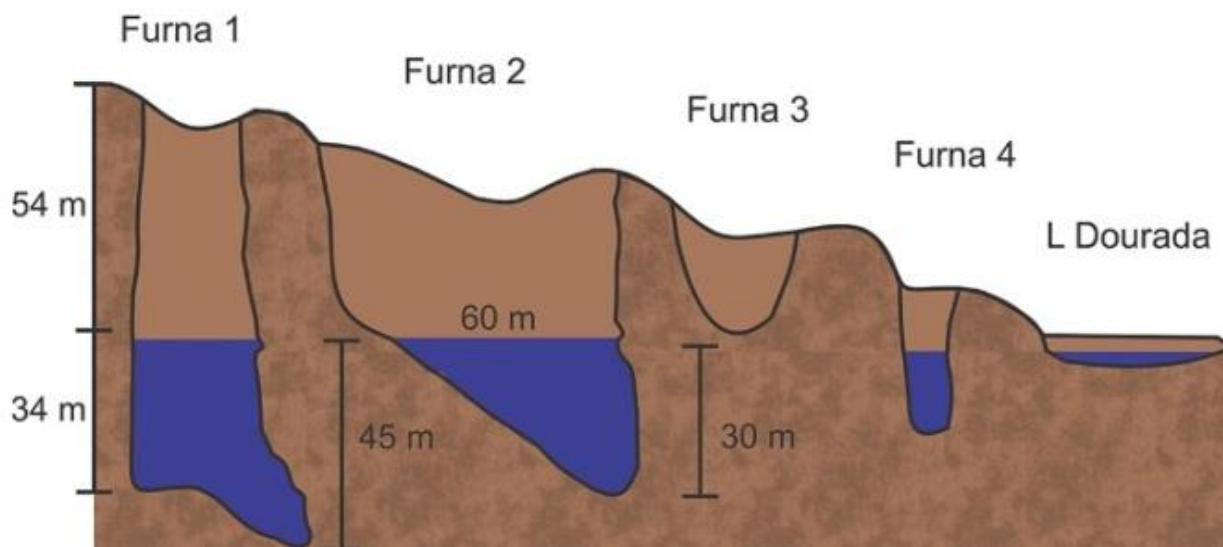
1.1.2 Furnas

A região dos Campos Gerais apresenta paisagens cênicas decorrentes de processos e fenômenos geológicos há milhões de anos. No PEVV as transformações geológicas tiveram início no Ordoviciano superior, durante a formação da bacia do Paraná (ASSINE, 1996). A Formação Furnas com idade siluro-devoniana (entre 395 e 421 milhões de anos) destaca-se na região (GUIMARÃES et al., 2007). São feições no relevo resultantes do processo de carstificação da rocha, constituída predominantemente por quartzo (MELO et al., 2011).

As *furnas* estão entre as formas de relevo mais marcantes da região, representando um patrimônio geológico único no PEVV, são conhecidas como “poços de desabamento” (MELO; GIANNINI, 2007). Isso porque se formaram pela ação de águas pluviais acidificadas, que devido a vasta rede de fraturas existentes nos arenitos tiveram a infiltração facilitada (LETENSKI et al., 2011). Como consequência, o mineral caulinita que faz a ligação com o quartzo foi dissolvido lentamente, e, por meio da circulação da água no arenito esses materiais foram removidos, assim, ocorreu naturalmente a escavação das cavidades subterrâneas que cresceram em direção à superfície resultando no colapso do teto rochoso (LETENSKI et al., 2011).

No PEVV são encontradas várias *furnas*, com algumas se destacando (Figura 3), dentre elas, a *Furna 1*, *2* e *4*, que possuem lagos formados pelo lençol freático, a *Furna 3* com ausência de água, e a Lagoa Dourada, uma *furna* assoreada em estágio terminal que recebe águas barrentas com sedimentos suspensos durante as inundações (MELO; GIANNINI, 2007; MELO et al., 2011).

Figura 3 – Representação das *furnas* e Lagoa Dourada.



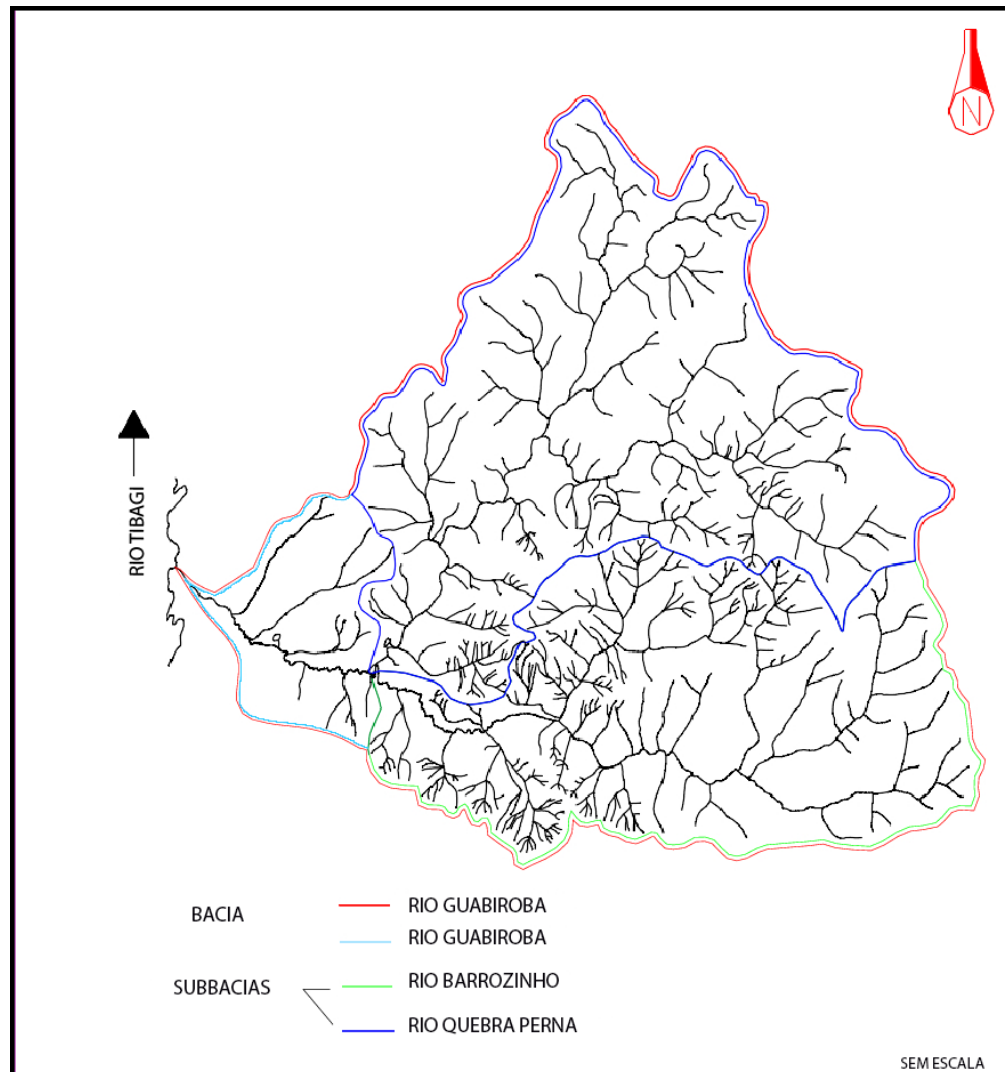
Fonte: Adaptado de MAYER (2020)

Esses poços de desabamento no PEVV possuem diâmetro médio de 80m, lâmina de água de 50m de profundidade e paredes atingindo até 110m (CAMPOS; DALCOMUNE, 2011). As *furnas* possuem características geológicas exclusivas, abrigando espécies de flora e fauna altamente especializadas às condições desses microambientes, especialmente ao se considerar os ambientes aquáticos (IAP, 2004).

1.1.3 Ictiofauna do PEVV

O rio Guabiroba, formado pela união do rio Barrozinho e rio Quebra Perna (Figura 4), contribui para a diversidade ictiológica do parque, pois, o contato do rio Guabiroba com as lagoas existentes na UC permite o deslocamento de espécies migradoras no período reprodutivo (SOUZA-MICHELS et al., 2011). A Lagoa Dourada é um desses ambientes com grande diversidade de espécies de peixes regionais, e exerce papel fundamental na reprodução e sobrevivência dessas espécies, garantindo a manutenção da diversidade de peixes existentes na UC (ARTONI; ALMEIDA, 2003; ARTONI; SHIBATTA, 2006).

Figura 4 – Bacia total do Rio Guabiroba



Fonte: IAP (2004)

Ainda, as lagoas do parque possuem microambientes que servem como local de refúgio e desova, além de representarem fonte energética para os peixes, pois, possuem troncos e galhos, plantas macrófitas nas margens e no fundo de suas águas, e uma importante macrofauna de invertebrados (Figura 5). (SOUZA-MICHELS et al., 2011).

Figura 5 – Microambientes nas lagoas



Fonte: A autora

Os representantes das ordens Characiformes e Siluriformes são predominantes na composição da ictiofauna do PEVV, assim como ocorre em toda região Neotropical (LÉVÊQUE et al., 2008). A fauna de peixes apresenta similaridade entre as lagoas como consequência de fatores abióticos correspondentes, já que a maioria das lagoas são *furnas* que sofreram assoreamento (SOUZA-MICHELS et al., 2011).

Ao se considerar as *furnas*, não são encontradas espécies de peixes, com exceção da *Furna 2*. Um ambiente extremamente vulnerável, que abriga em suas águas lânticas uma espécie isolada e endêmica de peixe, pequenos caracídeos popularmente conhecidos como lambaris (SHIBATTA; ARTONI 2005). Cabe ressaltar que esses lambaris também foram verificados na *Furna 1* do PEVV, mas que essa população foi extinta devido à eutrofização da

água desencadeada pelos excrementos liberados no período reprodutivo de aves que habitam o local (MATOSO et al., 2002; MATOSO et al., 2010).

1.2 DIVERSIDADE E RECLASSIFICAÇÃO DA ESPÉCIE *Astyanax fasciatus*

Os peixes detêm uma grande riqueza, representando aproximadamente 50% de todos os vertebrados, com mais de 33 mil espécies descritas (VAZZOLER, 1996; FROESE; PAULY, 2018). Isso reflete em peixes com uma variedade de formas e padrões de ciclo de vida, que habitam lugares com inúmeras condições bióticas e abióticas (VAZZOLER, 1996). Na região Neotropical se concentra a mais rica e diversa ictiofauna de água doce do planeta (LOWE McCONNELL, 1999; REIS; KULLANDER; FERRARIS, 2003). Os Characiformes compreendem um dos maiores grupos de peixes da região Neotropical (NELSON, 2006). Essa ordem possui uma diversificada ictiofauna, com animais variando consideravelmente em morfologia e tamanho, que vivem em ambientes lóticos e lênticos, e exibem distintos hábitos alimentares (MOREIRA, 2007) e de reprodução (VAZZOLER, 1996).

Astyanax Baird & Girard, 1854 pertence à família Characidae, a mais complexa dentre a ordem dos Characiformes (OLIVEIRA et al., 2011). São dominantes na América do Sul com uma diversidade de tamanhos e formas corporais (GERY, 1977), com mais de 150 espécies descritas e distribuídas em praticamente todos os cursos de água da região Neotropical (MIRANDE, 2010; ESCHMEYER; FONG, 2017). O número diploide para esses caracídeos varia entre $2n=36$, 46, 48 e 50 cromossomos (MORELLI et al., 1983), com esse último sendo o mais frequente e também considerado o $2n$ ancestral (KAVALCO; MOREIRA-FILHO, 2003). Ainda, “complexos de espécies” são relatados para o grupo, podendo ser destacado o complexo de espécies crípticas *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819) onde o número cromossômico varia de $2n=45$ a $2n=50$ (ARTONI et al., 2006; PAZZA; KAVALCO; BERTOLLO, 2006).

A filogenia desse grupo é um dos maiores desafios para a sistemática de peixes neotropicais, e, uma classificação estável ainda não pôde ser estabelecida (TERÁN; BENITÉZ; MIRANDE, 2020). Uma vez que, por compartilharem características morfológicas muito similares, a identificação e delimitação entre as espécies é dificultada (ORNELAS-GARCIA et al., 2008; MIRANDE, 2010; OLIVEIRA et al., 2011). O gênero já foi considerado dentro da subfamília Tetragonopterinae, e, atualmente é reconhecido como *Incertae sedis*, (LIMA et al., 2003; SILVA et al., 2020). Contudo, em uma recente revisão taxonômica inicial baseada em

caracteres morfológicos e moleculares, o não monofiletismo do grupo foi apontado, resultando na reclassificação de várias espécies atribuídas ao gênero. Dentre elas, o complexo *Astyanax fasciatus*, realocado para o gênero *Psalidodon* Eigenmann, 1911 agora reconhecida como *Psalidodon fasciatus* (Cuvier, 1819) (PASA et al., 2021; TERÁN; BENITÉZ; MIRANDE, 2020).

1.3 OCORRÊNCIA DE *Psalidodon* aff. *fasciatus* NA REGIÃO DO PEVV

No Rio São Francisco, alto curso do Rio Paraná, são encontrados os verdadeiros representantes da espécie *Psalidodon fasciatus*. Indivíduos oriundos de diferentes lugares possivelmente são espécies distintas (MELO, 2005; PASA et al., 2021). Esses peixes possuem a nadadeira caudal com coloração avermelhada, são onívoros, e apresentam comprimento médio de 10 cm (GARCIA et al., 2001; REIS; KULLANDER; FERRARIS, 2003). Entretanto, alguns autores ainda consideram a espécie distribuída em outros locais, como Argentina e México (SCHMITTER-SOTO, 2017). Apesar de ter sido reconhecido como um complexo de espécies (ARTONI et al., 2006, PAZZA; KAVALCO; BERTOLLO, 2006), *Psalidodon fasciatus* continua sendo utilizado na literatura para identificar populações que não pertencem à espécie. Devido à semelhança morfológica, os indivíduos encontrados no rio Tibagi e seus afluentes são identificados como *Psalidodon* aff. *fasciatus* (Figura 6).

Figura 6 – *Psalidodon* aff. *fasciatus* coletado na Furna 2 do Parque Estadual de Vila Velha, Brasil (CP 8cm).



Fonte: Arquivo pessoal de Luz Elena de La Ossa Guerra

A ocorrência simpátrica de lambaris do gênero *Psalidodon* foi detectada no alto rio Tibagi e Lagoa Dourada, com $2n=48$ e $2n=50$ cromossomos (ARTONI; ALMEIDA, 2003).

Também, Artoni et al. (2006) incluindo exemplares do rio Cará-Cará, identificaram três citótipos distintos na região, designados A, B e C. O citótipo A com $2n=48$ ($6m+18sm+14st+10^a$) e B com $2n=50$ ($8m+18sm+14st+10^a$) cromossomos exibiram similaridade na distribuição da heterocromatina constitutiva, enquanto o citótipo C apresentou número diploide e fórmula cariotípica idêntica ao citótipo B, porém, mostrou-se divergente dos demais quanto à distribuição da heterocromatina constitutiva (ARTONI et al., 2006), corroborando, portanto, com o complexo de espécies crípticas apontado por Artoni e Almeida (2003).

Entretanto, diferindo dos demais peixes da região, os lambaris da *Furna 2* apresentaram exclusivamente $2n=48$ cromossomos ($6m+18sm+14st+10^a$) (ARTONI; ALMEIDA, 2003; ARTONI et al., 2006). Exibindo cariótipos semelhantes entre machos e fêmeas, além da ausência de um sistema de cromossomos sexuais morfologicamente diferenciado, já as regiões organizadoras de nucléolos (Ag-RONs) foram localizadas nos pares cromossômicos 4 e 5 na região distal do braço curto, e a heterocromatina constitutiva revelou-se distribuída preferencialmente na região telomérica dos cromossomos acrocêntricos (ARTONI; ALMEIDA, 2003; GROSS et al., 2004). Ademais, Gross et al. (2004) relataram um caso de triploidia em uma fêmea, com $2n=3x=72$ cromossomos ($9m+27sm+21st+15^a$). Em decorrência destes estudos, foi sugerido que as populações de *Psalidodon* aff. *fasciatus* do rio Tibagi e PEVV são geneticamente diferentes (MATOSO et al., 2010).

1.4 ENDOGAMIA NA NATUREZA

Populações naturais sujeitas à endogamia podem apresentar dificuldades para a sua manutenção no ambiente, pois, o endocruzamento tende a reduzir a variabilidade genética intrapopulacional, diminuindo a porcentagem de heterozigotos. Assim, os alelos deletérios que normalmente expressam-se em homozigose recessiva aumentam em frequência (KELLER; WALLER, 2002). Por consequência, populações endogâmicas tornam-se mais suscetíveis à mortalidade influenciada pelo ambiente, às doenças, à predação, e têm a taxa de crescimento e reprodução afetadas, além da maior vulnerabilidade à extinção (AULSTAD; KITTELSEN, 1971; GILPIN; SOULÉ, 1986; KELLER; WALLER, 2002). Ainda, fatores de origem genética podem ser atribuídos a deformidades morfológicas encontradas em peixes, entretanto, o conhecimento acerca desse processo é limitado (KINCAID, 1976; GJERDE; PANTE; BAEVERFJORD, 2005; JAGIELŁO et al., 2017).

Embora a endogamia possa influenciar no *fitness*, sobretudo quando ocorre em populações pequenas e isoladas, o custo da consanguinidade em populações naturais permanece

em grande parte desconhecido e controverso (CRNOKRAK; ROFF, 1999), especialmente ao considerar os peixes, já que grande parte dos estudos se concentra em espécies de interesse comercial (FROMMEN et al., 2008). Isso porque além da dificuldade de estimativas na natureza, as populações selvagens tendem a evitar o endocruzamento, e caso este ocorra, espera-se que fisiologicamente ou comportamentalmente sejam capazes de lidar com os efeitos genéticos deletérios antes que se manifestem em um nível fenotípico (PUSEY; WOLF, 1996; CRNOKRAK; ROFF, 1999).

Um isolamento populacional consistente foi apontado na *Furna 2* do PEVV (ARTONI et al., 2006). Além disso, nesse ambiente foram encontrados indivíduos com alterações morfológicas para o padrão da espécie, especialmente na coluna vertebral, fenótipo o qual possivelmente é resultado da endogamia e ausência do fluxo gênico (GROSS et al., 2004; ARTONI; ALMEIDA, 2003). Ressaltando que, além das anomalias encontradas, o endocruzamento pode ser um dos fenômenos responsáveis pela menor variabilidade genética sugerida para os peixes da *Furna 2* com o emprego de marcadores RAPD (MATOSO et al., 2004). Embora tenham sido realizados alguns estudos com esses lambaris, especialmente voltados para a genética, o conhecimento acerca dessa população ainda é limitado, sendo necessário mais esforços para desvendar aspectos da sua biologia evolutiva.

Tendo em vista que os *Psalidodon aff. fasciatus* que vivem na *Furna 2* do PEVV representam uma população endêmica, isolada intra e interespecificamente (ARTONI et al., 2006; SHIBATTA; ARTONI, 2005), bem como, considerando a limitação existente acerca dos efeitos do endocruzamento nessa população, investigar as possíveis consequências resultantes da endogamia ajudará a compreender como a população se mantém viável.

Deste modo, a morfometria geométrica (MG) surge como ferramenta alternativa para analisar as deformações vertebrais encontradas nessa população. Uma vez que, a morfometria geométrica consiste no estudo da variação na forma, onde são utilizados marcos anatômicos ou contornos, permitindo uma descrição morfológica precisa, fornecendo meios eficazes para a visualização e interpretação dos resultados (ZELDITCH et al., 2004). Dentre suas inúmeras aplicações, esse método é amplamente utilizado no estudo com peixes (PONTON, 2006; CLABAUT et al., 2007; IBÁÑEZ; COWX; O'HIGGINS, 2007; PERAZZO et al., 2019; ASTUTI et al., 2020).

1.5 BIOLOGIA REPRODUTIVA DE TELEÓSTEOS COM ÊNFASE NOS CARACÍDEOS

As variadas estratégias e táticas reprodutivas encontradas no grupo dos teleósteos estão estreitamente relacionadas com o início das chuvas, temperaturas elevadas e nível da água (LOWE McCONNELL, 1999). Também, em última instância, são responsáveis por garantir o sucesso reprodutivo de uma espécie em diferentes ambientes (VAZZOLER, 1996). A estratégia reprodutiva consiste no padrão geral de reprodução da espécie, englobando todas as características envolvidas no processo reprodutivo (VAZZOLER, 1996). Entretanto, como resultado das flutuações ambientais, algumas dessas características apresentam plasticidade que asseguram o sucesso reprodutivo, são características conhecidas como táticas reprodutivas, dentre elas, podem ser citadas a variação no tamanho da primeira maturação gonadal e a forma como os peixes utilizam os recursos ambientais (VAZZOLER, 1996; CORNELIO, 2013).

Com relação à maneira de alocação energética em estratégias reprodutivas, existem espécies tendem mais para r-estrategistas, organismos de pequeno porte, com curto período de vida e maturação precoce, os quais investem mais energia para gerar novos indivíduos e não possuem cuidado parental (VAZZOLER, 1996; CORNELIO, 2013). Enquanto que os k-estrategistas, por sua vez alocam mais energia para seu próprio crescimento e desenvolvimento, possuem longo período de vida, maturação tardia e baixa fecundidade (VAZZOLER, 1996; CORNELIO, 2013). Cabe ressaltar que a reprodução e crescimento são processos que competem pelos mesmos recursos, finitos, e que, na fase adulta, o crescimento somático é influenciado negativamente, já que a energia é utilizada no desenvolvimento das gônadas, os caracteres sexuais primários (VAZZOLER, 1996; SABORIDO-REY; KJESBU, 2005). Em uma população onde há um pequeno número de indivíduos, ocorre um aumento na disponibilidade de recursos alimentares, acelerando assim o processo de maturação como consequência do aumento na taxa de crescimento (VAZZOLER, 1996).

Uma periodicidade no ciclo reprodutivo é identificada na maioria das espécies, e a maturação ocorre quando as condições ambientais estão apropriadas para a fecundação e desenvolvimento da prole (VAZZOLER, 1996). Assim, a elevação no nível das águas estaria sincronizada com a desova e o pico da época de cheias atuaria como agente finalizador do período reprodutivo (VAZZOLER et al., 1997). Os ovários e testículos passam por profundas modificações durante o desenvolvimento gonadal, o que permite que

esse processo seja dividido em estádios. A caracterização dos estádios pode ser feita macroscopicamente, onde é analisado o tamanho da gônada em relação à cavidade abdominal, a percepção dos ovócitos, o aspecto, o grau de turgidez das gônadas e vascularização (VAZZOLER, 1996; CORNELIO, 2013). Entretanto, análises histológicas consistem em resultados mais precisos, onde os estádios são determinados com base na proporção das células da linhagem germinativa existentes no tecido (VAZZOLER, 1996).

Para a espécie *Psalidodon fasciatus* foram estabelecidos cinco estádios ao longo do processo de desenvolvimento gonadal: repouso, maduro inicial, maduro, parcialmente vazio e totalmente vazio (ANEXO A) (CARVALHO et al., 2009). As gônadas na maioria dos Characiformes são exibidas como órgãos pares, alongados e fusiformes, que ao longo dos estádios passam por modificações quanto ao volume, coloração e espessura (BAZZOLI, 2003). Foram relatados para caracídeos ovários do tipo cistovariano, onde os ovócitos atingem o meio externo devido a continuidade do lume ovariano até o oviduto (BAZZOLI, 2003; PEREIRA-SANTOS, 2014). Os testículos se encontram nas laterais da cavidade abdominal, e se estendem da porção cefálica até a caudal se conectando com a papila urogenital (PEREIRA-SANTOS, 2014).

