

JÚLIO CÉSAR DE OLIVEIRA SANTANA

**“RELAÇÕES SUPRAFAMILIARES EM
ERYTHRINOIDEA (TELEOSTEI:
CHARACIFORMES) COM BASE EM CARACTERES
MOLECULARES E DA MORFOLOGIA DAS
CÉLULAS ESPERMÁTICAS”**

**“SUPRAFAMILIAL RELATIONSHIPS OF THE
ERYTHRINOIDEA (TELEOSTEI:
CHARACIFORMES) BASED ON MOLECULAR AND
SPERMATIC CELL DATA”**

Campinas, 2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA



JÚLIO CÉSAR DE OLIVEIRA SANTANA

**"Relações suprafamiliares em Erythrinioidea (Teleostei:
Characiformes) com base em caracteres moleculares e da
morfologia das células espermáticas"**

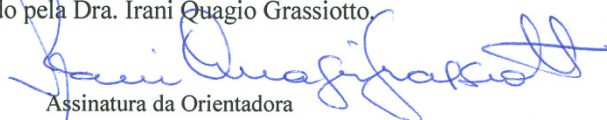
Orientadora: Dra. Irani Quagio Grassiotto
Coorientadora: Dra. Daniela Calcagnotto

**"Suprafamilial relationships of the Erythrinioidea (Teleostei:
Characiformes) based on molecular and spermatic cell data"**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor em Biologia Celular e Estrutural, na área de Biologia Celular.

Doctorate thesis presented to the State University of Campinas in fulfillment of the requirements for the degree of Doctor on Cellular and Structural Biology Postgraduate Programme, in the Biology Institute, in the area of Cellular Biology.

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida pelo aluno **Júlio César de Oliveira Santana** e orientado pela Dra. Irani Quagio Grassiotto.



Assinatura da Orientadora

Campinas, 2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

Santana, Júlio César de Oliveira, 1985-
Sa59r Relações suprafamiliares em Erythrinioidea (Teleostei: Characiformes) com base em caracteres moleculares e da morfologia das células espermáticas / Júlio César de Oliveira Santana. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Irani Quagio Grassiotto.
Coorientador: Daniela Calcagnotto.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Filogenia. 2. Ultraestrutura (Biologia). 3. Espermatozoides. 4. Espermio gênese. 5. Characiformes - Aspectos moleculares. I. Quagio-Grassiotto, Irani. II. Calcagnotto, Daniela. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Suprafamilial relationships of the Erythrinioidea (Teleostei: Characiformes) based on molecular and spermatogenic cell data

Palavras-chave em inglês:

Phylogeny

Ultrastructure (Biology)

Spermatozoa

Spermiogenesis

Characiformes - Molecular aspects

Área de concentração: Biologia Celular

Titulação: Doutor em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Irani Quagio Grassiotto [Orientador]

Mônica de Toledo Piza Ragazzo

Flávio César Thadeo de Lima

Luciana Bolsoni Lourenço Morandini

Luiz Roberto Malabarba

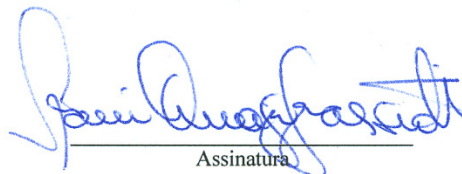
Data de defesa: 27-06-2014

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 27 de junho de 2014

BANCA EXAMINADORA

Dra. Irani Quagio Grassiotto (Orientadora)