Ademais, lambaris possuem fecundidade externa, podem ser migradores de pequenas distâncias ou não migradores, e não dispõem cuidado parental (VAZZOLER; MENEZES, 1992; DUKE ENERGY, 2008). A estratégia reprodutiva é do tipo sedentária, com ovos adesivos e zona radiata com canais porosos (RIZZO et al., 2002; PEREIRA-SANTOS, 2014). O tipo de desova foi retratado como ponto problemático no estudo da reprodução dos lambaris, pois, não existe uniformidade quanto ao tipo de desova das espécies (DALA-CORTE; AZEVEDO, 2010; CORNELIO, 2013). Posto isso, Carvalho et al. (2009) explicam que como consequência de fatores fisiológicos ou alterações ambientais os peixes podem alterar entre desova total para a desova fracionada e vice-versa.

1.5.1 Razão sexual

Outro parâmetro relevante e que permite a compreensão acerca da dinâmica populacional em peixes, é a determinação da proporção sexual ou razão sexual. No geral, as populações tendem ao equilíbrio com o número de machos estatisticamente igual ao número de fêmeas (1:1) (VAZZOLER, 1996; CORNELIO, 2013). Entretanto, vários fatores relacionados às estratégias reprodutivas e crescimento podem atuar diferentemente sobre os machos e fêmeas, resultando em alterações na proporção entre os sexos (SABORIDO-

REY; KJESBU, 2005; CARVALHO et al., 2009; NASCIMENTO; YAMAMOTO; CHELLAPPA, 2012).

Um maior número de fêmeas em relação ao número de machos é relatado em distintos estudos (HOJO; SANTOS; BAZZOLI, 2004; CARVALHO et al., 2009; SILVEIRA et al., 2019). Esse desvio é mais frequente em lugares com recurso alimentar abundante, e, reflete uma estratégia para o rápido crescimento populacional (NIKOLSKY, 1969), já que são as fêmeas que determinam a quantidade de novos descendentes e a época de desova, uma vez que possuem um número limitado de ovócitos em relação aos espermatozoides (SANTOS, 1995; CORNELIO, 2013).

Diante do exposto, e como apontado por Silveira et al. (2019), em relação aos lambaris há um maior direcionamento para estudos realizados com animais que vivem em reservatórios. Assim, os *Psalidodon aff. fasciatus* estudados nesse trabalho representam um modelo ideal para contribuir com esses dados, uma vez que, esses peixes constituem uma população natural e endogâmica, que experimenta o isolamento em um ambiente com rara configuração geográfica.

1.5.2 Relação peso-comprimento e fator de condição (K)

O fator de condição é um indicador corporal quantitativo do bem-estar dos peixes, parte do pressuposto de que indivíduos com maior massa em um dado comprimento estão em melhor condição (LIMA-JUNIOR; CARDONE; GOITEIN, 2002). Seu valor é determinado mediante estimativa da relação peso-comprimento, parâmetro fundamental em estudos de biologia, fisiologia, e ecologia de peixes (SATAKE et al., 2009). Expressa pela fórmula ($W_T = aL_T^b$), onde, W_T = peso total, a = constante (coeficiente relacionado com forma de corpo), L_T = comprimento total, b = coeficiente angular (LE CREN, 1951). Se $b = 3$, o crescimento é isométrico, esperado para os peixes se as proporções corporais forem constantes durante o crescimento; se $b < 3$, o crescimento é alométrico negativo, ou seja, o ganho em comprimento é mais acentuado que no peso; se $b > 3$, o crescimento é alométrico positivo, onde a alocação de energia é maior para o peso que para o comprimento (RÊGO et al., 2008; SILVA, 2011).

Existem três formas para se estimar o fator de condição em uma população. O fator de condição de Fulton (K_f), através da expressão $K_f = W_t/L_t^3$, onde se assume que a relação peso-comprimento é isométrica ($b=3$), o que pode resultar em distorções nos resultados, já que as diferentes espécies estudadas não são consideradas (VAZZOLER, 1996; SILVA, 2011). Por meio do fator de condição alométrico (K_a) que considera que espécies diferentes podem apresentar distintas relações peso-comprimento, e é utilizada a equação $K_a = W_t/L_t^b$, onde b é

o coeficiente da regressão entre W_t/L_t (VAZZOLER, 1996; ROCHA et al., 2005; SILVA, 2011). Ainda, é possível utilizar o fator de condição relativo (K_n), que corresponde ao quociente entre peso observado e peso teoricamente esperado para determinado comprimento ($K_n=W_t/W_e$), nessa equação o desenvolvimento gonadal e eventos reprodutivos são minimizados, já que, em condições normais a relação entre ambos é 1 (LE CREN, 1951; YAMADA; TAKEMOTO; PAVANELLI, 2008; SILVA, 2011).

Variações encontradas no fator de condição refletem condições nutricionais recentes dos peixes, gastos das reservas em atividades cíclicas, infecções parasitárias, e, podem estar relacionadas às condições ambientais, aos aspectos comportamentais, e aspectos reprodutivos (VAZZOLER, 1996; Lemos et al., 2007; YAMADA; TAKEMOTO; PAVANELLI, 2008; GOMIERO; VILLARES-JUNIOR; BRAGA, 2010).

Estudos com characiformes demonstraram que os valores da relação peso-comprimento e fator de condição sofrem flutuações como consequência de alterações sazonais (ITO, 2013). Bem como, efeitos deletérios como consequência do parasitismo, uma vez que o fator de condição de espécimes não parasitados foi maior do que o de peixes parasitados (GOMIERO; SOUZA; BRAGA, 2012). Assim, considerando que diversos fatores podem influenciar esses parâmetros, investigar a possível relação da endogamia com o bem-estar dos *Psalidodon aff. fasciatus* estudados nesse trabalho faz-se pertinente.

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

2.1 JUSTIFICATIVA

A Biologia Evolutiva contempla a história da vida, portanto é elementar a compreensão dos eventos que resultam na evolução dos seres e na diversidade biológica. Posto isso, a população de *Psolidodon aff. fasciatus* estudada nesse trabalho habitam um local com rara configuração geológica, que garante um isolamento populacional a nível intra e interespecífico, refletindo na condição de uma população endogâmica.

A consanguinidade pode ter consequências negativas para os indivíduos e para as populações, há uma insuficiência de estudos em populações naturais sobre este aspecto, sobretudo em peixes.

Assim, é imprescindível investigar a manifestação da endogamia nessa população, a nível fenotípico, como também, as possíveis influências em aspectos reprodutivos, uma vez que esses fatores estão estritamente relacionados com o valor adaptativo. Tendo em vista esse contexto, o maior conhecimento acerca desses animais fornecerá esclarecimento de medidas necessárias para a conservação dessa população única, além de servir como fonte ímpar para outros estudos em populações endogâmicas.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo geral

Investigar efeitos da endogamia na população de *Psolidodon aff. fasciatus* da Furna 2 do PEVV, especialmente em relação aos aspectos morfológicos e reprodutivos.

2.2.2 Objetivos específicos

- Identificar a incidência de malformações congênitas e descrever os morfotipos anatômicos encontrados;
- Caracterizar os estádios do desenvolvimento gonadal por meio de análise das características microscópicas das gônadas;
- Analisar a razão sexual relacionando com parâmetros morfométricos de machos e fêmeas;
- Estimar a relação peso-comprimento e o fator de condição relativo (Kn).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE COLETA E AMOSTRAS

As coletas foram realizadas na *Furna 2* do PEVV (Figura 7), Unidade de Conservação localizada no alto curso da Bacia do Rio Tibagi, município de Ponta Grossa, Sul do Brasil.

Figura 7 – *Furna 2* do PEVV. Em (a) Imagem aérea, (b) Vista pelo mirante, (c) Interior da *furna*.



Fonte: Arquivo pessoal de Raul Rennó Braga (a). A autora (b), (c).

Os exemplares de *Psalidodon* aff. *fasciatus* foram coletados mensalmente, ao longo dos anos de 2019 e 2020 (fevereiro a janeiro), totalizando 12 meses de amostragem. As coletas

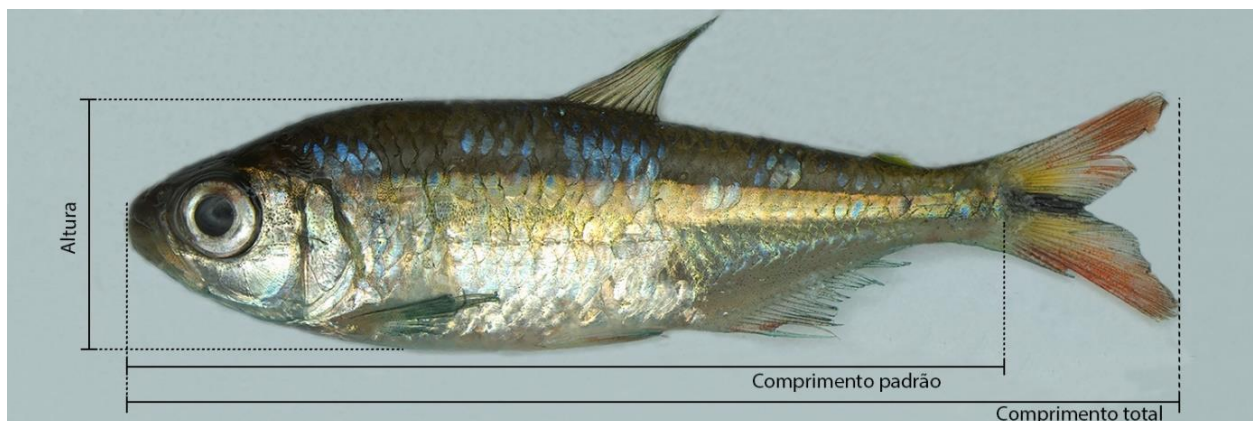
foram aleatórias, realizadas com o auxílio de covos e redes de arrasto. Após as coletas, os animais foram transferidos para o Laboratório de Ecologia Aquática da UTFPR. Foram coletados 254 indivíduos no total, compreendendo a 154 machos e 100 fêmeas.

A pesquisa foi realizada com base em padrões internacionais de experimentação animal, conforme autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (CEUA parecer N °. 2018-025/2018) (ANEXO B). A captura dos animais foi autorizada pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA / ICMbio nº 15115-1) e Instituto Ambiental do Paraná (IAP nº 15.190.528-5; Autorização 15.18) (ANEXO C).

3.2 PARÂMETROS BIOMÉTRICOS

Já no laboratório, os exemplares foram anestesiados profundamente e eutanasiados em solução de benzocaína 1%. Cada exemplar foi numerado, e com o auxílio de um paquímetro digital e balança de precisão, foram aferidas medidas corporais (mm) (Figura 8) e o peso total de cada indivíduo (g), respectivamente. O sexo foi definido preliminarmente pela presença de espículas na nadadeira anal dos machos.

Figura 8 – Representação das medidas morfométricas aferidas.



Fonte: A autora

3.3 EXAMES RADIOGRÁFICOS

Durante os meses de outubro e novembro (2019) foram coletados 22 machos e 13 fêmeas para análise radiográfica e morfométrica. Esses animais passaram pelo procedimento de anestesia profunda e análise de parâmetros biométricos, após, foram preservados em álcool

70%. Posteriormente foram transportados até o Laboratório de Ictiologia da Universidade de São Paulo (USP), Campus de Ribeirão Preto (LIRP) para serem radiografados.

Foram obtidas radiografias do lado esquerdo do corpo de cada exemplar, por meio do equipamento de raio-X digital Faxitron, modelo LX-60 do LIRP, com tempo de exposição e intensidade de radiação calibrados automaticamente para cada amostra (10 a 18 s; Kv de 26 a 31). A partir das radiografias digitais, foi realizada a contagem total de vértebras (ACKERLY; WARD, 2016), não incluindo as vértebras que compõe o aparelho de Weber.

Também foram utilizadas imagens de três exemplares radiografados de *Psalidodon fasciatus*, do trecho médio do rio Mogi-Guaçu, Pirassununga, Estado de São Paulo, provenientes da Coleção do LIRP, número de tombo 14899, para fins de comparação morfométrica.

3.4 MORFOMETRIA GEOMÉTRICA

Os animais radiografados foram então submetidos às análises morfométricas. As marcações nas radiografias digitais foram feitas com uso do software TPSDig2 (ROHLF, 2019). Foram estabelecidos 14 pontos anatômicos (Figura 10) distribuídos pelo corpo de acordo com CASTRO et al. (2014). Para reduzir o erro de marcação, o processo foi realizado em triplicata. Finalmente, a superposição de Procrustes por quadrados mínimos, e as demais análises necessárias, a análise de variáveis canônicas (CVA) associada a uma análise de variância multivariada (MANOVA) e análise de função discriminante (DFA) foram realizadas com o uso do software Morpho J 1.07a (KLINGERBERG, 2011). Variações na forma foram visualizadas em gráficos do tipo *outline drawing*. Todos os resultados foram avaliados estatisticamente por distância da distribuição ao quadrado T de Hotelling e Mahalanobis entre os grupos (10,000 permutações, $p < 0,0001$).

3.5 RAZÃO SEXUAL

A razão sexual foi realizada a cada mês dividindo o número de fêmeas pelo número de machos capturados em cada coleta, a fim de verificar possível flutuação deste parâmetro na população ao longo de um ciclo reprodutivo. Da mesma forma, um valor médio foi definido para a razão sexual, considerando as doze amostras realizadas. O teste Qui-quadrado foi aplicado para avaliar possíveis diferenças significativas entre a razão sexual de machos e fêmeas.

3.6 HISTOLOGIA DAS GÔNADAS

Para a extração das gônadas foi feita uma incisão na região abdominal, do poro urogenital em direção à cabeça. As gônadas (direita e esquerda) foram fixadas separadamente em solução de Bouin por um período de 48 horas. Após, foram lavadas com álcool 70% e conservadas também em álcool 70% até a inclusão em parafina.

Posteriormente, as peças foram retiradas do álcool e submetidas ao processamento histológico automatizado (TP 1020, Leica Byosystems, Nussloch, Alemanha), conforme as etapas descritas (ANEXO D). Em seguida, foi realizada a inclusão em parafina líquida, com orientação das peças para realização de cortes transversais. Logo após solidificação, os blocos foram armazenados em congelador até a obtenção de cortes histológicos por meio da microtomia.

Para a microtomia foram obtidos cortes transversais com 5 µm de espessura, estes foram fixados e colocados em banho-maria. As lâminas de vidro foram previamente aquecidas, e três a quatro cortes foram “pescados” por lâmina. Para garantir a fixação dos cortes, as lâminas foram secas ao ar livre por um período de 48h.

Em seguida, foi utilizada a técnica convencional com hematoxilina-eosina (HE) para corar as amostras (ANEXO D). Para a montagem das lâminas foi utilizada uma gota de Permount® (Fisher, New Jersey, EUA) sobre a lamínula, pressionando-a sobre o corte. As lâminas foram secas ao ar livre.

Por fim, as lâminas foram analisadas em microscopia de campo claro. Imagens foram obtidas com o microscópio de epifluorescência Olympus BX41 acoplado ao sistema de captura de Imagens CCD Olympus DP 71® e software DP-Controller versão 3.2.1.276. Os estádios de desenvolvimento gonadal foram estabelecidos com base na proporção das células germinativas femininas e masculinas seguindo os critérios definidos por Carvalho et al. (2009) (ANEXO B).

3.7 RELAÇÃO PESO-COMPRIENTO E FATOR DE CONDIÇÃO RELATIVO (KN)

Inicialmente, a relação peso total (W_T) x comprimento total (L_T) foi calculada utilizando a equação: $W_T = aL_T^b$, a e b foram estimados a partir do método dos mínimos quadrados aplicados aos dados convertidos em seus respectivos logaritmos naturais, e, utilizados nas estimativas dos valores de peso esperado (W_e). O valor do coeficiente angular

(b) foi calculado a partir do agrupamento de todos os indivíduos (LIMA-JUNIOR; CARDONE; GOITEIN, 2002).

Em seguida, para avaliar o “bem estar”, foi calculado, individualmente, o fator de condição relativo (Kn) que corresponde ao quociente entre o peso observado (Wt) e peso esperado (We) para determinado comprimento (Le Cren, 1951). Após, foi estimado o valor médio de Kn para machos e fêmeas separadamente, e comparados estatisticamente com o padrão $Kn = 1.00$, com o teste “t” de Student ($p < 0.05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

ARTIGO 01: SPINAL MALFORMATIONS IN A NATURALLY ISOLATED NEOTROPICAL FISH POPULATION

Abstract

Fish populations that reside in completely isolated freshwater ecosystems are rare worldwide. The Vila Velha State Park (VVSP), located in southern Brazil, is recognized for its arenitic formations called sinkholes (*furnas*), which are completely isolated. In one of these *furnas* inhabit a fish population of the Neotropical characid *Psalidodon* aff. *fasciatus*. These animals experience both intra and interspecific isolation which can increase the probability to suffer inbreeding effects and fitness variations, also, it can often develop alterations in phenotype. In this study, we analyzed geometric morphology in digital radiographs to identify congenital deformations of *Psalidodon* aff. *fasciatus* in Furna 2 of VVSP. We found many fish with spinal deformities, including wide variation in the number of caudal vertebrae and corporal deformations related to a compressed body and lordotic spinal curvature. Females were more affected than males. The multivariate analysis showed clustering by malformation degree as well as a complete separation of phenotype when compared with a non-isolated population. Although our results may be directly related to inbreeding and the absence of gene flow in the population, only reproduction experiments in laboratory will be able to generate accurate results. In conclusion, isolated populations such as fish species in *furnas* are potential models for evo-devo researches.

INTRODUCTION

Fish species may develop different types of morphological deformities, such as dysplasia in the opercular bones, maxillary-mandibular apparatus, and mandibular bones; anomalies in fins and eyes (MISE; TENCATT; SANTOS, 2017); bone and skin neoplasms; and spine deformations (FLORES-LOPES; CETRA; MALABARBA, 2010). Dorsoventral (lordosis), lateral (scoliosis) or upward spinal curvature (kyphosis) malformations can cause anomalous body appearance (BENGTSSON et al., 1985) and be treated as monstrosities (GOLUBTSOV et al., 2021), but such anomalies are often not visible if only a few vertebrae are affected (GJERDE; PANTE; BAEVERFJORD, 2005; KVELLESTAD et al., 2000; WITTEN et al., 2006). Body and skeletal malformations have been reviewed in many publications and they are related to multiple physiological, environmental, xenobiotic, nutritional and genetic factors (SLOOF, 1982; WELLS; COWAN, 1982; TOFTEN, 1996; GJERDE; PANTE; BAEVERFJORD, 2005; JAGIELŁO et al., 2017; MADSEN; ARNBJERG; DALSGAARD, 2001). Environmental factors have been linked to vertebral anomalies in *Salmo solar* (FRASER et al., 2015; YTTEBORG et al., 2010) and *Solea senegalensis* (PIMENTEL et al., 2014), whereas chemical substances were responsible for craniofacial deformities in *Sebastiscus marmoratus* (ZHANG et al., 2012) and *Danio rerio* (BAKER; PETERSON;

HEIDEMAN, 2013), and nutritional conditions covered a variety of deformities reported in finfish farming (BERILLIS, 2015; EISSA et al., 2021). Although genetic factors are usually considered marginal (reviewed in BOGLIONE et al., 2013), alteration in extracellular matrix gene transcription in Atlantic salmon (YTTEBORG et al., 2010), congenital ocular malformation and skeletal abnormalities in zebrafish (BABCOCK et al., 2014), deformities in bream (AFONSO et al., 2000; AFONSO et al., 2009) and intrinsic correlation between lordosis and consanguinity (IZQUIERDO; SOCORRO; ROO, 2010) are described in the literature. Skeletal deformities seem to be related to the early stages of development (LONGWELL et al., 1992), however we still know little about the genetic factors responsible for such deformations (GJERDE; PANTE; BAEVERFJORD, 2005; JAGIEŁŁO et al., 2017; KINCAID, 1976).

Although morphological anomalies can occur both in farmed and natural fish populations, they are better investigated in aquaculture because deformities can downgrade fish production and result in economic losses (KAUSE et al., 2005). Culture systems usually lead to a loss of genetic variability in stocks, causing inbreeding depression and associated deformities (AULSTAD; KITTELSEN, 1971). Inbred populations are more susceptible to environmentally induced mortality, while also experiencing hampered growth rates and reproduction. Inbreeding can also impose difficulties for natural populations because it reduces intrapopulation genetic variability (KAUSE et al., 2005) and increases frequency of deleterious alleles that are normally expressed in recessive homozygotes (KELLER, 2002). Even considering that the cost of inbreeding remains largely unknown and controversial (PUSEY; WOLF, 1996; CRNOKRAK; ROFF, 1999; FROMMEN et al., 2008), consequences can increase extinction vulnerability (AULSTAD; KITTELSEN, 1971; GILPIN; SOULÉ, 1986; KELLER, 2002).

The principal aim of this investigation was to describe morphological deformities in a naturally isolated characin population of *Psalidodon aff. fasciatus* within a conservation unit in southern Brazil. Fish are confined to a sinkhole called *Furna 2* in the Vila Velha State Park (VVSP), a doline-shaped sandstone depression that reaches the water table. This depression possesses a mean diameter of 80 m, water depth of 50m and walls reaching up to 110m (CAMPOS; DALCOMUNE, 2011). The formation of these sinkholes occurs by the action of acid pluvial waters that due to vast network of existing fractures in sandstones had facilitated the infiltration (LETENSKI et al., 2011). Briefly, the geological history of *furnas* de Vila Velha begins with the formation processes of the Paraná basin, from the Upper Ordovician to the Upper Cretaceous (ASSINE, 1996). Some stratigraphic graphs from the Late Carboniferous to the Upper Permian were analyzed by Holz et al., (2010), to contribute to the knowledge of the

Vila Velha Sandstone formation as a result of the stacking of three lobes spread around 30 m thick each and 2 km wide, probably deposited during the excavation of the incised Lapa valley. On the other hand, weathering processes in Vila Velha responsible for the pseudo-karstic characteristics started 35 My ago, being more intense between 17 and 9 My (RIFFEL et al., 2015). With this, the population of *P. aff. fasciatus* inhabiting in the *Furna 2* can contribute to studies of spine evolutionary developmental mechanisms, supporting idiographic details as well as observed in the cavefish *Astyanax mexicanus* (JENNER; WILLS, 2007) for tissue and organ studies with an evo-devo approach. Also, the geological configuration of the *furna* prevents immigration of other species, leading to population isolation and inbreeding (ARTONI et al., 2006; MATOSO et al., 2013; SHIBATTA; ARTONI, 2005). The population's endemism, isolation, and absence of gene flow (ARTONI et al., 2006; SHIBATTA; ARTONI, 2005) makes it a useful model for our research into the effects of endogamy on morphology, since ontogenetic mechanisms can be explored and evolutionary variation can be studied under these conditions. Furthermore, this rare natural occurrence will provide an opportunity to deepen the knowledge about the functional and evolutionary biology of fish.

MATERIALS & METHODS

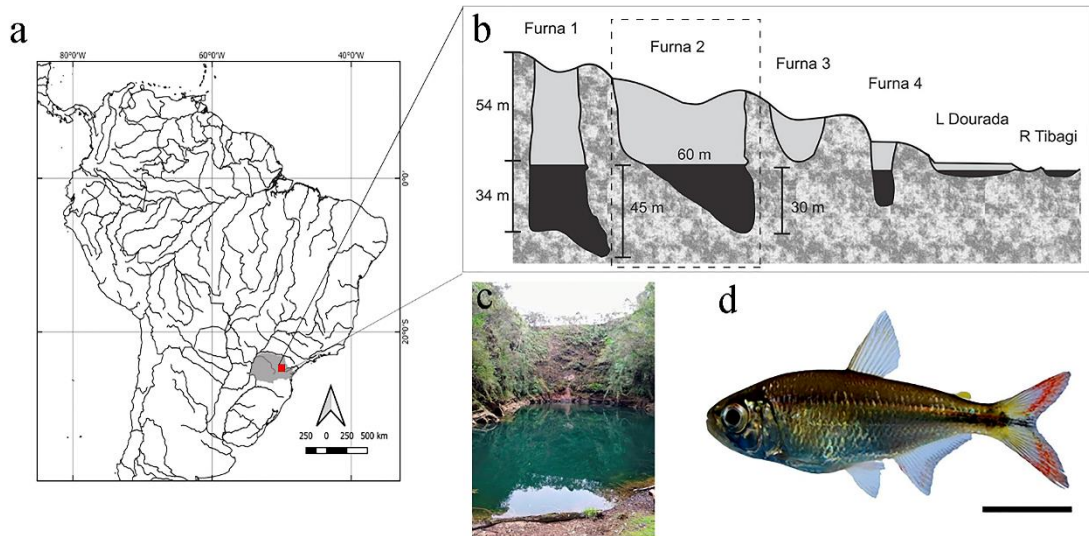
Specimen sampling

Specimens of *Psalidodon aff. fasciatus* (22 males and 13 females) were randomly collected in the sinkhole (Figure 9) during October and November 2019, using traps and trawling of 3 m length and 5 mm mesh. Specimens were submerged in 1% benzocaine and immediately preserved in 70% alcohol. Subsequently, they were transported to the Laboratório de Ictiologia de Ribeirão Preto (LIRP) for radiography, then screened morphological deformations using precision scales and a digital pachymeter for total weight and standard-length measurement, respectively. Initially, fish sex was determined via presence of hooks on the anal fin (males), then confirmed after radiography with analysis of gonads under an optical microscope.

Research was conducted based on international guidelines of animal experimentation and authorized by the Ethical Committee in Animal Research of the Universidade Tecnológica Federal do Paraná (CEUA protocol # 2018-025/2018). Sampling was authorized by the Ministério do Meio Ambiente (MMA/ICMbio # 15115-1) and Instituto Ambiental do Paraná (IAP # 15.190.528-5; Authorization 15.18). Specimens were identified and deposited under

voucher number MHNCI 13001 in the Ichthyological collection of Museu de História Natural do Capão da Imbuia, Curitiba, Paraná, Brazil.

Figure 9. Location and layout of *furnas* in Vila Velha State Park, Paraná, Brazil. (a) Detail of South American hydrography, with emphasis on the collection site. (b) Profile of *furnas* with emphasis on Furna 2, also represented in (c). The shaded area showed in each *furna* represents the water in each one, except the number 3 which did not suffer inundation processes through water table (d) Representative specimen of *Psalidodon* aff. *fasciatus*. Bar = 1 cm.



Source: The author

Radiography

Digital X-ray images of each specimen's left side were obtained using a Faxitron (model LX-60) in the Ichthyology Laboratory of the University of São Paulo, Campus Ribeirão Preto (LIRP). Exposure time and radiation intensity were automatically calibrated for each sample (10–18 s; Kv from 26 to 31).

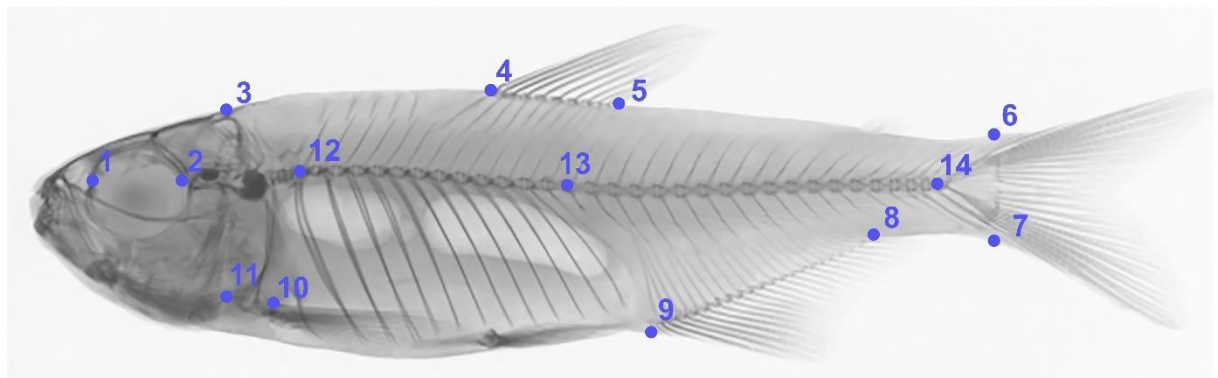
Total vertebral count was determined using digital radiographs (ACKERLY; WARD, 2016), excluding the Weberian apparatus. In addition, standard length and total weight per individual were obtained to discriminate between sexes. According to the spine formation degree we classified the individuals as: normal pattern (Np), no deformation, the vertebral counting with approximately 32 vertebrae and no lordosis signal; moderate malformation (Mm), minimal spine deviation, individuals can present a lower vertebrae number, also, compressed or/and melted; severe malformation (Sm), high spine deviation, characterized by necessarily possess a lower number of vertebral and neural and hemal spinal anomalies, also lordotic (KAYIM; CAN; GUNER, 2010).

Morphometric comparisons also used images of three radiographed *Psalidodon* aff. *fasciatus* specimens (LIRP Collection, voucher number 14899) from the middle Mogi-Guaçu River, Pirassununga, São Paulo.

Geometric morphometrics

Digital radiographs were converted into a .TPS file using the tpsUtil software (ROHLF, 2019). The .TPS file was used to demarcate morphometric points in the TPSDig2 software (ROHLF, 2019). To produce morphometric data, we considered 14 anatomical landmarks (Figure 10) distributed throughout the body, according to (CASTRO et al., 2014). For determination of errors in the landmark points, the procedure was realized in triplicate by the same observer in different moments and tested by a Procrustes ANOVA ($p < 0.0001$) performed in Morpho J v1.07a (KLINGERBERG, 2011).

Figure 10 – Anatomical landmarks used in X-ray images for morphometric analysis. 1: Anterior orbital region; 2: Posterior orbital region; 3: Dorsal region of head; 4: Anterior region of dorsal fin insertion; 5: Posterior region of dorsal fin insertion; 6: Dorsal region of beginning of caudal fin; 7: Ventral region of beginning of caudal fin; 8: Posterior region of anal fin insertion; 9: Anterior region of anal fin insertion; 10: Insertion of pectoral fin; 11: Ventral region of head (1–11 based on CASTRO et al., 2014). 12: First pre-caudal vertebra; 13: First caudal vertebra; 14: Last caudal vertebra (12–14 based on BIRD; MABEE, 2003), where pre-caudal vertebrae are those posteriors to the Weberian apparatus and anterior to caudal vertebrae. Pre-caudal vertebrae comprise centers, arches and neural spines, and parapophyses and ribs. Pre-ventral and/or the first caudal vertebra can be categorized as a “transitory” vertebra, exhibiting non-fused hematooid arches or parapophyses, drastically shortened ribs, and absence of a spine. Caudal vertebrae comprise centers, neural arches and neural spines, and hematous arches and spines.



Source: The author

Statistical analysis

Procrustes superposition with minimum squares and necessary analyses such as canonical variables (CVA) and principal components (PCA) were performed in Morpho J v1.07a (KLINGERBERG, 2011) using the landmark means. We used three classifiers for

performed the PCA and CVA: sex, locality and malformation degree. All results were statistically evaluated using the distance between groups from the distribution T-square of Hotelling and Mahalanobis (10,000 permutations; $p < 0.0001$).

RESULTS

Radiographs and samples

The total number of vertebrae across all males and females ranged from 23 to 32 (Table 1; Supplementary Material 1). Number of caudal vertebrae ranged from 12 to 20, while precaudal vertebral counts were more stable and ranged from 11 to 12. Females were most variable in vertebrae count and total weight, leading to some outliers. However, females had the lowest total length.

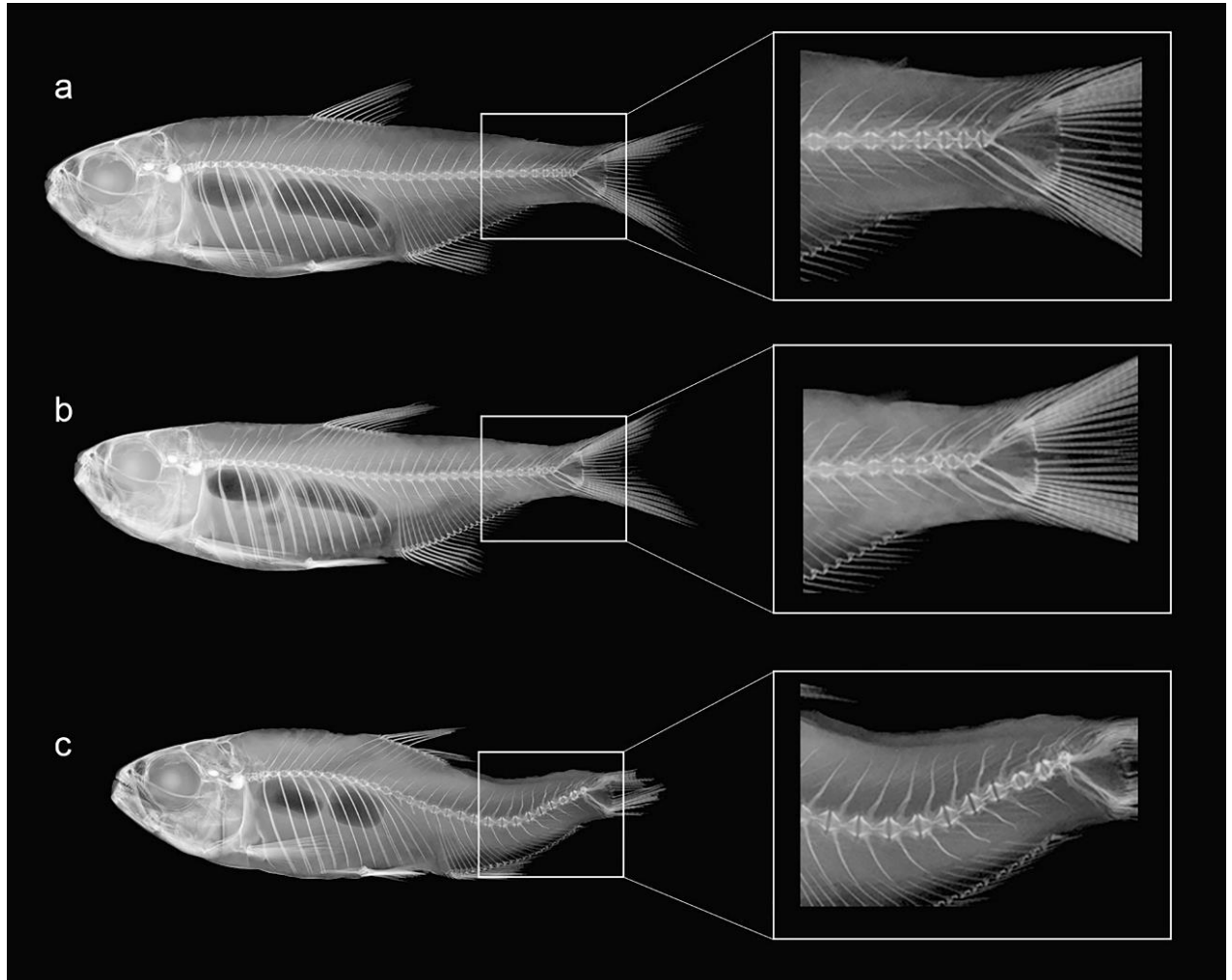
Table 1. Standard length and total weight of specimens.

Individuals	Total number	Standard length (mm)	Total weight (g)
Males	22	58.92 ± 2.54	3.63 ± 0.65
Females	13	53.24 ± 4.77	3.38 ± 0.86

Note: Data are displayed as means $\pm$ SD.

Individuals were grouped based on existing categories for deformation type (KAYIM; CAN; GUNER, 2010): normal pattern (Np), no deformation; moderate malformation (Mm), minimal spine deviation; severe malformation (Sm), high spine deviation (Figure 11; Table 2). In this population, females were the most affected ($p < 0.05$) comprising all individuals in the category (Sm), exhibiting downward curvature of the spine (lordosis), fused and compressed vertebrae, additionally to a reduced number of caudal vertebrae (Figure 12). Males and females in the category (Mm), with subtle deformities corresponding to 62.5% and 37.5%, respectively. Individuals considered normal (Np) represented males in 87.5%.

Figure 11. Anatomical patterns established for *Psalidodon* aff. *fasciatus* from Furna 2 in VVSP, based on X-ray images of spine morphology. (a) Normal pattern (Np) – no deformation; (b) Moderate malformation (Mm) – minimal spine deviation; (c) Severe malformation (Sm) – high spine deviation.



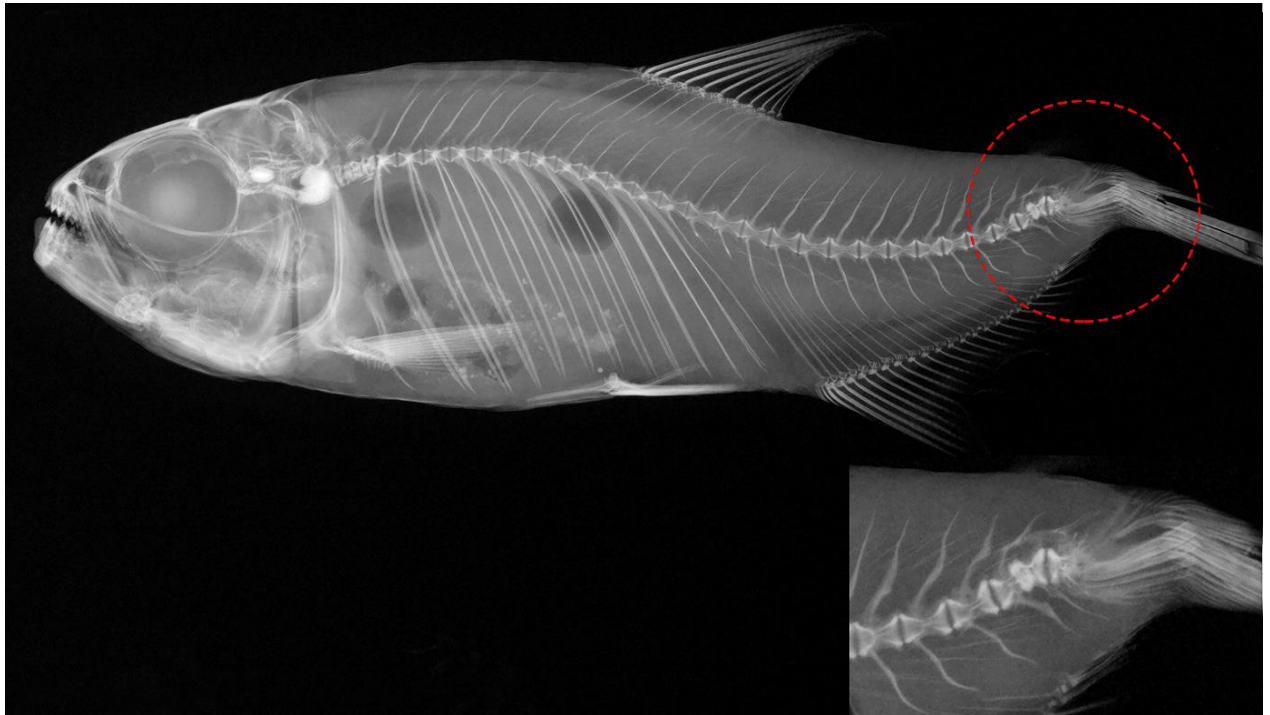
Source: The author

Table 2 – Chi-square test of independence between vertebral anomaly patterns and number of *Psalidodon* aff. *fasciatus* (separate comparisons for males and females). Relative percentages in parentheses.

Individuals	Normal	Moderate	Severe	Total
Males	7 (87.5%)	15 (62.5%)	0	22 (62.9%)
Females	1 (12.5%)	9 (37.5%)	3 (100%)	13 (37.1%)
Total	8	24	3	35

Note: The number of males and females differed significantly among the patterns of anomalies ($X^2 = 7.159$, $df = 2$, $P = 0.027$).

Figure 12. Deformed vertebral column of *Psalidodon* aff. *fasciatus* showing abnormalities in the caudal fin region, such as extra-ossifications and fusions of caudal vertebral bodies, vertebral compressions, neural and hemal spinal anomalies, ossification defects in hypurals, and caudal-fin malformation.



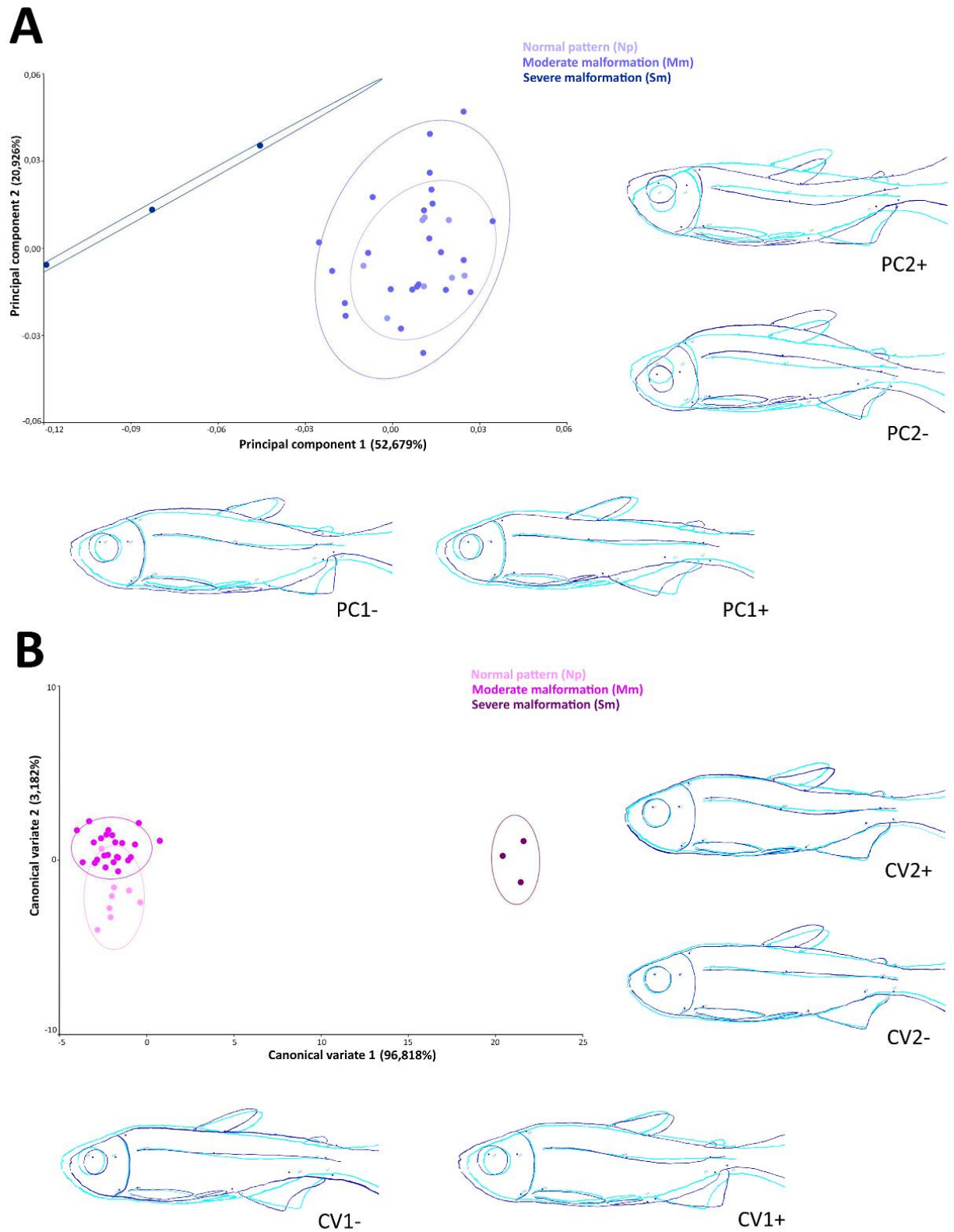
Source: The author

Geometric morphometrics

The scatter plot of the principal components scores on the first (52.7% of the total variation) and second (20.9% of the total variation) factorial planes (Figure 13a), based on the 14 anatomical landmarks recorded on the 38 specimens of *Psalidodon* aff. *fasciatus*, showed an overlap of individuals classified as Normal pattern (Np) and moderate malformation (Mm), and a discrimination of individuals with severe malformation (Sm). The overlap between individuals is due to the deeper and compressed body shape, whereas individuals with severe anomalies showed a visually-detectable spinal curvature along caudal peduncle.

The Canonical variates analysis by malformation degree showed a clustering for each (Figure 13b). The CV1 explained the 96.8% of the total variation, exhibiting individuals with severe malformations in the positive portion, with similar body shape to that identified in the negative portion of axis 1 in the PCA analysis. In both multivariate analyzes this grouping was kept completely separated. The CV2 axis explained the 3.2% of the variation, showing lordotic and normal pattern individuals in the positive and negative axis, respectively.