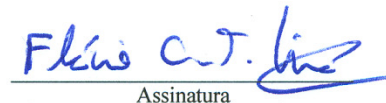
Assinatura

Dra. Mônica de Toledo Piza Ragazzo



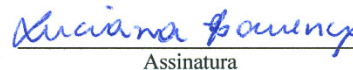
Assinatura

Dr. Flávio César Thadeo de Lima



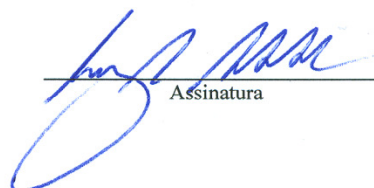
Assinatura

Dr. Luciana Bolsoni Lourenço Morandini



Assinatura

Dr. Luiz Roberto Malabarba



Assinatura

Dr. George Mendes Taliaferro Mattox

Assinatura

Dra. Ana Cristina Prado Veiga Menoncello

Assinatura

Dr. Ricardo Cardoso Benine

Assinatura

ABSTRACT

The superfamily Erythrinioidea is one of eight superfamilies within the order Characiformes and was proposed to include a monophyletic group composed of the Neotropical fish families Ctenoluciidae, Erythrinidae and Lebiasinidae, and African family Hepsetidae. Current phylogenetic studies based on morphological data, such as osteology and morphology of soft structures, and molecular data have refuted the hypothesis of monophyly of this group. In addition, the suprafamilial relationships in Erythrinioidea have diverged among the authors. In combination with more traditional characters, the analyses of the ultrastructure of sperm ontogeny and its final shape have become an interesting source of characters to complement phylogenetic studies. The goal of this study was to perform a phylogenetic analysis to test the monophyly of the Erythrinioidea and to assess the phylogenetic position of the family Crenuchidae, a group supposed to be closely related to the superfamily. The phylogenetic analyses were performed using molecular and morphological data, separately and in a combined approach (total evidence), through the Parsimony method. The ultrastructure of the spermiogenesis and the sperm shape of Erythrinioidea genera, plus the family Crenuchidae and other species possibly related to the superfamily were described and coded in a matrix data. In all three analyses Erythrinioidea was not recovered as monophyletic. The family Crenuchidae was placed in a basal position within the suborder Characoidei in molecular and total evidence analysis, and was not closely related to the Erythrinioidea. The analyses using only molecular data and total evidence showed a very similar topology for the more inclusive relationship levels. The support values were higher for the total evidence tree when compared to the one resulting of only molecular data possibly pointing to a positive influence of the combination of the spermiatic cell data in phylogenetic analyses.

RESUMO

A superfamília Erythrinioidea é uma das oito superfamílias que compõem a ordem Characiformes e foi proposta como um grupo monofilético para abrigar as famílias neotropicais Ctenoluciidae, Erythrinidae e Lebiasinidae, e a família africana Hepsetidae. Após a proposição da superfamília, estudos filogenéticos recentes com base em caracteres morfológicos, como caracteres osteológicos e da morfologia de partes moles, e caracteres moleculares têm refutado a ideia de monofiletismo do grupo. Além disso, diferentes autores divergem quanto às relações suprafamiliares de Erythrinioidea. Além dos caracteres tradicionais, o emprego dos caracteres oriundos da análise da ultraestrutura da ontogenia dos espermatozoides e sua forma final tem sido uma importante fonte na complementação dos estudos filogenéticos. O estudo apresentado teve como objetivo realizar uma análise filogenética para testar a monofiletismo de Erythrinioidea e verificar os padrões de relacionamento suprafamiliares em Characiformes, e testar o posicionamento filogenético da família Crenuchidae, supostamente relacionada à superfamília. As análises filogenéticas foram realizadas com base em dados moleculares e dados morfológicos, independentemente e de maneira conjunta (evidência total), através do critério de Parcimônia. A ultraestrutura da espermiogênese e dos espermatozoides dos gêneros incluídos em Erythrinioidea, mais a família Crenuchidae e outras possivelmente relacionadas, foram descritos e codificados em uma matriz de dados. Nas três análises realizadas a superfamília Erythrinioidea não é obtida como monofilética. A família Crenuchidae posiciona-se na base da subordem Characoidei e não está estreitamente relacionada à Erythrinioidea. As análises com dados moleculares e de evidência total apresentaram uma topologia muito semelhante ao nível mais inclusivo e os valores de suporte dos principais clados apresentaram-se maiores na evidência total, mostrando a influência positiva da inserção dos caracteres da morfologia das células espermáticas nas análises filogenéticas.

SUMÁRIO

ABSTRACT	vii
RESUMO	ix
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVO GERAL	14
Objetivos específicos	14
MATERIAL E MÉTODOS	15
1. Classificação taxonômica	15
2. Análise morfológica	15
2.1 Amostras	15
2.1.1 Os espécimes Neotropicais	15
2.1.2 Os espécimes representantes das famílias Africanas	16
2.2 Preparação do material para a microscopia eletrônica de transmissão	16
3. Análise das sequências nucleotídicas	19
3.1 Amostras	19
3.2 Obtenção das sequências nucleotídicas	20
4. Análise filogenética	21
4.1 Reconstrução filogenética molecular e de evidência total	21
4.2 Reconstrução filogenética morfológica	22
RESULTADOS	23
1. Dados morfológicos	23
2. Lista de caracteres morfológicos	103
3. Análise filogenética	114
DISCUSSÃO	132
1. Dados morfológicos	132
2. Relações filogenéticas de Erythrinioidea	136
CONCLUSÕES	140
REFERÊNCIAS	141
APÊNDICE I: Matriz de dados morfológicos	150
APÊNDICE II: Artigo científico publicado (1)	152

APÊNDICE III: Artigo científico publicado (2)	153
ANEXO I: Carta de confirmação de estágio técnico no SAIAB	154
ANEXO II: Carta de confirmação de estágio técnico no AMNH	155
ANEXO III: Lista de espécies do trabalho de Calcagnotto <i>et al.</i> (2005)	156
ANEXO IV: Autorização do Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da UNESP	161
ANEXO V: Autorização do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNICAMP	162

AGRADECIMENTOS

À Professora Irani Quagio Grassiotto, pela confiança a mim conferida, pela excepcional orientação, atenção e principalmente pelo encorajamento humanitário de todos os momentos e pela amizade.

À Professora Daniela Calcagnotto, pela coorientação e todos os ensinamentos, além dos momentos de amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, por todo o suporte acadêmico.

À Seção de Pós-Graduação, na pessoa de Líliam Alves Senne Panagio, pelos excelentes serviços prestados e pela amizade.

À Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão de bolsa de estudos por 7 meses.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pela concessão de bolsa de estudos por 35 meses e recursos de reserva técnica (Processo 2010/01626-2).