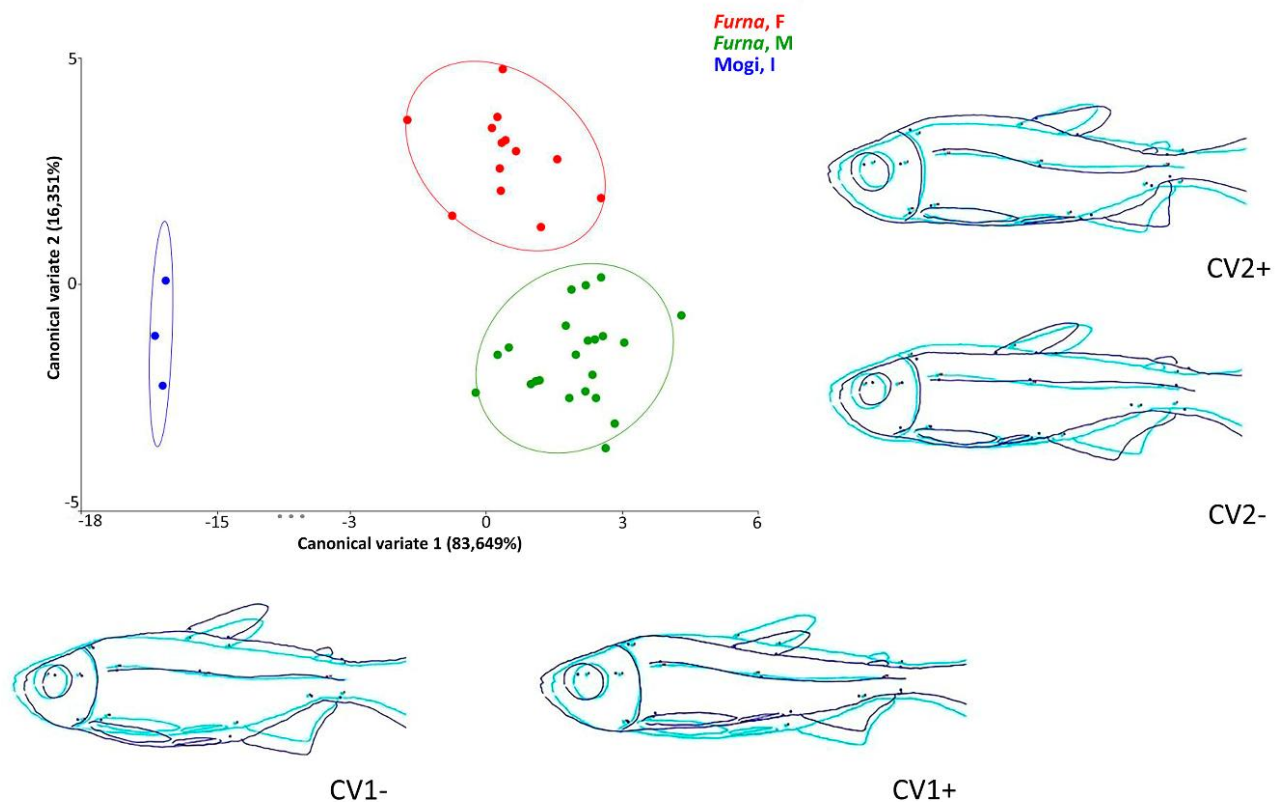
Figure 13. Multivariate analysis of *Psalidodon* aff. *fasciatus* of Furna 2 according to the deformities. (A) Principal components analysis (PCA). (B) Canonical variation analysis (CVA). Representation of deformations (dark blue) for each canonical variable (CV) in relation to the reference configuration (light blue) in fishes.



Source: The author

Multivariate analyses of canonical variates (CVA) among populations indicated morphometric differences ($P < 0.0001$) between Rio Mogi-Guaçu and *Furna 2* (canonical variable 1 = locality), as well as between males and females from *Furna 2* (canonical variable 2 = sex) (Figure 14).

Figure 14. Canonical variate analysis (CVA) of *Psalidodon* aff. *fasciatus* morphology. Representation of deformations (dark blue) for each canonical variable (CV) in relation to the reference configuration (light blue) in fishes. (Furna, F) = female specimens of *Furna 2*; (Furna, M) = male specimens of *Furna 2*; (Mogi, I) = specimens from Rio Mogi-Guaçu with undetermined sex.



Source: The author

The first canonical axis explained 83,6% of the variation. Localities were completely separated, with *Furna 2* samples on the positive axis and Mogi-Guaçu samples on the negative axis. The former set of individuals were more elongated and compressed laterally, while the latter were more robust and broader. The second canonical axis explained 16,3% of the variation, representing a distinction between male and female individuals from *Furna 2*. Females were on the positive axis, with a higher dorsoventral length, while males on the negative axis had elongated and compressed laterally body.

DISCUSSION

Our results showed that individuals with spinal deformities varied widely in the number of caudal vertebrae and body deformations, notably flattened bodies and curvature in the spine. Females were the most affected in this work, however, the specific mechanisms involved are still unknown. The sample size, although small, was representative for the purpose of this study. At the same time, it is a small population that experiences conditions that can threaten its existence, which requires the utmost care so that our actions do not negatively impact it. Shortening of the spine has recently been described in natural populations of the African fish *Labeobarbus* (Cyprinidae) by Golubtsov et al. (2021). These authors were unable to define possible genetic and/or environmental effects on the spinal shortening in these fish. However, they suggest that this phenotype may attribute some adaptive anti-predator advantage to the species. In contrast, our results in a completely isolated natural population of *Psalidodon* aff. *fasciatus*, suggest that spinal shortening as well as malformations are not stochastic events and can be attributed to population processes more probably associated with inbreeding. Eissa et al. (2009) associated inbreeding with lordosis, spinal fusion and other skeletal deformities in freshwater fish, also, in a study with salmonids, severely deformed individuals were more frequently homozygous (TIIRA; PIIRONEN; PRIMMER, 2006). Additionally, severe deformities are rarely observed in natural environments, due to these animals hardly survive, increasing the mortality of eggs and larvae (TIIRA; PIIRONEN; PRIMMER, 2006).

Males exhibited thinner, more elongated bodies than females, while also possessing a more stable number of vertebrae. Females exceed males in dorsoventral width and variation in vertebral number, but are lighter and shorter.

Number of vertebrae is associated with body shape, with more elongated bodies tending to exhibit more vertebrae (WARD; BRAINERD, 2007). Coupled with this observation, our data suggest a likelihood of sex dimorphism. We also found morphometric differences reflecting unique corporal features in the endogamic *Furna 2* population, which was completely separated from Mogi-Guaçu individuals. However, the inbred population is not identical; GROSS et al. (2004) had already called attention to the occurrence of at least two *Psalidodon* aff. *fasciatus* phenotypes in *Furna 2*, with one previously known as *Astyanax* aff. *scabripinnis*. Two possible explanations exist for these different phenotypes: natural phenotypic plasticity and genetic alterations (congenital malformations).

Variations in the vertebrae number can occur independently, because they are controlled by factors such as Hox gene expression (BUCHAN et al., 2014) and somitogenesis

duration (WARD; BRAINERD, 2007). Differences in pre-caudal and caudal vertebrae number can influence swimming (ACKERLY; WARD, 2016), as the pre-caudal region contains muscles used for displacing water and caudal vertebrae support tail muscles (REYES CORRAL; AGUIRRE, 2019). In addition, skeletal deformities can cause low weight gain, and to influence in the growth and reproduction (EISSA et al., 2021).

Thus, we can hypothesize a lower adaptive value for *Psalidodon* aff. *fasciatus* with fewer vertebrae and severe spine malformation (8.571%) than normal individuals (22.857%) or those with moderate malformation (68.571%). However, considering the absence of other fish inside *Furna 2* does not contain other fish species as competitors or predators. Combined with the abundant food availability (Mayer et al., in preparation), malformed fish still survive and reach reproductive age.

The shorter length of malformed individuals is due to the influence of lordosis on growth and an abnormal ventral curvature in the spine (CASTRO et al., 2008). Under other environmental conditions, excessive muscular activity of the caudal fin under strong water currents can induce lordosis (KIHARA et al., 2002). However, *Furna 2* fish live in a constant lentic environment, leading us to infer that other factor (i.e., congenital malformations) cause lordosis. Some authors have suggested genetic associations for spinal abnormalities as observed in lordosis-scoliosis-kyphosis (LSK) syndrome (AFONSO et al., 2000). In addition, besides correlation between lordosis and consanguinity, lordotic individuals exhibited fused and reduced vertebrae (IZQUIERDO; SOCORRO; ROO, 2010). Also, Afonso et al. (2009) revealed a high incidence of deformed larvae due to consanguinity and lordosis levels in seabream breeders, indicating an additive genetic effect. An induced mutation model has been established for zebrafish (*Danio rerio*), showing non-separation of vertebrae during larval development that yields different degrees of lordosis in adult fish (GRAY et al., 2014). From this, evolutionary development mechanisms involved in specific traits allow to have an understanding for generalize aspects in biology (JENNER; WILLS, 2007). Teleost fish represent a variable group within craniates that have demonstrated possess significantly characters suggesting being a good model (i.e., zebrafish). Likewise, modern evo-devo models focus on deeply conserved gene-centered mechanisms (BOLKER, 2014) such as our object of study *P.* aff. *fasciatus* for the study of genetics and mechanisms related to the development of the spine. This is a promising avenue to pursue in future research on the morphology of *Psalidodon* aff. *fasciatus* from *Furna 2*.

Multiple alternative causes could explain vertebral deformations in fish, such as water temperature and turbulence (REYES CORRAL; AGUIRRE, 2019), exposure to infectious

organisms (MADSEN, ARNBJERG, DALSGAARD, 2001), along with other physical, chemical, and nutritional factors (GJERDE; PANTE; BAEVERFJORD, 2005; MADSEN; ARNBJERG; DALSGAARD, 2001). Likewise, vertebral deformities, such as fusions and compressions, can occur during the embryonic period and increase throughout the life cycle (DE CLERCQ et al., 2017). Thus, we can not discard that these factors may exert some influence on this population. On the other hand, the VVSP is a conservation unit that guarantees the preservation of natural ecosystems, while *Furna 2* in particular is very isolated, precluding regular human contact with animals (IAP, 2004). Although we do not know how long this population has been isolated, a lack of obvious external causes indicates that we should focus on genetic factors as the primary source of observed malformations. From the last report (GROSS et al., 2004) to the new registries, at least 15 generations have passed, revealing the heritability and recurrence of malformed phenotypes. Thus, inbreeding and restricted gene flow (ARTONI et al., 2006) would greatly elevate extinction risk in this population. Also, loss of genetic diversity has been reported in *Furna 2* using the D-loop mtDNA region and RAPD markers (MATOSO et al., 2004; MATOSO, et al, 2010), when compared to populations with gene flow.

CONCLUSIONS

The causes of skeletal deformities comprise a still misunderstood and controversial issue in wild fish populations. The integration of several disciplines can generate valuable data about the nature of these malformations, mainly in non-model species, under conditions such as those seen here with *P. aff. fasciatus*. Some explanations of a genetic nature can be discussed as possible causes of vertebral malformations as well as the effect of inbreeding. From this perspective, only the reproduction of these *lambaris* under laboratory conditions can provide accurate information about the origin of these malformations. In light of our findings, we recommend the *Furna 2* population as a novel and highly suitable model for evo-devo studies.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Prof. Dr. Flávio Alicino Bockmann, Department of Biology, Faculty of Philosophy, Sciences and Letters of Ribeirão Preto, University of São Paulo. X-ray 45oce45et FAPESP process no. 2009/54931-0. This 45oce45et was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), Fundação Araucária

(Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná), and in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001. We would like to thank Editage (www.editage.com) for English language editing.

REFERENCES

At the end of the dissertation, the references cited in this chapter are presented.

ARTIGO 02: ASPECTOS REPRODUTIVOS EM UMA POPULAÇÃO ISOLADA DE *Psalidodon aff. fasciatus* (TELEOSTEI: CHARACIDAE) DO SUL DO BRASIL

Resumo

Mecanismos para evitar a endogamia não são eficientes em populações pequenas e isoladas, portanto efeitos deletérios na aptidão podem ser expressos, especialmente em populações naturais. Nesse estudo, investigamos caracteres reprodutivos em uma população de caracídeos que experimentam essas condições. Esses peixes pertencem a espécie *P. aff. fasciatus*, e estão isolados em um ambiente com rara configuração geológica, uma depressão doliniforme (sinkhole) denominada *Furna 2*, patrimônio natural do Parque Estadual de Vila Velha, uma Unidade de Conservação localizada no Sul do Brasil. Utilizando análises histológicas, caracterizamos cinco estádios de desenvolvimento gonadal: repouso, maduro inicial, maduro, parcialmente vazio e totalmente vazio, semelhante ao relatado anteriormente para a espécie. Os resultados aqui obtidos indicam que esses lambaris possuem estratégia de vida do tipo oportunística ®. A relação peso-comprimento foi $WT = 0.0002 LT^{2.3039}$, refletindo em crescimento alométrico negativo, ou seja, maior alocação de energia no comprimento do que em massa. O bem-estar foi determinado individualmente, não foi observado diferença significativa entre os sexos, ambos com o valor médio de $Kn = 0.95$. A proporção sexual revelou uma predominância significativa de machos (1M: 0,6 F). Nossos resultados sugerem que a endogamia possivelmente esteja agindo de forma distinta sobre os sexos, contudo, os mecanismos genéticos envolvidos permanecem em aberto.

INTRODUÇÃO

Os peixes constituem o grupo mais diversificado dentre os vertebrados, exibem variadas estratégias e táticas reprodutivas, que, em última instância, são responsáveis por garantir o sucesso reprodutivo de uma espécie em diferentes ambientes (VAZZOLER, 1996; FROESE; PAULY, 2018). A região neotropical embora detenha a mais rica e diversa ictiofauna de água doce do planeta (LOWE McCONNELL, 1999; REIS; KULLANDER; FERRARIS, 2003), ainda é pouco conhecida em relação à biologia reprodutiva de seus espécimes (WADDELL et al., 2019). Os Characiformes compreendem um dos maiores grupos da região,

com animais que abrangem inúmeras estratégias de vida, diferindo de qualquer outra ordem (VAZZOLER, 1996; NELSON, 2006; ARAÚJO et al., 2019).

Uma pequena população de caracídeos endêmicos é encontrada no Parque Estadual de Vila Velha (PEVV), Unidade de Conservação (UC) localizada no alto curso da Bacia do Rio Tibagi, município de Ponta Grossa, sul do Brasil. São peixes morfologicamente similares aos representantes da espécie *Psalidodon fasciatus* (Cuvier, 1819) (SHIBATTA; ARTONI, 2005), comumente chamados de “lambari do rabo vermelho”. Essa população natural de lambaris habita na *Furna 2* do PEVV, ambiente decorrente de processos geológicos que tiveram início há milhões de anos. A Formação Furnas com idade siluro-devoniana, entre 395 e 421 milhões de anos, (GUIMARÃES et al., 2007) consiste em feições no relevo resultantes do processo de carstificação da rocha, constituída predominantemente por quartzo (MELO et al., 2011). As *furnas* estão entre as formas de relevo mais marcantes da região, representando um patrimônio geológico único no PEVV (MELO; GIANNINI, 2007).

Devido a configuração geológica da *Furna 2* que restringe o fluxo gênico, esses lambaris experimentam um isolamento populacional consistente (ARTONI et al., 2006). Isolamento inter e intraespecífico, uma vez que os *Psalidodon* aff. *fasciatus* representam também a única espécie de peixe que vive nessa *furna*, cenário este que caracteriza portanto uma população endogâmica. Organismos que experimentam essa condição podem apresentar dificuldades para a sua manutenção no ambiente, pois, o endocruzamento tende a reduzir a variabilidade genética intrapopulacional, aumentando em frequência os alelos deletérios que normalmente expressam-se em homozigose recessiva (KELLER; WALLER, 2002). Embora os mecanismos subjacentes sejam pouco compreendidos, influências no *fitness* em populações endogâmicas podem ser altamente variáveis, como redução corporal, alterações em caracteres sexuais primários e secundários, bem como em traços morfológicos (GILPIN; SOULÉ, 1986; KELLER; WALLER, 2002; MARIETTE et al., 2006; ALA-HONKOLA et al., 2009; FITZPATRICK; EVANS, 2009; LOSDAT; CHANG; REID, 2014).

Não somente, mesmo populações consanguíneas aparentemente sem complicações podem estar sofrendo depressão por endogamia (FRANKHAM et al., 1999; ØRSTED et al., 2019). Portanto, o objetivo do presente trabalho foi compreender como o endocruzamento se comporta nessa população de lambaris em relação aos aspectos reprodutivos. Para isso, foram caracterizados os estádios de desenvolvimento gonadal, determinação da proporção sexual, estimativa da relação massa-comprimento e fator de condição relativo. Com os resultados obtidos, medidas necessárias para a conservação da espécie poderão ser estabelecidas.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem dos espécimes

A pesquisa foi realizada com base em padrões internacionais de experimentação animal, conforme autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (CEUA parecer N °. 2018-025/2018). A captura dos animais foi autorizada pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA / ICMbio nº 15115-1) e Instituto Ambiental do Paraná (IAP nº 15.190.528-5; Autorização 15.18).

Local de amostragem e amostras

Exemplares de *Psalidodon* aff. *Fasciatus* foram coletados na Furna 2 do PEVV, Unidade de Conservação localizada no alto curso da Bacia do Rio Tibagi, município de Ponta Grossa, sul do Brasil, sob as coordenadas 25° 15'01 53" S e 50° 00'19 38" O (Figura 9). Dados meteorológicos referentes à precipitação e temperatura do ar durante o período de coleta foram obtidas por meio do SIMEPAR (Sistema Meteorológico do Paraná <http://www.simepar.br/>).

As coletas com periodicidade mensal ocorreram entre fevereiro/2019 a janeiro/2020 de forma 48oce48etro, utilizando armadilha tipo rede de arrasto. Um total de 254 espécimes, compreendendo 154 machos e 100 fêmeas foram coletados. Os exemplares foram transferidos para o Laboratório de Ecologia Aquática da UTFPR, onde foram manipulados em solução de benzocaína (0,1 g/L) até atingirem anestesia profunda. Os indivíduos foram identificados, fotografados, e o sexo foi definido preliminarmente pela presença de ganchos na nadadeira anal dos machos. Com o auxílio de uma balança de precisão e um paquímetro digital foram aferidos o peso total (W_T) de cada indivíduo e o comprimento total (L_T).

Histologia das gônadas

Foi realizada uma incisão na região abdominal, do poro urogenital em direção à cabeça. As gônadas (direita e esquerda) foram extraídas e imediatamente fixadas separadamente em solução de Bouin por um período de 48 horas. Após, foram lavadas com álcool 70%, e também conservadas. As peças foram submetidas ao processamento histológico automatizado (TP 1020, Leica Byosystems, Nussloch, Alemanha) e incluídas em parafina líquida com orientação para realização de cortes transversais. Logo após foram obtidos cortes

histológicos por meio da microtomia, com 5 µm de espessura. A técnica convencional com hematoxilina-eosina (HE) foi empregada para corar as lâminas.

Imagens foram obtidas com o microscópio de epifluorescência Olympus BX41 acoplado ao sistema de captura de Imagens CCD Olympus DP 71® e software DP-Controller versão 3.2.1.276. A análise microscópica compreendeu 95 indivíduos (26 ovários e 69 testículos), e, os estádios de desenvolvimento gonadal foram estabelecidos com base na proporção das células germinativas femininas e masculinas seguindo os critérios definidos por Carvalho et al. (2009).

Razão sexual

A razão sexual foi realizada a cada mês dividindo o número de fêmeas pelo número de machos capturados em cada coleta, a fim de verificar possível flutuação deste 49o49etro na população ao longo de um ciclo reprodutivo. Da mesma forma, um valor médio foi definido para a razão sexual, considerando as 49o49 amostras realizadas. O teste Qui-quadrado foi aplicado para avaliar possíveis diferenças significativas entre a razão sexual de machos e fêmeas (1:1).

Relação peso-comprimento e fator de condição relativo (Kn)

A relação peso total (W_T) x comprimento total (L_T) foi calculada utilizando a equação: $W_T = aL_T^b$ os parâmetros a e b foram estimados a partir do método dos mínimos quadrados aplicados aos dados convertidos em seus respectivos logaritmos naturais, e, utilizados nas estimativas dos valores de peso esperado (W_e). O valor do coeficiente angular (b) foi calculado a partir do agrupamento de todos os indivíduos (LIMA-JUNIOR; CARDONE; GOITEIN, 2002). Para avaliar o “bem estar”, foi calculado, individualmente, o fator de condição relativo (Kn) que corresponde ao quociente entre o peso observado (W_T) e peso esperado (W_e) para determinado comprimento (Le Cren, 1951). Após, foi estimado o valor médio de Kn para machos e fêmeas separadamente, e comparados estatisticamente com o padrão $Kn = 1.00$, através do teste “t” de Student ($p < 0.05$).

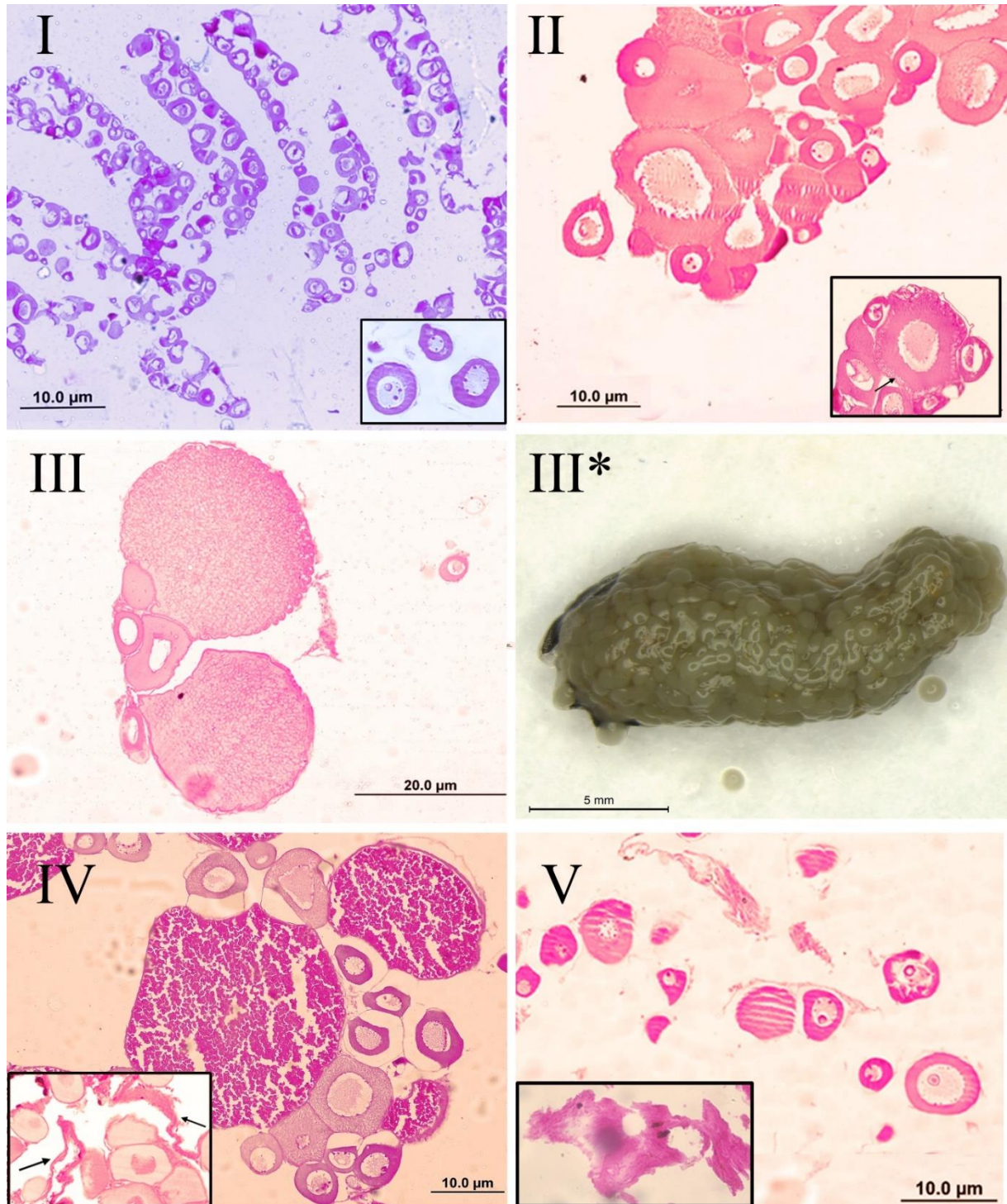
RESULTADOS

Histologia das gônadas

Com base na proporção das células germinativas femininas e masculinas é possível estabelecer os estádios de desenvolvimento gonadal (VAZZOLER, 1996). Assim, foram caracterizados os cinco estádios definidos por Carvalho et al. (2009) em estudos anteriores com *Psalidodon fasciatus*, para as fêmeas (Figura 15) e machos (Figura 17) da *Furna 2*. Bem como, determinada a frequência relativa dos estádios de maturação em relação às estações do ano (Figura 16) e (Figura 18).

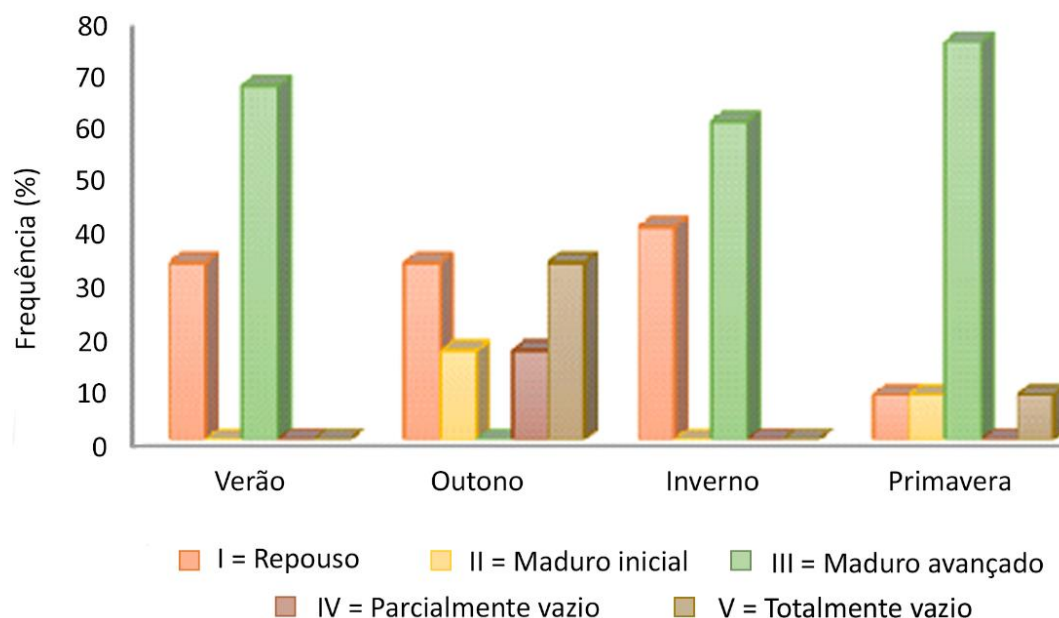
Durante a oogênese foram encontrados oócitos perinucleares em fase de crescimento primário e secundário em todos os estádios, com formato esférico e oval, condição esperada já que esses oócitos constituem o “estoque de reserva” para o período reprodutivo seguinte (VAZZOLER, 1996). No Estádio repouso (I) esses oócitos foram os únicos identificados, basofílicos, com um grande núcleo central exibindo vários nucléolos na periferia e núcleo irregular. Já no Estádio maduro inicial (II) os ovários apresentam também oócitos pré-vitelôgenicos com alvéolos corticais característicos na região periférica do citoplasma, estrutura relacionada à ativação de uma barreira durante a fertilização para evitar a poliespermia (HART, 1990). Quando prontos para desova, Estádio maduro (III) foram visualizados oócitos vitelôgenicos, acidofílicos, repletos de grânulos de vitelo, o que garante reserva de nutrientes para a sobrevivência do embrião, uma vez que a fecundação desses peixes é externa (READING; SULLIVAN, 2011). Iniciada a desova foi possível visualizar folículos pós-ovulatórios além de oócitos em todas as fases de crescimento, caracterizando o Estádio parcialmente vazio (IV), as células foliculares são remanescentes no ovário porque durante a ovulação os oócitos são liberados somente com a zona pelúcida (VAZZOLER, 1996). Ao término da desova, Estádio totalmente vazio (V) restaram nos ovários somente oócitos perinucleares, folículo pós-ovulatório e oócitos em atresia que não foram liberados, estes são representados como uma massa amorfa em degeneração e serão reabsorvidos pelo organismo (VAZZOLER, 1996).

Figura 15 – Ovários de *Psolidodon* aff. *fasciatus* corados com HE. I – Estádio repouso contendo oócito perinuclear inicial e avançado, com citoplasma basofílico e vários nucléolos no núcleo (em destaque), II – Estádio maduro inicial além de oócitos perinucleares apresenta oócitos pré-vitelogênicos com alvéolos corticais característicos (em destaque – flecha), III – Estádio maduro predominância de oócitos vitelogênicos preenchidos por grânulos de vitelo, III* - Imagem macroscópica de ovário maduro, pronto para desova, IV – Estádio parcialmente vazio com oócitos em todas as fases de crescimento e também folículos pós-ovulatórios (em destaque – flecha), V – Estádio totalmente vazio contendo oócitos perinucleares, folículo pós-ovulatório e oócito atresico (em destaque).



Fonte: A autora

Figura 16 – Distribuição de frequências percentuais dos estádios de maturação gonadal para as fêmeas de *Psalidodon aff. fasciatus* de acordo com as estações do ano (Verão – janeiro a fevereiro, outono – abril a junho, inverno – julho a setembro, verão – outubro a dezembro).



Fonte: A autora

Os testículos estavam organizados em cistos, o que caracteriza a espermatogênese do tipo cística (MATTEI et al., 1993; QUAGIO-GRASSIOTTO; ISHIBA, 2013). No Estádio repouso (I) o lúmen estava ocluído, e foram identificadas várias espermatogônias, algumas isoladas e outras agrupadas, relativamente grandes se comparadas às demais células germinativas. Já no Estádio maduro inicial (II), as espermatogônias passaram por divisões meióticas originando cistos de espermatócitos e espermatídes, que por sua vez, passaram pelo processo de espermição, o qual envolve diversas modificações para transformação em espermatozoides, como o desenvolvimento de flagelos e redução no tamanho (SHULZ et al, 2010). Estes foram detectados em pequena proporção dentro do lúmen. Os testículos desses lambaris, quando maduros Estádio (III) se apresentaram repletos de espermatozoides, além da visualização de alguns cistos de células espermatogênicas. No Estádio parcialmente vazio (IV) ocorreu a diminuição dos espermatozoides de forma gradativa, até que o túbulo seminífero se encontrasse vazio ou com apenas espermatozoides residuais Estádio (V).

Figura 17 – Testículos de *Psolidodon. Aff. fasciatus* corados com HE. I – Estádio repouso organizado em cistos contendo espermatogônias no túbulo seminífero e lúmen ocluído, II – Estádio maduro inicial com presença de espermatozoides em pequena proporção dentro do lúmen e cistos de células espermatogênicas no túbulo seminífero, III – Estádio maduro exibindo lúmen repleto de espermatozoides embutidos na secreção de acidófilos e alguns cistos de células espermatogênicas, IV – Estádio parcialmente vazio contendo poucos espermatozoides, V – Estádio totalmente vazio apenas com espermatozoides residuais. Flecha = espermatogônias, * = espermatozoides.

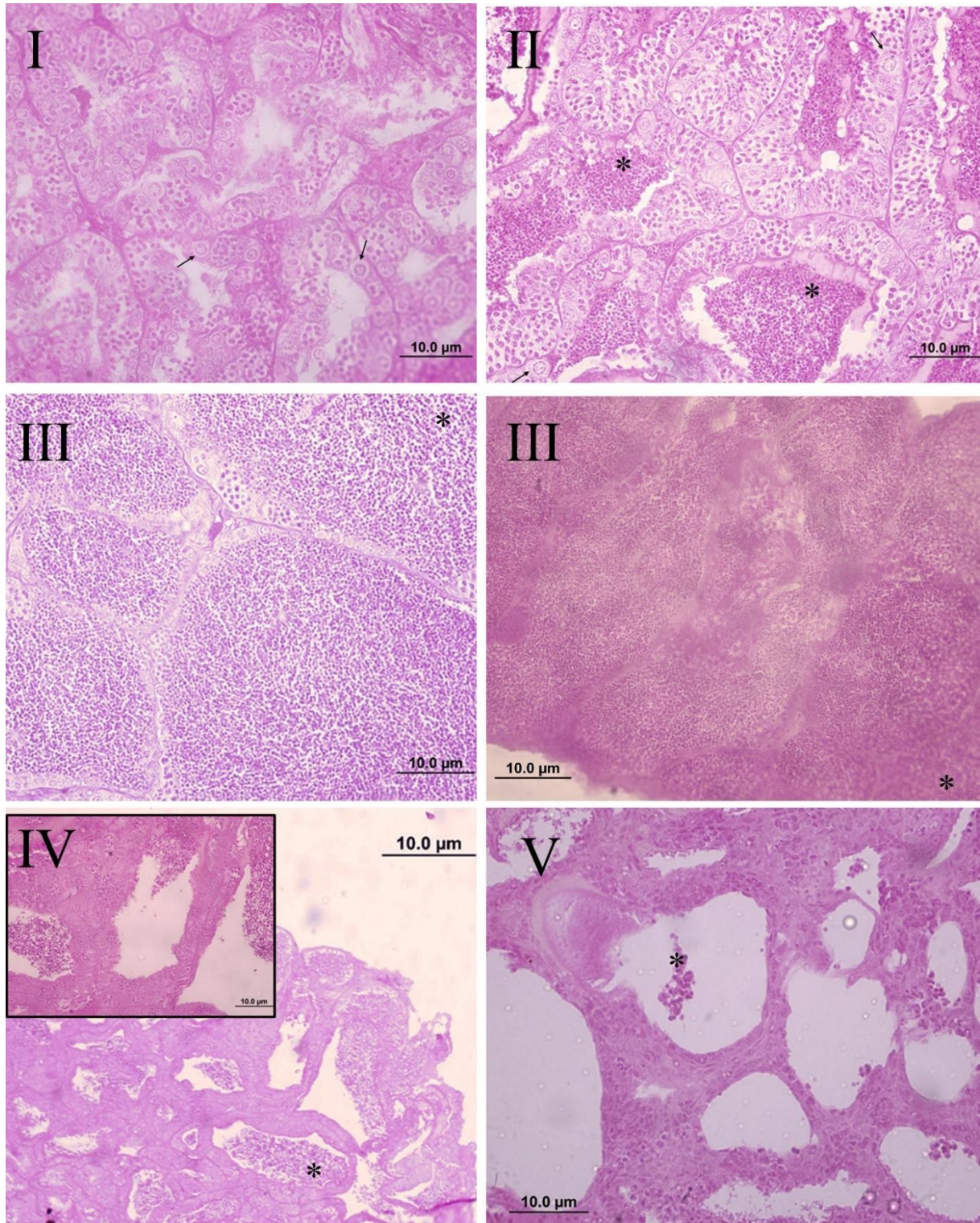
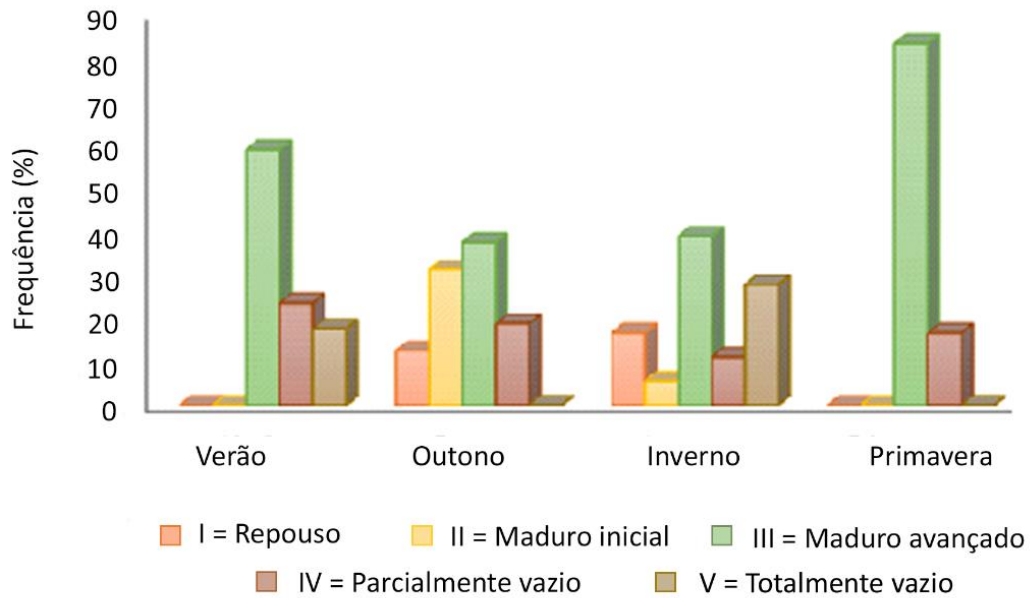


Figura 18 – Distribuição de frequências percentuais dos estádios de maturação gonadal para os machos de *Psalidodon aff. fasciatus* de acordo com as estações do ano (Verão – janeiro a fevereiro, outono – abril a junho, inverno – julho a setembro, verão – outubro a dezembro).

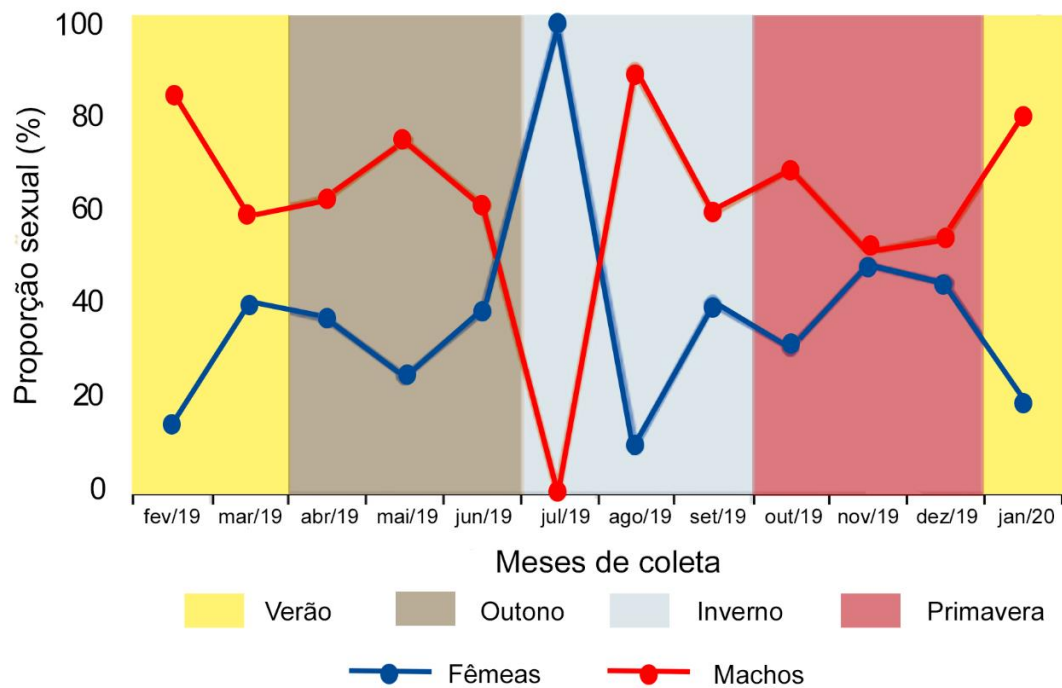


Fonte: A autora

Razão sexual

A razão sexual encontrada na população revelou predominância de machos ($n = 154$, 61%) sobre as fêmeas ($n = 100$, 39%). A proporção sexual foi de 1M:0,6F, com diferença significativa ao nível de 5% ($X^2 = 21.885$, $df = 11$, $p\text{-value} = 0.02528$). A distribuição da frequência relativa de machos e fêmeas está representada na Figura 19 e foi testada ao longo dos 12 meses de amostragem (Tabela 3).

Figura 19 – Distribuição da frequência relativa de machos e fêmeas de *P. aff fasciatus* coletados na Furna 2 do PEVV no período 2019-2020.



Fonte: A autora

Tabela 3 – Razão sexual de *Psilidodon aff. fasciatus*.

Meses	Fêmeas (n)	Machos (n)	Fêmeas (%)	Machos (%)	X ²
fev/19	1	6	14.3	85.7	3.5714
mar/19	9	13	41	59	0.72727
abr/19	10	17	37	63	1.8148
mai/19	2	6	25	75	2
jun/19	10	16	38.5	61.5	1.3846
jul/19	8	0	100	0	8*
ago/19	1	9	10	90	6.4*
set/19	29	43	40.3	59.7	2.7222
out/19	4	9	30.8	69.2	1.9231
nov/19	15	16	48.4	51.6	0.032258
dez/19	9	11	45	55	0.2
jan/20	2	8	20	80	3.6

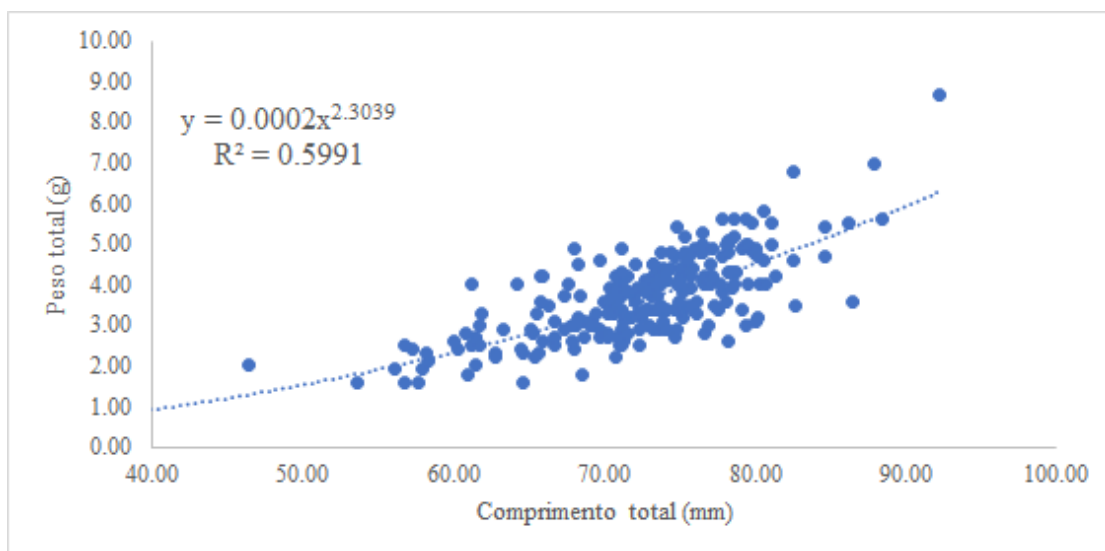
Fonte: A autora

Nota: * indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre machos e fêmeas.

Relação peso-comprimento e fator de condição relativo (kn)

A relação peso-comprimento foi estimada para todos os indivíduos agrupados, o parâmetro b foi 2,3, o que indica crescimento do tipo alométrico negativo (Figura 20).

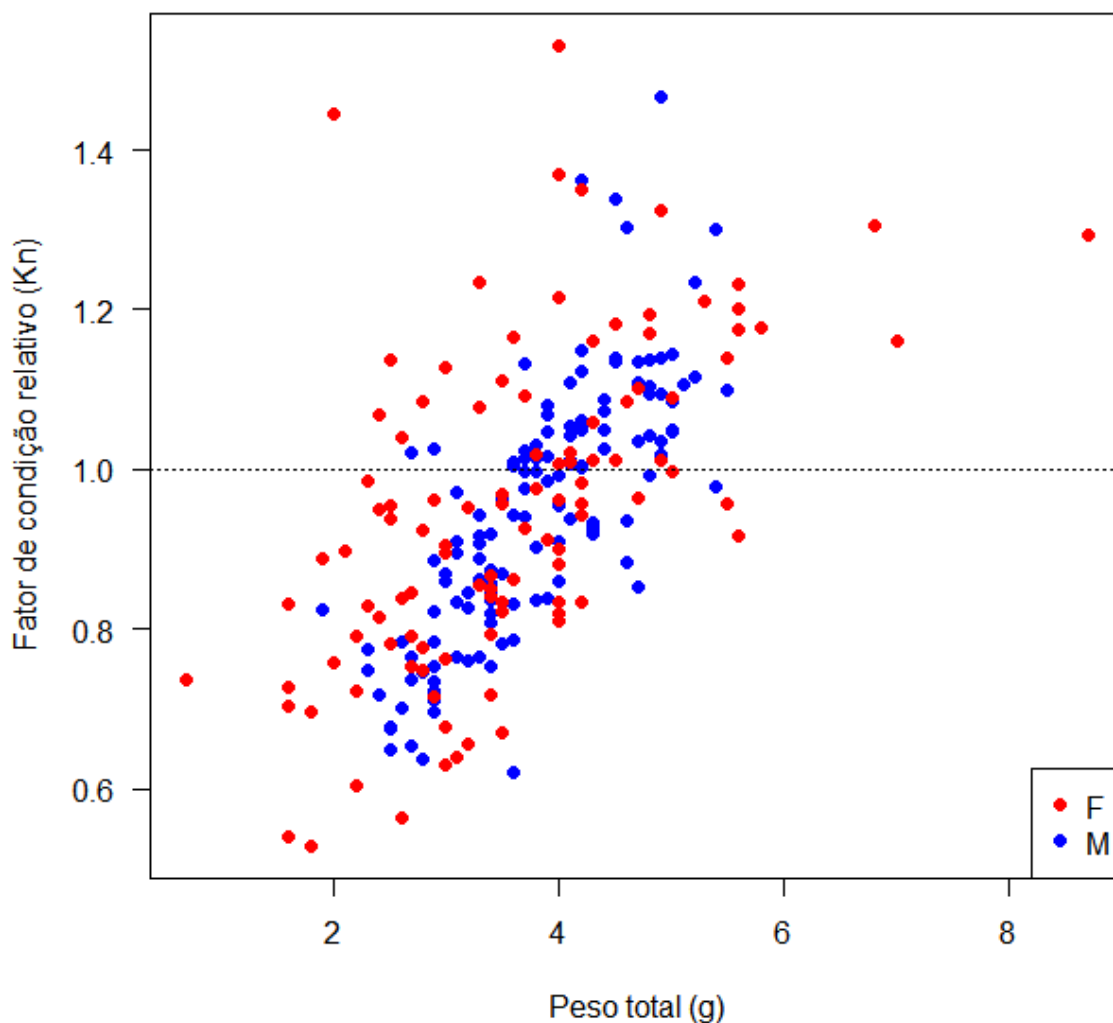
Figura 20 – Representação gráfica da relação peso-comprimento para ambos os sexos agrupados *P. aff. fasciatus* da Furna 2 do PEVV.



Fonte: A autora

O fator de condição relativo (Kn) foi determinado individualmente (Figura 21). Estimaram-se as médias para machos e fêmeas. Não houve diferença significativa para o bem-estar entre os sexos, ambos apresentaram o valor médio de $Kn = 0.95$.

Figura 21 – Valores individuais do fator de condição relativo (K_n), em torno do valor padrão ($K_n = 1,0$), em relação ao peso total.

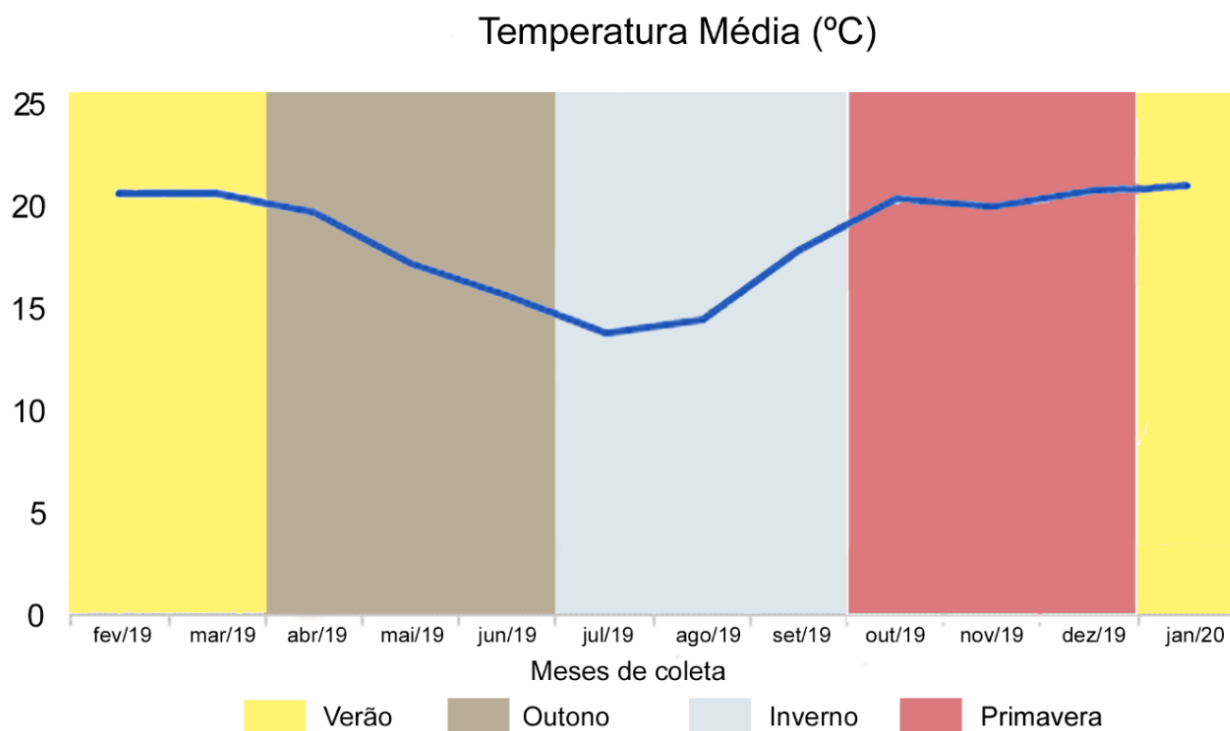


Fonte: A autora

Dados climatológicos

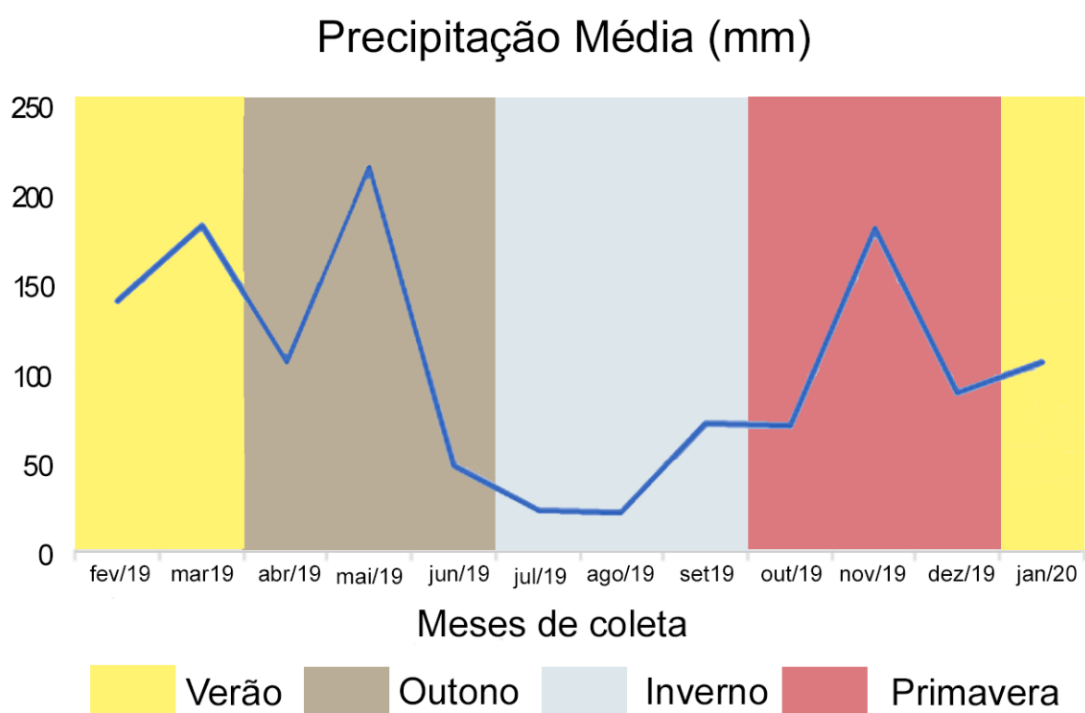
As médias mensais de precipitação e temperatura do ar durante o período de coleta foram obtidas por meio do SIMEPAR (Sistema Meteorológico do Paraná <http://www.simepar.br/>). Os valores médios da temperatura foram mais altos durante o período de outubro a março (Figura 22). Os meses de junho a outubro corresponderam ao período mais secos do ano, e o mês de maio apresentou o maior índice de precipitação (Figura 23).

Figura 22 – Média mensal de temperatura do ar para o município de Ponta Grossa no período de 02/2019 a 01/2020.



Fonte: A autora

Figura 23 – Média mensal de precipitação para o município de Ponta Grossa no período de 02/2019 a 01/2020.



Fonte: A autora

DISCUSSÃO

Os teleósteos no geral apresentam desenvolvimento gonadal cíclico e sazonal, os ovários e testículos passam por profundas modificações ao longo da gametogênese, o que permite que esse processo seja dividido em estádios, estes que variam de acordo com a espécie e com os critérios escolhidos (QUAGGIO-GRASSIOTTO; ISHIBA, 2013). Utilizando análises histológicas, considerando diferenciação, crescimento e desenvolvimento das células germinativas, foi possível caracterizar para essa população endogâmica de *P. aff. fasciatus* cinco estádios de maturação (Figura 15; Figura 17) não diferindo do proposto anteriormente por Carvalho et al. (2009) para a espécie.

Os resultados aqui obtidos indicam que *P. aff. fasciatus* apresentam atividade reprodutiva praticamente durante todo o ano, particularmente se considerarmos os machos, conseqüentemente, quem determina o período de desova são as fêmeas, além da prole, pois, possuem um número limitado de oócitos em relação aos espermatozoides (CHAVES, 1991; SANTOS, 1995). Durante o outono, as fêmeas estão em maior proporção nos Estádios IV e V, avançando para os estádios de maturação nos meses posteriores, especialmente ao fim do inverno. A maior intensidade no período reprodutivo compreendeu as estações de primavera e verão, com início em outubro, evento visualizado também para outros peixes (VAZZOLER; MENEZES, 1992; PORTELLA et al., 2021). Fatores abióticos podem estar relacionados, pois, a desova tende a ocorrer quando as condições ambientais estão apropriadas para a fecundação e desenvolvimento da prole (VAZZOLER, 1996), o que pode ter relação com o observado durante as coletas na primavera e verão: aumento no índice da temperatura do ar associada à precipitação. Apesar disso, não se pode determinar de que forma as variáveis abióticas atuaram como fatores preditivos e finalizadores no período reprodutivo, para isso, análises mais minuciosas são necessárias.

As características reprodutivas exibidas por esses caracídeos indicam uma estratégia de vida do tipo oportunística (r), comum em espécies de pequeno porte, especialmente em Characiformes com ausência ou pouco cuidado parental e período de desova prolongado com surtos reprodutivos (WINEMILLER, 1989; VAZZOLER, 1996). O longo período reprodutivo e o ambiente lântico onde esses peixes vivem (BAZZOLI, 2003), sugerem a desova do tipo fracionada, similar a outros Characiformes (HOJO; SANTOS; BAZZOLI, 2004; CARVALHO et al., 2009). Cabe ressaltar que, o tipo de desova é um ponto problemático no estudo da reprodução dos lambaris, pois, não existe homogeneidade, como consequência de fatores

fisiológicos ou alterações ambientais os peixes podem alterar entre desova total para a desova fracionada e vice-versa (CARVALHO et al., 2009; ARAÚJO et al., 2019).

O crescimento apontado foi do tipo alométrico negativo ($b = 2,3$), ou seja, maior incremento de energia em crescimento do que em peso. O que pode estar associado à endogamia, visto que o peso corporal é afetado em indivíduos consanguíneos (FESSEHAYE et al., 2007). Contudo, o comprimento total máximo estimado de 92,22 mm, abaixo do registrado para a espécie 132 mm (VAZZOLER, 1996). Apesar do pequeno porte, as fêmeas suportaram os maiores valores aferidos, o que possivelmente está relacionado com a fecundidade, pois, o tamanho da cavidade peritoneal permite uma maior ou menor quantidade de oócitos (VAZZOLER, 1996, ARAÚJO et al., 2019). Ainda, em relação ao grau de higidez, alguns indivíduos dispersaram do $Kn = 1$ esperado, entretanto, o valor médio de $Kn = 0,95$ não foi significativo para os sexos agrupados e nem separadamente. O que nos leva a inferir que ambos os sexos apresentam um bom índice de bem-estar, reflexo das condições nutricionais recentes relacionadas com a disponibilidade abundante de alimentos na *Furna 2* (Mayer et al., em preparação).

A proporção sexual é um dos indicativos mais importantes para o entendimento da dinâmica populacional dos peixes, no geral as populações tendem ao equilíbrio com o número de machos estatisticamente igual ao número de fêmeas (1:1) (NIKOLSKY, 1969; VAZZOLER, 1996). Todavia, desvios na proporção são relativamente frequentes em populações de peixes e podem ser provocados por fatores que agem de forma distinta sobre os sexos, como comportamento reprodutivo, alterações na taxa de natalidade, mortalidade e de crescimento (VAZZOLER, 1996; ARAÚJO et al., 2019). Cabe ressaltar que a proporção sexual tendenciosa para um dos sexos reduz a população efetiva, bem como resulta na perda da diversidade genética (ZAJITSCHKI et al., 2009). Também, o maior número de machos em populações consanguíneas pode resultar em um baixo sucesso reprodutivo, visto que os efeitos da endogamia são agravados quando existe competição entre machos (FESSEHAYE et al., 2009).

Os *P. aff. fasciatus* da *Furna 2* exibiram uma predominância de machos, com exceção do mês de julho correspondente ao inverno. No entanto, ao considerarmos as demais amostragens mensais, como também as estações do ano, o resultado contrasta com o encontrado normalmente para *P. aff. fasciatus*, onde as fêmeas predominam (CARVALHO et al., 2009; SILVA et al. 2010; SILVEIRA et al., 2019). O maior número de machos presentes em populações de peixes de água doce foi associado ao ambiente oligotrófico (NIKOLSKY, 1969; GURGEL, 2004), o que diverge do encontrado na *Furna 2*, uma vez que o ambiente é estável e o recurso alimentar é abundante no local, portanto o esperado seria que a razão sexual

favorecesse as fêmeas. Ainda, o comportamento reprodutivo pode exercer influência, o que poderia explicar o maior número de machos durante o pico reprodutivo, já que essa seria uma tática para espécies de fecundação externa relacionada com a fecundidade das fêmeas, assim, a maior proporção de machos aumentaria o número de oócitos fertilizados (VEREGUE; ORSI, 2003). Em contrapartida, a razão sexual compreendendo todas as amostragens não pode ser explicada em sua totalidade pelas possíveis causas apontadas, o que nos leva a inferir que outros fatores podem estar agindo de forma distinta sobre os sexos. Possivelmente questões relacionadas à consanguinidade, uma vez que a sobrevivência de machos e fêmeas pode ser afetada de forma diferencial pela depressão endogâmica (LACY et al., 1993). Ainda, genes deletérios foram associados com um desequilíbrio na razão sexual provocando a maior letalidade de fêmeas em uma população consanguínea de tilápias (SHIRAK et al., 2002).

A fecundidade representa o número de oócitos maduros existentes em uma fêmea antes da desova, o que está intimamente relacionado com o volume da cavidade celomática e tamanho desses oócitos, embora exista uma grande variação interespecífica, peixes de grande porte tendem a exibir uma fecundidade elevada, bem como o contrário (VAZZOLER, 1996; DALA-CORTE; AZEVEDO, 2010). Já, o tamanho dos oócitos não depende do porte da espécie, mas sim do comportamento reprodutivo (VAZZOLER, 1996; HIRT; ARAYA; FLORES, 2011). Baixos valores de fecundidade foram relatados para *P. fasciatus* corroborando com o pequeno porte (HIRT; ARAYA; FLORES, 2011), também, os lambaris aqui estudados apresentam características que de acordo com Vazzoler (1996) apontam possivelmente para uma baixa fecundidade e oócitos pequenos, pois, não são migradores, não possuem cuidado parental e apresentam fecundação externa. Aspecto esse que pode garantir vantagens nessa população endogâmica que está isolada intra e interespecificamente, já que oócitos menores podem ser produzidos em maior quantidade, ampliando as chances de perpetuação da espécie (DALA-CORTE; AZEVEDO, 2010). Ainda, investir na produção de oócitos grandes resultaria em um elevado custo energético desvantajoso, pois, esses oferecem melhores condições para o desenvolvimento e sobrevivência das larvas sobretudo na presença de predadores, cenário contrário ao visualizado na *furna* (VAZZOLER, 1996).

Em nosso trabalho não foram identificados indivíduos imaturos, possivelmente devido a seletividade de pesca (rede de arrasto), o que impossibilitou a estimativa do comprimento de primeira maturação pelo método L_{50} , que estabelece o comprimento no qual 50% dos indivíduos amostrados são adultos e 50% são imaturos ou juvenis (VAZZOLER, 1996; BAZZOLI, 2003). Como alternativa, avaliamos o comprimento de primeira maturação considerando o menor comprimento total aferido para fêmeas e machos em Estádio maduro (III) (HOJO; SANTOS;

BAZZOLI, 2004). O qual foi estimado em 56,78 mm para fêmeas e 61,47 mm para machos, valores menores que o registrado para a espécie por Carvalho et al. (2009), onde o comprimento padrão de primeira maturação foi de 64 e 65 mm para machos e fêmeas, respectivamente, e por Prado et al. (2011), onde o comprimento total para maturação foi de 88 mm. Possivelmente, essa é uma tática reprodutiva decorrente das variáveis bióticas e abióticas da *Furna 2*, uma vez que a primeira maturação precoce é eficiente para aumentar a produção de juvenis e, conseqüentemente, a população como um todo (VAZZOLER, 1996; VEREGUE; ORSI, 2003; DALA-CORTE; AZEVEDO, 2010).

CONCLUSÃO

Em conclusão, esse estudo apresenta as primeiras informações sobre a biologia reprodutiva desses lambaris que vivem na *Furna 2* do Parque Estadual de Vila Velha, Paraná. Conforme o exposto, as gônadas não sofreram alterações, a estratégia oportunista apontada é também comum para outros caracídeos de pequeno porte, além da plasticidade de táticas reprodutivas esperada. Contudo, nossos resultados sugerem que a endogamia possa estar refletindo de forma distinta sobre os sexos, ocasionando um desequilíbrio na razão sexual tendencioso para os machos. Ainda, por se tratar de uma população pequena e restrita de fluxo gênico, os efeitos da consanguinidade podem ser agravados, refletindo em um cenário com indivíduos fortemente ameaçados.

REFERÊNCIAS

No final da dissertação, são apresentadas as referências citadas neste capítulo.

5 CONCLUSÃO GERAL

Nosso objetivo consistia na investigação de manifestações em traços morfológicos e reprodutivos resultantes da endogamia na população de *Psalidodon* aff. *fasciatus*. Em conclusão, nosso estudo sugere que esses lambaris estão expressando alterações significativas relacionadas com deformidades da coluna vertebral, onde indivíduos severamente anômalos correspondem ao sexo feminino. Coincidentemente, a proporção sexual é desequilibrada nessa população (1M:0,6F), o que nos leva a inferir que a consanguinidade possa estar atuando de forma distinta sobre os sexos. Ainda, ao considerarmos que a *Furna 2* do PEVV é restrita de fluxo gênico, as complicações já discutidas aqui podem ser ainda mais graves, uma vez que as condições experimentadas por esses lambaris tendem a ampliar os efeitos deletérios em características intimamente relacionadas com a aptidão.

REFERÊNCIAS

- ACKERLY, K. L.; WARD, A. B. How temperature-induced variation in musculoskeletal anatomy affects escape performance and survival of zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology**, v. 325, n. 1, p. 25–40, jan. 2016.
- AFONSO, J. M.; MONTERO, D.; ROBAINA, L. ASTORGA, N.; IZQUIERDO, M. S.; GINÉS, R. Association of a lordosis-scoliosis-kyphosis deformity in gilthead seabream (*Sparus aurata*) with family structure. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 22, p. 159–163, 2000.
- AFONSO, J. M.; ASTORGA, N.; NAVARRO, A.; MONTERO, D.; ZAMORANO, M. J.; IZQUIERDO, M. Genetic determination of skeletal deformities in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). In: IAFSB 2009 Book of abstracts, p. 90. **Communication Interdisciplinary Approaches in Fish Skeletal Biology**, 2009.
- ALA-HONKOLA, O.; UDDSTRÖM, A.; PAULI, B. D.; LINDSTRÖM, K. Strong inbreeding depression in male mating behaviour in a poeciliid fish. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 22, n. 7, p. 1396–1406, 2009.
- ARAÚJO, F. G.; NASCIMENTO, A. A.; GOMES, I. D.; SALES, A.; OLIVEIRA, B. A. C. Gonadal development and reproductive period of the characin *Astyanax* aff. *bimaculatus* (Characiformes: Characidae) in a tropical reservoir in southeastern Brazil. **ZOOLOGIA – an International Journal for Zoology**, v. 36, 2019.
- ARTONI, R. F.; ALMEIDA, M. C. Genética de peixes neotropicais. I. Aspectos da conservação genética dos peixes no Parque Estadual de Vila Velha, Paraná, Brasil. **Publication UEPG: Biological and Health Science**, Ponta Grossa, v. 9, n. 2, p. 7-15, 2003.
- ARTONI, R. F.; SHIBATTA, O. A.; GROSS, M. C.; SCHNEIDER, C. H.; ALMEIDA, M. C. *Astyanax* aff. *fasciatus* Cuvier, 1819 (Teleostei; Characidae): Evidences of a species complex in the upper rio Tibagi Basin (Paraná, Brazil). **Neotropical Ichthyology**, v. 4, n. 2, p. 197-202, 2006.
- ARTONI, R. F.; SHIBATTA, O. A. **Peixes do Parque Estadual de Vila Velha: Aspectos da História Natural, da Biologia Evolutiva e da Conservação**. Editora UEPG, 2006, 155 p.
- ASSINE, M. L. **Aspectos da estratigrafia das seqüências pré-carboníferas da Bacia do Paraná no Brasil**. Tese (Doutorado em Geologia) - Instituto de Geociências da USP, São Paulo, 1996.
- ASTUTI, S. S.; HARIATI, A. M.; KUSUMA, W. E.; WIADNYA, D. G. R. Morphometric asymmetry of *Barbodes binotatus* (cyprinidae) collected from three different rivers in Java. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 441, 2020.

AULSTAD, D.; KITTELSEN, A. Abnormal Body Curvatures of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) Inbred Fry. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v. 28, n. 12, p. 1918-1920, 1971.

BABCOCK, H. E.; DUTTA, S.; ALUR, R. P.; BROCKER, C.; VASILIOU, V.; VITALE, S.; ABU-ASAB, M.; BROOKS, B. P. *aldh7a1* Regulates Eye and Limb Development in Zebrafish. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, 2014.

BAIRD, S. F.; GIRARD, C. F. Descriptions of new species of fishes collected in Texas, New Mexico and Sonora, by Mr. John H. Clark, on the U.S. and Mexican Boundary Survey, and in Texas by Capt. Stewart Van Vliet, U.S. A. **Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia**, v. 7, p. 24-29, 1854.

BAKER, T. R.; PETERSON, R. E., HEIDEMAN, W. Early dioxin exposure causes toxic effects in adult zebrafish. **Toxicological Sciences**, v. 135, n. 1, p. 241–250, 2013.

BAZZOLI, N. Parâmetros reprodutivos de peixes de interesse comercial na região de Pirapora. In: GODINHO, H. P.; GODINHO, A. L. (org.). **Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais**. Belo Horizonte: PUC Minas, 2003. p. 291-306.

BENGTSSON, B. E.; BENGTSSON, A.; HIMBERG, M. Fish deformities and pollution in some Swedish waters. **Ambio**, v.14, p. 32-35, 1985.

BERILLIS, P. Factors that can lead to the development of skeletal deformities in fishes: A review. **Journal of Fisheries Sciences**, v. 9, p. 17–23, 2015.

BIRD, N. C.; MABEE, P. M. Developmental morphology of the axial skeleton of the zebrafish, *Danio rerio* (Ostariophysi: Cyprinidae). **Developmental Dynamics**, v. 228, n. 3, p. 337–357, nov. 2003.

BOGLIONE, C.; GISBERT, E.; GAVAIA, P.; WITTEN, P.; MOREN, M.; FONTAGNÉ, S.; KOUMOUNDOUROS, G. Skeletal anomalies in reared European fish larvae and juveniles. Part 2: Main typologies, occurrences and causative factors. **Reviews in Aquaculture**, 2013.

BOLKER, J. Model species in evo-devo: a philosophical perspective. **Evolution and Development**, v. 16, n. 1, p 49–56, 2014.

BUCHAN, J. G.; GRAY, R. S.; GANSNER, J. M.; ALVARADO, D. M.; BURGERT, L.; GITLIN, J. D.; GURNETT, C. A.; GOLDSMITH, M. I. Kinesin family member 6 (*kif6*) is necessary for spine development in zebrafish. **Developmental Dynamics**, v. 243, n. 12, p. 1646–1657, dez. 2014.

CAMPOS, J. B.; DALCOMUNE, M. A. O Parque Estadual de Vila Velha. In: CARPANEZZI, O. T. B.; CAMPOS, J. B. (org). **Coletânea de Pesquisas: Parques**

Estaduais de Vila Velha, Cerrado e Guartelá. Curitiba, Instituto Ambiental do Paraná, v.1, 2011.

CARVALHO, P. A.; PASCHOALINI, A. L.; SANTOS, G. B.; RIZZO, E.; BAZZOLI, N. Reproductive biology of *Astyanax fasciatus* (Pisces: Characiformes) in a reservoir in southeastern Brazil. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 25, p. 306-313, 2009.

CASTRO, J.; PINO-QUERIDO, A.; HERMIDA, M.; CHAVARRÍAS, D.; ROMERO, R.; GARCÍA-CORTES, L. A.; TORO, M. A.; MARTÍNES, P. Heritability of skeleton abnormalities (lordosis, lack of operculum) in gilthead seabream (*Sparus aurata*) supported by microsatellite family data. **Aquaculture**, v. 279, n. 1–4, p. 18–22, jul. 2008.

CASTRO, J. P.; MOURA, M. O.; MOREIRA-FILHO, O.; SHIBATTA, O. A.; SANTOS, M. H.; NOGAROTO, V.; VICARI, M. R.; ALMEIDA, M. C.; ARTONI, R. F. Evidence of incipient speciation in *Astyanax scabripinnis* species complex (Teleostei: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 12, n. 2, p. 429-438, 2014.

CHAVES, P. T. C. Testículos: estrutura e dinâmica de maturação – hermafroditismo: configuração e ocorrência. **Semana sobre histologia de peixes**, Jaboticabal: FAVC/UNESP, p. 39-46, 1991.

CLABAUT, C.; BUNJE, P. M. E.; SALZBURGER, W.; MEYER, A. Geometric morphometric analyses provide evidence for the adaptive character of the *Tanganyikan cichlid* fish radiations. **Evolution**, v. 61, n. 3, p. 560-578, 2007.

CORNELIO, D. **Biologia reprodutiva e presença de cromossomo B em *Astyanax scabripinnis* (Teleostei: Characidae).** Dissertação (Mestrado em Biologia Evolutiva) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, Brasil, 2013.

CRNOKRAK, P.; ROFF, D. A. Inbreeding depression in the wild. **Heredity**, v. 83, p. 260-270, 1999.

CUVIER, G. Sur les poissons du sous-genre *Hydrocyon*, sur deux nouvelles espèces de *Chalceus*, sur trois nouvelles espèces du *Serrasalmes*, et sur l'*Argentina glossodonta* de Forkahl, qui est l'*Albula gonorhynchus* de Bloch. **Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle**, v. 5, p. 351-379, 1819.

DE CLERCQ, A.; PERROT, M. R.; PREECE, M. A.; HUYSSEUNE, A.; WITTEN, P.E. The external phenotype–skeleton link in post-hatch farmed Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Jornal of Fish Diseases**, v.41, n. 3, p. 511-527, nov. 2017.

DALA-CORTE, R. B.; AZEVEDO, M. A. Biologia reprodutiva de *Astyanax henseli* (Teleostei, Characidae) do curso superior do Rio dos Sinos, RS, Brasil. **Iheringia. Série Zoologia**, v. 100, n. 3, p. 259-266, 2010.

DUKE ENERGY. **Peixes do rio Paranapanema**. São Paulo: Horizonte Geográfico, 2008, 120 p.

EIGENMANN, C. H. New characins in the collection of the Carnegie Museum. **Annals of the Carnegie Museum**, v. 8, n. 1, p. 164-181, 1911.

EISSA, A. E.; MOUSTAFA, M.; EL-HUSSEINY, E. M.; SAEID, S.; SALEH, O. H. BORHAN, T. Identification of some skeletal deformities in freshwater teleosts raised in Egyptian aquaculture. **Chemosphere**, v. 77, p. 419–425, 2009.

EISSA, A. E.; ABU-SEIDA, A. M.; ISMAIL, M. M.; ABU-ELALA, N. M.; ABDELSALAM, M. A comprehensive overview of the most common skeletal deformities in fish. **Aquaculture Research**, v. 52, n. 6, p. 2391–2402, 2021.

ESCHMEYER, W. N.; FONG, J. D. Species by Family/Subfamily in the Catalog of Fishes. **Catalog of Fishes**, 2017.

FESSEHAYE, Y.; KOMEN, H.; REZK, M. A.; VAN ARENDONK, J. A. M.; BOVENHUIS, H. Effects of inbreeding on survival, body weight and fluctuating asymmetry (FA) in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, v. 264, 2007.

FESSEHAYE, Y.; BOVENHUIS, H.; REZK, M. A.; CROOIJMANS, R.; VAN ARENDONK, J. A. M.; KOMEN, H. Effects of relatedness and inbreeding on reproductive success of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 294, p. 180-186, 2009.

FITZPATRICK, J. L.; EVANS, J. P. Reduced heterozygosity impairs sperm quality in endangered mammals. **Biology Letters**, v. 5, p. 320–323, 2009.

FLORES-LOPES, F.; CETRA, M.; MALABARBA, L. R. Utilização de índices ecológicos em assembléias de peixes como instrumento de avaliação da degradação ambiental em programas de monitoramento. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 4, p. 183–193, dez. 2010.

FITZPATRICK, J. L.; EVANS, J. P. Reduced heterozygosity impairs sperm quality in endangered mammals. **Biology Letters**, v. 5, p. 320–323, 2009.

FRANKHAM, R.; LEES, K.; MONTGOMERY, M. E.; ENGLAND, P. R.; LOWE, E. H.; BRISCOE, D. A. Do population size bottlenecks reduce evolutionary potential? **Animal Conservation**, v. 2, p. 255–260, 1999.

FRASER, T. W. K.; HANSEN, T.; FLEMING, M. S.; FIELLDAL, P. G. The prevalence of vertebral deformities is increased with higher egg incubation temperatures and triploidy in Atlantic salmon *Salmo salar* L. **Journal of Fish Diseases**, v. 38, n. 1, p. 75–89, 2015.

FROESE, R.; PAULY, D. (ed). 2018. **FishBase**. Disponível em: <<https://www.catalogueoflife.org/col/details/database/id/10>>. Acesso em: 23 jun. 2020.

FROMMEN, J.; LUZ, C.; MAZZI, D.; BAKKER, T. Inbreeding depression affects fertilization success and survival but not breeding coloration in threespine sticklebacks. **Behaviour**, v. 145, 2008.

GARCIA, E. L.; CHINI, H. A.; MAISTRO, J. A. D.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Dynamics and cytochemistry of oogenesis in *Astyanax fasciatus* (CUVIER)(Teleostei, Characiformes, Characidae) from Rio Sapucaí, Minas Gerais State, Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 18, n. 4, p. 1057-1064, 2001.

GÉRY, J. **Characoids of the world**. Neptune City: T.F.H. Publications, 1977, 672 p.

GILPIN, M. E; SOULÉ, M. E. Minimum viable populations: the processes of species extinctions. In: SOULÉ, M. E. (ed) **Conservation Biology: the Science of Scarcity and Diversity**. Sinauer Associates, Sunderland, MA, 1986.

GJERDE, B.; PANTE, M. J. R.; BAEVERFJORD, G. Genetic variation for a vertebral deformity in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, v. 244, p. 77-87, 2005.

GOLUBTSOV, A. S.; KOROSTELEV, N. B.; LEVIN, B. A. Monsters with a shortened vertebral column: A population phenomenon in radiating fish *Labeobarbus* (Cyprinidae). **PLoS ONE**, v. 16, n. 1 January, p. 1–27, 2021.

GOMIERO, L. M.; VILLARES-JUNIOR, G. A.; BRAGA, F. M. S. Relação peso-comprimento e fator de condição de *Oligosarcus hepsetus* (Cuvier, 1829) no Parque Estadual da Serra do Mar - Núcleo Santa Virgínia, Mata Atlântica, estado de São Paulo, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 1, p. 101-105. 2010.

GOMIERO, L. M; SOUZA, U. P.; BRAGA, F. M. S. Condition factor of *Astyanax intermedius* Eigenmann, 1908 (OSTEICHTHYES, CHARACIDAE) parasitised by *Paracymothoa astyanaxi* Lemos de Castro, 1955 (CRUSTACEA, CYMOTHOIDAE) in the Grande River, Serra do Mar State Park - Santa Virgínia Unit, São Paulo, Brazil. **Braz. J. Biol.**, v. 72, n. 2, p. 379-388, 2012.

GRAY, R. S.; WILM, T. P.; SMITH, J.; BAGNAT, M.; DALE, R. M.; TOPCZWESKI, J.; JOHNSON, S. L.; SOLNICA-KREZEL, L. Loss of col8a1a function during zebrafish embryogenesis results in congenital vertebral malformations. **Developmental Biology**, v. 386, n. 1, p. 72–85, fev. 2014.

GROSS, M. C.; SCHNEIDER, C. H.; ALMEIDA, M. C.; LEITE, M. de L.; BERTOLLO, L. A. C.; ARTONI, R. F. Population structure, fluctuating asymmetry and genetic variability in an endemic and highly isolated *Astyanax* fish population (Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 27, n. 4, p. 529-535, 2004.

- GUIMARÃES, G. B.; MELO, M. S. de.; GIANNINI, P. C. F.; MELEK, P. R. Geologia dos Campos Gerais. **Patrimônio Natural dos Campos Gerais do Paraná**, Ponta Grossa: UEPG, 2007. cap 2. p. 23-32.
- GURGEL, H. de C. B. Estrutura populacional e época de reprodução de *Astyanax fasciatus* (Cuvier) (Characidae, Tetragonopterinae) do Rio Ceará Mirim, Poço Branco, Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 21, 2004.
- HART, N. H. Fertilization in teleost fishes: Mechanism of sperm-egg interactions. **International Review of Cytology**, v. 121, p. 1–66, 1990.
- HIRT, L. M.; ARAYA, P. R.; FLORES, S. A. Population structure, reproductive biology and feeding of *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819) in an Upper Paraná River tributary, Misiones, Argentina. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 23, n. 1, p. 1-12, 2011.
- HOJO, R. E. S.; SANTOS, G. B.; BAZZOLI, N. Reproductive biology of *Moenkhausia intermedia* (Eigenmann) (Pisces, Characiformes) in Itumbiara Reservoir, Goiás, Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 21, n. 3, p. 519-524, 2004.
- HOLZ, M.; FRANÇA, A. B.; SOUZA, P. A.; IANNUZZI, R.; ROHN, R. A stratigraphic chart of the Late Carboniferous/ Permian succession of the eastern border of the Paraná Basin, Brazil, South America. **Journal of South American Earth Sciences**, v. 29, n. 2, p. 381-399, mar. 2010.
- IBAÑEZ, A. L.; COWX, I. G.; O'HIGGINS, P. Geometric morphometric analysis of fish scales for identifying genera, species, and local populations within the Mugilidae. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 64, n. 8, p. 1091-1100, 2007.
- INSTITUTO AMBIENTAL DO PARANÁ. **Plano de Manejo do Parque Estadual de Vila Velha**. Curitiba: IAP, 2004.
- ITO, K. M. **Histopatologia de brânquia e fator de condição de *Astyanax aff. paranae* (PISCES) como indicadores de contaminação aquática no centro-noroeste do Paraná**. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Engenharia Ambiental) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2013.
- IZQUIERDO, M. S., SOCORRO, J., ROO, J. Studies on the appearance of skeletal anomalies in red porgy: effect of culture intensiveness, feeding habits and nutritional quality of live preys. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 26, p. 320-326, 2010.
- JAGIELŁO, K.; ZALEWSKI, T.; DOBOSZ, S.; MICHALIK, O.; OCALEWICZ, K. High Rate of Deformed Larvae among Gynogenetic Brown Trout (*Salmo trutta* m. fario) Doubled Haploids. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.
- JENNER, R. A.; WILLS, M. A. The choice of model organisms in evo–devo. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 4, p. 311–314, 2007.

- KAUSE, A.; RITOLA, O.; PAANANEN, T.; WAHLROOS, H.; MANTYSAARI, E. A. Genetic trends in growth, sexual maturity and skeletal deformations, and rate of inbreeding in a breeding programme for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 247, n. 1–4, p. 177–187, jun. 2005.
- KAVALCO, K. F.; MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetical analysis in four species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) from Paraíba do Sul River Basin. **Caryologia**, v. 56, n. 4, p. 453–461, 2003.
- KAYIM, M.; CAN, E.; GUNER, Y. Is it Possible to Transform Hatchery-Reared Abnormal Juveniles of Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L. 1758) into Normal Individuals? **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 5, n. 5, p. 327–338, 1 maio 2010.
- KELLER, L. F.; WALLER, D. M. Inbreeding effects in wild populations. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 17, n. 5, p. 230–241, 2002.
- KIHARA, M.; OGATA, S.; KAWANO, N. KUBOTA, I.; YAMAGUCHI, R. Lordosis induction in juvenile red sea bream, *Pagrus major*, by high swimming activity. **Aquaculture**, v. 212, n. 1–4, p. 149–158, set. 2002.
- KINCAID, H. L. Inbreeding in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v. 33, n. 11, p. 2420–2426, 1976.
- KLINGERBERG, C. P. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, n. 2, p. 353–357, 2011.
- KOVALSYKI, B. **Zoneamento de risco de incêndios florestais para o Parque Estadual de Vila Velha e seu entorno**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil, 2016.
- KVELLESTAD, A.; HOIE, S.; THORUD, K.; TORUD, B.; LYNGOY, A. Platyspondyly and shortness of vertebral column in farmed Atlantic salmon *Salmo salar* in Norway-description and interpretation of pathologic changes. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 39, p. 97–108, 2000.
- LACY, R. C.; PETRIC, A.; WARNEKE, M. Inbreeding and outbreeding in captive populations of wild animals. In: THORNHILL, N. W. (ed) **The Natural History of Inbreeding and Outbreeding: Theoretical and Empirical Perspectives**, pp. 352–374. University of Chicago Press, Chicago, 1993.
- LE CREN, E. D. The length-weight relationship and seasonal cycle in gonadal weight condition in the perch *Perca fluviatilis*. **Journal of Animal Ecology**, v. 20, n. 2, p. 201–19, 1951.

LEMOS, J. R. G.; TAVARES-DIAS, M.; SALES, R. S. A.; NOBRE FILHO, G. R.; FIM, J. D. I. Parasitos nas brânquias de *Brycon amazonicus* (Characidae, Bryconinae) cultivados em canais de igarapé do Turumã-Mirim, estado do Amazonas, Brasil. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 29, n. 2, p. 217-222, 2007.

LETENSKI, R.; MELO, M. S. de.; GUIMARÃES, G. B.; PIEKARZ, G. F. Geoturismo no Parque Estadual de Vila Velha: nas trilhas da dissolução. In: CARPANEZZI, O. T. B.; CAMPOS, J. B. (org). **Coletânea de Pesquisas: Parques Estaduais de Vila Velha, Cerrado e Guartelá**. Curitiba, Instituto Ambiental do Paraná, v.1, 2011.

LÉVÊQUE, C.; OBERDORFF, T.; PAUGY, D.; STIASSNY, M. L. J.; TEDESCO, P. A. Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. Freshwater Animal Diversity Assessment, **Hydrobiologia**, v. 595, p. 545-567, 2008.

LIMA, F. C. T.; MALABARBA, L. R.; BUCKUP, P. A.; SILVA, J. F. P.; HAROLD, A.; BENINE, R.; OYKAWA, O.; PAVANELLI, C. S.; MENEZES, N. A.; LUCENA, C. A. S.; MALABARBA, M. C. S. L.; LUCENA, Z. M. S.; REIS, R. E.; LANGEANI, F.; CASATTI, L.; BERTACO, V. A.; MOREIRA, C.; LUCINDA P. H. F. Genera *Incertae Sedis* in Characidae. In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. **Checklist of the freshwater fishes of South and Central America** (CLOFFSCA), Porto Alegre: EDIPUCRS, p. 106-169, 2003.

LIMA-JUNIOR, S. E.; CARDONE, I. B.; GOITEIN, R. Determination of a method for calculation of Allometric Condition Factor of fish. **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 2, p. 397- 400, 2002.

LONGWELL, A. C.; CHANG, S.; HEBERT, A.; HUGHES, J. B.; PERRY, D. Pollution and developmental abnormalities of Atlantic fishes. **Environmental Biology of Fishes**, v. 35, n. 1, p. 1–21, 1992.

LOSDAT, S.; CHANG, S. M.; REID, J. M. Inbreeding depression in male gametic performance. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 27, n. 6, p. 992–1011, 2014.

LOWE-McCONNEL, R. H. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. São Paulo, Edusp, 1999, 534 p.

MADSEN, L.; ARNBJERG, J.; DALSGAARD, I. Radiological examination of the spinal column in farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): experiments with *Flavobacterium psychrophilum* and oxytetracycline. **Aquaculture Research**, v. 32, n. 3, p. 235–241, mar. 2001.

MARIETTE, M.; KELLEY, J. L.; BROOKS, R.; EVANS, J. P. The Effects of Inbreeding on Male Courtship Behaviour and Coloration in Guppies. **Ethology**, v. 112, p. 807-814, 2006.

- MATOSO, D. A.; ARTONI, R.F.; GALLETTI JR, P. M. Genetic Diversity of the Small Characid Fish *Astyanax* sp., and its Significance for Conservation. **Hydrobiologia**, v. 527, p. 223-225, 2004.
- MATOSO, D. A.; MARTINS, C.; ARTONI, R. F.; GALETTI JR, P. M. Preliminary qualitative analysis on mtDNA in *Astyanax fasciatus* populations Cuvier, 1819 (Teleostei; Characidae) indicate population distinctiveness. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, n. 3, p. 663-667, 2010.
- MATOSO, D. A.; SILVA, M. DA.; ARTONI, R. F.; TORRES, R. A. Molecular taxonomy and evolutionary hypothesis concerning *Astyanax fasciatus* (Characiformes, Characidae) from Vila Velha State Park and Tibagi and Iguaçu Rivers. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 1, p. 631–638, 2013.
- MATOSO, D. A.; VICARI, M. R.; ALMEIDA, M. C.; SHIBATTA, O. A.; MOREIRA-FILHO, O. BERTOLLO, L. A. C.; ARTONI, R. F. Karyotypic Studies in the Characidae Fish, Genus *Astyanax*. An Endemic and Highly Isolated Population of *Astyanax* sp. **Cytologia - CYTOLOGIA TOKYO**, v. 67, p. 123-128, 2002.
- MATTEI, X.; SIAU, Y.; THIAW, O. T.; THAIN, D. Peculiarities in the organization of testis *Ophidion* sp. (Pisces Teleosts). Evidence for two types of spermatogenesis in teleost fish. **Journal of Fish Biololy**, v. 43, p. 931-937, 1993.
- MELO, F. A. G. de. **Revisão taxonômica do complexo de espécies *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819) (Teleostei, Characiformes, Characidae)**. Tese (Doutorado em Zoologia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.
- MELO, M. S. de.; GIANNINI, P. C. F. Sandstone dissolution landforms in the furnas formation, southern Brazil. Earth Surf. Process. **Landforms**, v. 32, n. 14, p. 2149-2164, 2007.
- MELO, M. S. de.; GODOY, L. C.; MENEGUZZO, P. M.; SILVA, D. J. P. da. A Geologia no Plano de Manejo do Parque Estadual de Vila Velha, PR. In: CARPANEZZI, O. T. B.; CAMPOS, J. B. (org). **Coletânea de Pesquisas: Parques Estaduais de Vila Velha, Cerrado e Guartelá**. Curitiba, Instituto Ambiental do Paraná, v.1, 2011.
- MELO, M. S.; GUIMARÃES, G. B.; PONTES, H. S.; MASSUQUETO, L. L.; FIGURIM, I.; BAGATIM, H. Q.; GIANNINI, P. C. F. Carste em rochas não-carbonáticas: o exemplo dos arenitos da Formação Furnas, Campos Gerais do Paraná/Brasil e as implicações para a região. **Espeleo-Tema**, v. 22, n. 1, p. 81-97, 2011.
- MIRANDE, J. M. Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. **Neotropical Ichthyology**, v. 8, n. 3, p. 385-568, 2010.
- MISE, F. T.; TENCATT, L.; SANTOS, B. F. DOS. Record of morphological deformities in *Corydoras* aff. *longipinnis* in two reservoirs under urban influence in Upper Iguaçu and Southern Coastal basins in Paraná State, Brazil. **Biota Neotropica**, v. 17, n. 1, 2017.

MOREIRA, C. R. **Relações filogenéticas na Ordem Characiformes (Teleostei: Ostariophysi)**. Tese (Doutorado em Genética) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

MORELLI, S.; BERTOLLO, L.; FORESTI, F.; Fº, O.; TOLEDO, S. Cytogenetic considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). I Karyotypic variability. **Caryologia**, v. 36, n. 3, p. 235-244, 1983.

NASCIMENTO, W. S.; YAMAMOTO, M. E.; CHELLAPPA, S. Proporção sexual e relação peso-comprimento do peixe anual *Hypsylebichthys antenori* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) de poças temporárias da região semiárida do Brasil. **Biota Amazônia**, v. 2, p.37-44, 2012.

NELSON, J. S. 2006. **Fishes of the World**. John Wiley and Sons, New York., 2006, 601 p.

NIKOLSKY, G.V. **Theory of fish population dynamics**. Edinburgh, Oliver and Boyd, 1969, 323 p.

OLIVEIRA, C.; AVELINO, G. S.; ABEL, K. T.; MARIGUELA, T. C.; BENINE, R. C.; ORTI, G.; VARI, R. P.; CORRÊA-CASTRO, R. M. Phylogenetic relationships within the speciose Family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive in group sampling. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, n. 275, 2011.

ORNELAS-GARCIA, C. P.; DOMÍNGUEZ-DOMÍNGUEZ, O.; DOADRIO, I. Evolutionary history of the fish genus *Astyanax* Baird & Girard (1854) (Actinopterygii, Characidae) in Mesoamerica reveals multiple morphological homoplasies. **BMC Evolutionary Biology**, v. 8, n. 340, 2008.

ØRSTED, M.; HOFFMANN, A. A.; SVERRISDÓTTIR, E.; NIELSEN, K. L.; KRISTENSEN, T. N. Genomic variation predicts adaptive evolutionary responses better than population bottleneck history. **PLOS Genetics**, v.15, 2019.

PASA, R.; MENEGIDIO, F. B.; RODRIGUES-OLIVEIRA, I. H.; SILVA, I. B.; CAMPOS, M. L.; ROCHA-REIS, D. A.; SEYMOUR, J.; SCHWARZACHER, T.; KAVALCO, K. F. Ten complete mitochondrial genomes of Gymnocharacini (Stethaprioninae, Characiformes): evolutionary relationships and a repetitive element in the Control Region (D-loop), **Front. Ecol. Evol**, 2021.

PAZZA, R.; KAVALCO, K. F.; BERTOLLO, L. A. C. Chromosomal polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). Karyotype analysis Ag-NOR and mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in sympatric karyotypes and their possible hybrid forma. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 112, p. 313-319, 2006.

PERAZZO, G. X.; CORRÊA, F.; CALVIÑO, P.; ALONSO, F.; SALZBURGER, W.; GAVA, A. Shape and size variation of *Jenynsia lineata* (Jenyns 1842) (Cyprinodontiformes: Anablepidae) from different coastal environments. **Hydrobiologia**, v. 828, p. 21-39, 2019.

- PEREIRA-SANTOS, M. **Aspectos reprodutivos, morfologia dos gametas e desenvolvimento embrionário de *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski (Teleostei, Characidae)**. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2014.
- PIMENTEL, M. S.; FALEIRO, F.; DIONÍSIO, G.; REPOLHO, T.; FERREIRA-POUSÃO, P.; MACHADO, J.; ROSA, R. Defective skeletogenesis and oversized otoliths in fish early stages in a changing ocean. **Journal of Experimental Biology**, v. 217, n. 12, p. 2062–2070, 2014.
- PONTON, D. Is geometric morphometrics efficient for comparing otolith shape of different fish species? **Journal of Morphology**, v. 267, n. 6, p. 750-757, 2006.
- PORTELLA, A. C.; ARSENTALES, A. D.; CAVALLARI, D. E.; WELBER, S. S. Efeito da sazonalidade na reprodução de peixes Characiformes em um rio Neotropical. **Iheringia Série Zoologia**, 2021.
- PRADO, P. S.; SOUZA, C. C.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E. Reproductive disruption in lambari *Astyanax fasciatus* from a Southeastern Brazilian reservoir. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 1879–1887, 2011.
- PUSEY, A.; WOLF, M. Inbreeding avoidance in animals. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 11, n. 5, p. 201-206, 1996.
- QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; WILDNER, D. D.; ISHIBA, R. Gametogênese de peixes: aspectos relevantes para o manejo reprodutivo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, n. 2, p. 181-191, 2013.
- READING, B. J.; SULLIVAN, C. V. The reproductive organs and processes: vitellogenesis in Fishes. **Encyclopedia of Fish Physiology**, p. 635–646, 2011.
- RÊGO, A. C. L.; PINESE, O. P.; MAGALHÃES, P. A.; PINESE, J. F. Relação peso-comprimento para *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) e *Leporinus friderici* (Bloch, 1794) (Characiformes) no reservatório de Nova Ponte – EPDA de Galheiro, rio Araguari, MG. **Revista Brasileira de Zootecias**, v. 10, n. 1, p. 13-21, 2008.
- REIS, R. E., KULLANDER, S. O., FERRARIS, C. **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America** (CLOFFSCA), Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003, 729 p.
- REYES CORRAL, W. D.; AGUIRRE, W. E. Effects of temperature and water turbulence on vertebral number and body shape in *Astyanax mexicanus* (Teleostei: Characidae). **PLOS ONE**, v. 14, n. 7, p. e0219677, 29 jul. 2019.
- RIFFEL, S. B.; VASCONCELOS, P. M.; CARMO, I. O.; FARLEY, K. A. Combined $^{40}\text{Ar}/^{39}\text{Ar}$ and (U–Th)/He geochronological constraints on long-term landscape evolution of

the Second Paraná Plateau and its ruiniform surface features, Paraná, Brazil. **Geomorphology**, v. 233, p. 52–63, 2015.

RIZZO, E.; SATO, Y.; BARRETO, B. P.; GODINHO, H. O. Adhesiveness and surface patterns of eggs in neotropical freshwater teleosts. **Journal of Fish Biology**, v. 61, n. 3, p. 615–632, 2002.

ROHLF, F. J. **TpsDig2**. New York Department of Ecology and Evolution, State University of New York, 2019. Disponível em: <<https://life.bio.sunysb.edu/morph/index.html>>.

SABORIDO-REY, F.; KJESBU, O. S. **Growth and maturation dynamics**. In ‘Fisheries-Induced Adaptive Changes’. DIECKMANN, U.; GODØ, O. R.; HEINO, M.; MORK, M. (ed.) pp. 501–516. (Cambridge University Press: Cambridge, UK.), 2005.

SANTOS, H. S. L. dos. **Histologia de peixes**. Jaboticabal: Funep, 1995, 153 p.

SATAKE, F.; ISHIKAWA, M. M.; HISANO, H.; PÁDUA, S. B.; TAVARES-DIAS, M. Relação peso-comprimento, fator de condição e parâmetros hematológicos de dourado *Salminus brasiliensis* cultivado em condições experimentais. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, v. 51, p. 1-22, 2009.

SCHMITTER-SOTO, J. J. A revision of *Astyanax* (Characiformes: Characidae) in Central and North America, with the description of nine new species, **Journal of Natural History**, v. 51, n. 4, p. 1-94, 2017.

SCHULZ, R. W.; DE FRANÇA, L. R.; LAREYRE, J.J.; LEGAC, F.; CHIARINI-GARCIA, H.; NOBREGA, R. H.; MIURA, T. Spermatogenesis in fish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, n. 3, p. 390–411, 2010.

SHIBATTA, O. A.; ARTONI, R. F. Sobre a identidade das populações alopátricas de *Astyanax* (Characiformes, Characidae) das formações Furna 1 e Furna 2 do Parque Estadual de Vila Velha, Ponta Grossa, Paraná, Brasil. **Publication UEPG: Biological and Health Science**, v. 11, n. 2, 2005.

SHIRAK, A.; PALT, Y.; CNAANI, A.; KOROL, A.; HULATA, G.; RON, M.; AVTALION, R. R. Association Between Loci With Deleterious Alleles and Distorted Sex Ratios in an Inbred Line of Tilapia (*Oreochromis aureus*). **Journal of Heredity**, v. 93, n. 4, p. 270–276, 2002.

SILVA, M. A.; PERAZZO, G. X.; KAVALCO, K. F.; PASA, R. Shape diversity of the fish genus *Astyanax* Baird & Girard, 1854 (Teleostei, Characidae) in adjacent basins. **Biologia**, 2020.

SILVA, Z. C. L. **Relação peso-comprimento e fator de condição para *Nannostomus digrammus* e *Nannostomus marginatus* (Characiformes, Lebiasinidae) no Igarapé Do Campus Cauamé Da Universidade Federal De Roraima.** Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Zootecnia) - Universidade Federal de Roraima, Roraima, 2011.

SILVEIRA, E. L.; ARANHA, J. M. R.; MENEZES, M. S.; VAZ-DOS -SANTOS, A. M. Reproductive dynamics, age and growth of *Astyanax* aff. *fasciatus* in a Neotropical basin. **Marine and Freshwater Research**, 2019.

SLOOFF, W. Skeletal anomalies in fish from polluted surface waters. **Aquatic Toxicology**, v. 2, n. 3, p. 157-173, 1982.

SOUZA-MICHELS, M. A.; HACKRADT, C. W.; METRI, R.; ARTONI, R. F.; SENE-SILVA, G. A ictiofauna das lagoas adjacentes a Lagoa Dourada e Tarumã no Parque Estadual de Vila Velha, Ponta Grossa, Paraná. In: CARPANEZZI, O. T. B.; CAMPOS, J. B. (org). **Coletânea de Pesquisas: Parques Estaduais de Vila Velha, Cerrado e Guartelá.** Curitiba, Instituto Ambiental do Paraná, v. 1, 2011.

TERÁN, G. E.; BENITEZ, M. F.; MIRANDE, J. M. Opening the Trojan horse: Phylogeny of *Astyanax*, two new genera and resurrection of *Psilododon* (Teleostei: Characidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 190, n. 4, p. 1217–1234, 2020.

TIIRA, K.; PIIRONEN, J., PRIMMER, C. R. Evidence for reduced genetic variation in severely deformed juvenile salmonids. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 63, p. 2700–2707, 2006.

TOFTEN, H.; JOBLING, M. Development of spinal deformities in Atlantic salmon and Arctic charr fed diets supplemented with oxytetracycline. **Journal of Fish Biology**, v. 49, p. 668-677, 1996.

VAZZOLER, A. E. A. M. **Biologia da reprodução de peixes telósteos: teoria e prática.** Maringá: Eduem, 1996, 169 p.

VAZZOLER, A. E. A. M.; MENEZES, N. A. Síntese de conhecimentos sobre o comportamento dos Characiformes da América do Sul (Teleostei, Ostariophysi). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 52, p. 627-640, 1992.

VAZZOLER, A. E. A. M.; SUZUKI, H. I.; MARQUES, I. E.; LIZAMA, M. A. P. Primeira maturação gonadal, períodos e áreas de reprodução. In: VAZZOLER, A. E. A. M.; VEREGUE, A. M. L.; ORSI, M. L. Biologia reprodutiva de *Astyanax scabripinnis paranae* (Eigenmann) (Osteichthyes, Characidae) do riacho Marrecas da bacia do Tibagi, Paraná. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 20, p. 97-105, 2003.

WADDELL, J. C., NJERU, S. M., AKHIYAT, Y. M., SCHACHNER, B. I., CORREA ROLDÁN, E. V., CRAMPTON, W. G. R. Reproductive life-history strategies in a species rich assemblage of Amazonian electric fishes. **PLOS ONE**, v. 14, n. 12, 2019

WARD, A. B.; BRAINERD, E. L. Evolution of axial patterning in elongate fishes. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 90, n. 1, p. 97–116, jan. 2007.

WELLS, D. E.; COWAN, A. A. Vertebral dysplasia in salmonids caused by the herbicide trifluralin. **Environmental Pollution. Series A, Ecological and Biological**, v. 29, n. 4, p. 249-260, 1982.

WINEMILLER, K.O. Patterns of variation in life history among South American fishes in seasonal environments. **Oecologia**, v. 81, p. 225-241, 1989.

WITTEN, P. E.; OBACH, A.; HUYSEUNE, A.; BAEVERFJORD, G. Vertebrae fusion in Atlantic salmon (*Salmo salar*): Development, aggravation and pathways of containment. **Aquaculture**, v. 258, n. 1–4, p. 164–172, ago. 2006.

YAMADA, F. H.; TAKEMOTO, R. M.; PAVANELLI, G. C. Relação entre fator de condição relativo (Kn) e abundância de ectoparasitos de brânquias, em duas espécies de ciclídeos da bacia do rio Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum: Biological Sciences**, v. 30, n. 2, p. 213-217, 2008.

YTTEBORG, E.; BAEVERFJORD, G.; TORGENSEN, J.; HJELDE, K.; TAKLE, H. Molecular pathology of vertebral deformities in hyperthermic Atlantic salmon (*Salmo salar*). **BMC Physiol**, v. 10, n. 12, 2010.

ZAJITSCHK, S. R. K.; LINDHOLM, A. K.; EVANS, J. P.; BROOKS, R. C. Experimental evidence that high levels of inbreeding depress sperm competitiveness. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 22, p. 1338- 1345, 2009.

ZELDITCH, M. L.; SWIDERSKI, D. L.; SHEETS, H. D.; FINK, W. L. **Geometrics morphometrics for biologists: a primer**. Elsevier, San Diego, 2004.

ZHANG, J.; ZUO, Z.; SUN, P.; WANG, H.; YU, A.; WANG, C. Tributyltin exposure results in craniofacial cartilage defects in rockfish (*Sebastes marmoratus*) embryos. **Marine Environment Research**, v. 77, p. 6–11, 2012.

ANEXOS

ANEXO A – Caracterização estádios de desenvolvimento gonadal

Características microscópicas utilizadas na determinação dos estádios de desenvolvimento gonadal de *Psalidodon aff. fasciatus*.

ESTÁDIOS	OVÁRIOS	TESTÍCULOS
I - Repouso	Presença de oócitos perinucleolares iniciais e avançados.	Túbulos seminíferos com somente espermatogônias e lúmen ocluído.
II - Maduro Inicial	Presença de oócitos perinucleolares e pré-vitelogênicos.	Túbulos seminíferos com cistos de células espermatogênicas e poucos espermatozoides dentro do lúmen.
III - Maduro	Presença de oócitos perinucleolares, pré-vitelogênicos e vitelogênicos.	Túbulos seminíferos com alguns cistos de células espermatogênicas e lúmen cheio de espermatozoides embutidos na secreção de acidófilos.
IV - Parcialmente Vazio	Presença de oócitos perinucleolares, pré-vitelogênicos, vitelogênicos e folículos pós-ovulatórios.	Túbulos seminíferos parcialmente vazios, poucos cistos de espermatócitos e espermatozoides.
V - Totalmente Vazio	Presença de oócitos perinucleares, folículos pós-ovulatórios e atrésicos.	Túbulos seminíferos contendo espermatogônias e lúmen vazio ou somente espermatozoides residuais.

Fonte: Adaptado de CARVALHO et al. (2009)

ANEXO B – Autorização Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (CEUA parecer N.º. 2018-025/2018)

17/08/2018

SEI/UTFPR - 0388001 - Parecer



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS



PARECER: 2018-025/2018 - CEUA
PROCESSO Nº: 23064.022649/2018-70
INTERESSADO: IGOR DE PAIVA AFFONSO

PROJETO DE PESQUISA / AULA PRÁTICA

Título:	Estudos ecológicos integrados: desvendando a especiação em populações selvagens
Área Temática:	Ciências Biológicas/Ecologia/Evolução
Pesquisador / Professor:	Igor de Paiva Affonso
Instituição:	UTFPR/ Câmpus Ponta Grossa
Financiamento:	Não há
Versão:	02

PARECER CONSUBSTANCIADO DA CEUA	Protocolo nº 2018-25
Apresentação do Projeto: Esta proposta é apresentada como uma pesquisa internacional e interdisciplinar que incorpora algumas das maiores questões em biologia, como por exemplo, causas da diversidade biológica, e mescla pesquisa e educação de forma a realizar significativamente tanto os propósitos científicos quanto os profissionais e objetivos educacionais da sociedade. A partir desta proposta principal, o proponente pretende desenvolver vários projetos para incluir acadêmicos multiníveis nesta pesquisa e realizar uma meta recente da UTFPR, visando internacionalização. O principal objetivo deste projeto compreende investigações de campo e de laboratório que usarão populações isoladas e não isoladas de peixes como um modelo para fornecer novos insights sobre as abordagens que quantitativamente integram a variação ecológica, genética e fenotípica com isolamento reprodutivo subjacente à especiação. Em suma, esta proposta de pesquisa é projetada para entender os mecanismos multivariados de especiação na natureza. Justificativa/Relevância: A pesquisa ocorrerá no Parque Estadual Vila Velha (PEVV), U.C. localizada no rio Tibagi. O proponente pretende elucidar a isolamento reprodutivo para evolução estudando populações de peixes (<i>A. fasciatus</i>) em três furnas – que caracterizam-se como buracos naturais com até 50 metros de profundidade que podem ou não abrigar lagos no interior. O proponente relata que não há conectividade com grandes massas de água, mas ocorre fluxos de água entre os poros. Também destaca que <i>A. fasciatus</i> são as únicas espécies que vivem nesses ambientes. Há um lago mais raso, chamado "Lago Dourado" que também será usado no estudo. Objetivo: O projeto pretende realizar quatro objetivos e uma parte relacionada com extensão com a finalidade de promover a interdisciplinaridade. São os seguintes objetivos: (1) Investigar como a seleção divergente moldou o comportamento anti-predador em populações isoladas e não-isoladas. Vai usar peixes como modelo. (2) Investigar a relação entre variação ambiental e morfométrica (fenotípica) e entre populações isoladas e não isoladas de <i>Astyanax fasciatus</i> para compreender diversificações adaptativas e examinar efeitos na reprodução. (3) Investigar como a seleção divergente molda as interações parasita-hospedeiro em populações isoladas e não-isoladas populações. (4). Quantificar a variação genômica dentro e entre populações isoladas e não isoladas para entender a estrutura genética da população e testar os efeitos hipotéticos da deriva, fluxo gênico e seleção genômica no isolamento da reprodução e investigar o isolamento reprodutivo para entender suas contribuições relativas na especiação. Avaliação dos Riscos e Benefícios: O proponente afirma que os principais riscos estão relacionados com organismos amostrais, devido o ambiente que os peixes habitam, ou seja, as os furnas - ambientes profundos e inóspitos, que pode ser difícil amostrar. O proponente afirma que pretende solicitar apoio à brigada de bombeiros de Ponta Grossa durante as expedições de campo. Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: A pesquisa é pertinente e de caráter complexo. Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Foram apresentados os seguintes termos e documentos: 1) Requerimento preenchido completamente e assinado pelo pesquisador responsável pelo projeto/aula prática; 2) formulário unificado de encaminhamento do CEUA/UTFPR/DV; 3) projeto de pesquisa completo no modelo da PROPPG-CEUA; 4) declaração de não início do projeto (com assinatura e data). 5) registro de projeto junto a Diretoria responsável (anuência da DIRPPG) 6) Cópia da autorização de coleta/transporte do SISBIO, no caso de animais silvestres (Em nome de Roberto F. Artoni). Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Não há. Situação do Parecer: APROVADO Considerações Finais a Critério da CEUA: Todos os procedimentos devem seguir a Lei n.º 11.794 de 8 de outubro de 2008.	

17/08/2018

SEI/UTFPR - 0388001 - Parecer

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Estudos ecológicos integrados: desvendando a especiação em populações selvagens", protocolo nº 2018/25, sob a responsabilidade de IGOR DE PAIVA AFFONSO - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UTFPR) da UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ, em reunião de 14/08/2018.

CERTIFICATION

The Ethics Commission on Animal Use (CEUA) of Federal University of Technology – Paraná (UTFPR), CERTIFIES that the request herein identified by the protocol number 2018/25, entitled "Integrated Ecological research: unraveling speciation in wild populations" coordinated and under the responsibility of IGOR DE PAIVA AFFONSO, which involves the production, maintenance and / or use of animals belonging to the phylum Chordata, sub-phylum Vertebrata (except human species), for the purposes of scientific research (or teaching), is in accordance with provisions of the Brazilian Law no. 11794 (October 8th, 2008), the Decree nº 6.899 (July 15th, 2009) and with further regulations published by the Brazilian National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA).

Nº da Solicitação ou Autorização SISBIO:	15115-1
Vigência do projeto:	24/08/2018 - 20/07/2023
Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Atividades:	(X) Captura (X) Coleta de espécimes () Marcação Outras:
Espécies/Grupos Taxonômicos	<i>Astyanax fasciatus</i> (300 indivíduos)
Peso/Idade:	N/A
Local(is) de realização das atividades	Bacia do rio Tibagi

Dois Vizinhos, 17 de agosto de 2018.

Assinado por:

Nédia de Castilhos Ghisi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná



Documento assinado eletronicamente por NÉDIA DE CASTILHOS GHISI, PRESIDENTE DA COMISSÃO, em 17/08/2018, às 03:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.utfpr.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 0388001 e o código CRC 56919FAA.

Referência: Processo nº 23064.022649/2018-70

SEI nº 0388001

ANEXO C Autorização de coleta: Ministério do Meio Ambiente (MMA / ICMbio nº 15115-1) e Instituto Ambiental do Paraná (IAP nº 15.190.528-5; Autorização 15.18)



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 15115-1		Data da Emissão: 02/04/2008 10:47
Dados do titular		
Registro no Ibama: 550248	Nome: Roberto Ferreira Artoni	CPF: 138.549.798-00
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA		CNPJ: 80.257.355/0001-08

Observações, ressalvas e condicionantes

1	A participação de pesquisador(a) estrangeiro(a) nas atividades previstas nesta autorização depende de autorização expedida pelo Ministério de Ciência e Tecnologia (CNPq/MCT).
2	A licença permanente não é válida para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) manutenção de espécimes de fauna silvestre em cativeiro; c) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e d) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna. A restrição prevista no item d não se aplica às categorias Reserva Particular do Patrimônio Natural, Área de Relevante Interesse Ecológico e Área de Proteção Ambiental constituídas por terras privadas.
3	O pesquisador titular da licença permanente, quando acompanhado, deverá registrar a expedição de campo no Sisbio e informar o nome e CPF dos membros da sua equipe, bem como dados da expedição, que constarão no comprovante de registro de expedição para eventual apresentação à fiscalização.
4	Esta licença permanente não exime o seu titular da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
5	Esta licença permanente não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos.
6	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular da necessidade de atender ao disposto na Instrução Normativa Ibama nº 27/2002, que regulamenta o Sistema Nacional de Anilhamento de Aves Silvestres.
7	O pesquisador titular da licença permanente será responsável pelos atos dos membros da equipe (quando for o caso).
8	O órgão gestor de unidade de conservação estadual, distrital ou municipal poderá, a despeito da licença permanente e das autorizações concedidas pelo Ibama, estabelecer outras condições para a realização de pesquisa nessas unidades de conservação.
9	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
10	O titular da licença permanente deverá apresentar, anualmente, relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias após o aniversário de emissão da licença permanente.
11	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo Ibama e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
12	A licença permanente será válida enquanto durar o vínculo empregatício do pesquisador com a instituição científica a qual ele estava vinculado por ocasião da solicitação.
13	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
14	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	ORDEM	Characiformes, Gymnotiformes, Tetraodontiformes, Siluriformes, Synbranchiformes, Perciformes
2		

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA	Laboratório de Citogenética e Evolução

Este documento (Licença permanente para coleta de material zoológico) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 85979796



Página 1/2



Ministério do Meio Ambiente - MMA

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Licença permanente para coleta de material zoológico

Número: 15115-1		Data da Emissão: 02/04/2008 10:47
Dados do titular		
Registro no Ibama: 550248	Nome: Roberto Ferreira Artoni	CPF: 138.549.798-00
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA		CNPJ: 80.257.355/0001-08

Anexo para registrar Coletas Imprevistas de Material Biológico

De acordo com a Instrução Normativa Ibama nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Nível	Táxon*	Qtde.	Amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico mais específico possível.

Este documento (Licença permanente para coleta de material zoológico) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 85979796

Página 2/2



RENOVAÇÃO DE PESQUISA EM UNIDADE DE CONSERVAÇÃO DO PARANÁ

Número da autorização: 15.18 Data de Emissão: 21.05.2019
Protocolo: 15.190.528-5

Dados do Pesquisador e da Pesquisa

Nome: Roberto Ferreira Artoni
RG: 18.807.277-9 CPF: 138.549.798-00
Título do Projeto: Ecologia Integradora em *Astyanax aff. fasciatus* das Furnas do Parque Estadual de Vila Velha, Paraná, Brasil.

Cronograma de Coletas:

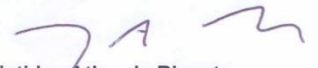
Unidade de Conservação:
Parque Estadual de Vila Velha

Equipe de Trabalho:

Igor de Paiva Affonso	RG: 7454586	CPF: 037.042.399-25
Letícia Cucolo Karling	RG: 97544506	CPF: 064.322.799-76
Raul Rennó Braga	RG: 7298498-6	CPF: 061.803.779-95
Luz Elena de La Ossa Guerra	RG: G0659801-M	CPF: 014.039.629-28
Bruna Angelina Mayer	RG: 12899416-5	CPF: 089.723.849-41
Miguel Ailton Carvalho	RG: 43055658	CPF: 559.697.479-04
Fernanda Biscaino Saluceste	RG: 470533122	CPF: 458.577.648-66
Bruno Henrique Semczeszm	RG: 124453496	CPF: 109.188.479-07

Observações:

1. Não é permitida a coleta de espécies ameaçadas ou em risco de extinção;
2. As gerências da(s) UC(s) devem ser comunicadas com antecedência sobre os trabalhos em campo a serem realizados na Unidade;
3. Esta autorização tem validade até 21.05.2020 podendo ser renovada no final do período.
4. Esta autorização não dá o direito do uso das imagens oriundas desse trabalho.
5. O pesquisador titular fica inteiramente responsável por qualquer integrante da sua equipe de trabalho, sendo ele brasileiro ou estrangeiro.


Aristides Athayde Bisneto
Diretor de Biodiversidade e Áreas Protegidas – DIBAP
Curitiba, 21 de maio de 2019.

ANEXO D – Protocolo de Histologia

O processo de preparação para inclusão:

1- Desidratação

- Álcool a 70% por 1h30
- Álcool a 80% por 1h30
- Álcool a 96% por 1h30
- Álcool (I) a 100% por 1h00
- Álcool (II) a 100% por 1h00
- Álcool (III) a 100% por 1h00

2- Diafanização

- Xilol (I) por 1h30
- Xilol (II) por 1h30

3- Impregnação

- Parafina (I) por 2h00
- Parafina (II) por 2h00

O processo de coloração:

1- Desparafinização

- Xilol (I) - 10 minutos
- Xilol (II) - 10 minutos

2- Hidratação

- Álcool absoluto - pôr e tirar
- Álcool 90% - pôr e tirar
- Álcool 70% - pôr e tirar
- Álcool 50% - pôr e tirar
- Água de torneira - 2 trocas
- Água destilada - 2 trocas

3- Coloração:

- Corar com Hematoxilina de Mayer - 15 minutos
- Lavar em água da torneira
- Diferenciação com água corrente da torneira - 15 minutos
- Álcool 80% - 2 minutos
- Corar com Eosina-Floxina - 5 minutos

4- Desidratação

- Álcool absoluto I - pôr e tirar
- Álcool absoluto II - pôr e tirar
- Álcool absoluto III - pôr e tirar
- Diafanizar em xilol - 3 minutos
- Xilol (para montagem) - 3 minutos