Ao Sr. Antônio Vicente Salvador e Keila Emílio de Almeida, técnicos do Laboratório de Biologia da Reprodução de Peixes Neotropicais, por todos os ensinamentos, paciência e amizade.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica, IB – Botucatu, Professora Doutora Daniela Carvalho dos Santos, e aos técnicos e amigos Claudete dos Santos Tardivo, Carolina Massucci Marciano da Silva, Ligia Costa, Maria Helena Moreno, Shelly Favorito de Carvalho e Tiago dos Santos Tardivo pelos serviços prestados e amizade.

Ao Professor Osvaldo Takeshi Oyakawa, pela disponibilização do espécimens da Coleção de Peixes do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP).

Ao Dr. André Luiz Netto Ferreira (Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo – MZUSP), pela disponibilização dos espécimens da família Lebiasinidae.

Ao Dr. Mark Henry Sabaj Pérez (The Academy of Natural Sciences of Drexel University – ANSP), pela disponibilização dos espécimens da família Lebiasinidae e Ctenoluciidae.

À Dra. Melanie Stiassny (American Museum of Natural History – AMNH) e ao Dr. Paul Skelton (South African Institute for Aquatic Biodiversity -SAIAB), pela disponibilização dos espécimens das famílias de Characiformes africanos.

Aos companheiros e amigos do Laboratório de Biologia da Reprodução de Peixes Neotropicais, Clarianna Martins Baicere Silva, Daniel Dantas Wildner, Lucélia Tessaro e Rinaldo José Ortiz por compartilharem todos os momentos.

À amiga Talita Sarah Mazzoni, pelos momentos de grande alegria, descontração, confiança e solidariedade nas horas adversas desta fase. Muito Obrigado!

À amiga Almerinda Ribeiro Virgínio Sjorge, pelo apoio incondicional e amizade.

À amiga Lessandra de Rosa, pelo apoio, amizade e descontração.

Ao amigo Diego Marques pelo apoio incondicional e momentos felizes.

Aos amigos “de moradia”, Guilherme José da Costa Silva e Rodrigo Wagner de Souza, pela amizade e incentivo.

Aos amigos do departamento de morfologia Adauto, Ana, Bianca, Bruno, Elton, Érica, Isabelle, Juliana Giusti, Juliana Ricci, Monique, Natália, Sérgio Alexandre pelo companheirismo e momentos de descontração na “cozinha”.

À Sra. Terezinha Biondo Sauer, por seu exemplo de vida, otimismo, carisma e pelo grande carinho que demonstra aos que a circundam.

À minha família, pelo apoio, incentivo e amor, sempre.

A Deus, energia criadora, que concebeu o universo e as maravilhosas pessoas que o habitam.

INTRODUÇÃO

Os peixes da ordem Characiformes (superordem Ostariophysi, série Otophysi) apresentam-se distribuídos nas águas continentais centro e sul-americanas e no continente Africano (Nelson, 2006). Atualmente, a ordem é composta por 2.050 espécies válidas distribuídas em 23 famílias (Eschmeyer e Fong, 2014). Os peixes deste grupo são conhecidos popularmente em nosso país como peixes de escama e seu tamanho varia desde pequeno (com 15 mm de comprimento) até grande porte (100 cm de comprimento). Apesar das famílias Distichodontidae, Citharinidae, Alestidae e Hepsetidae ocorrerem na Região Etiópica (maior parte da África e sul da Península Arábica), com cerca de 228 espécies, é na Região Neotropical que os Characiformes possuem maior importância ecológica e econômica (Nelson, 2006), com cerca de 1822 espécies e dividindo a dominância da ictiofauna Neotropical principalmente com a ordem Siluriformes (Eschmeyer e Fong, 2014). As espécies desta ordem ocupam ambientes estritamente de água doce nos mais diversos habitats, desde regiões lóticicas a lênticas de rios dos mais diferentes portes (Nelson, 2006).

Apesar dos primeiros estudos das relações superiores em Characiformes tendo por base caracteres morfológicos datarem dos anos 90 (Uj, 1990; Buckup, 1991; Lucena, 1993; Vari, 1995), o conhecimento das relações filogenéticas de vários táxons da ordem Characiformes ainda permanece obscuro. A análise de Buckup (1991, 1993, 1998), cujo objetivo era o estudo das relações evolutivas em Characidiinae, acabou por resultar na proposição de uma hipótese filogenética para a ordem (Fig. 1). Nela confirma-se a posição basal de Citharinidae e Distichodontidae, como proposta por Vari (1979) e Fink e Fink (1981). Nesse estudo, as subfamílias Characidiinae e Crenuchinae formam um grupo monofilético e o autor redefine, assim, a família Crenuchidae para incluir estas duas subfamílias. Na hipótese de Buckup (1998), Crenuchidae foi obtida como basal no clado que inclui outras famílias Neotropicais e a família africana Alestidae. Outra contribuição importante desse estudo foi a proposição de duas subordens: a subordem Citharinoidei, formada pelas famílias africanas Citharinidae e Distichodontidae, basais para Characiformes; e a subordem Characoidei, formada pelo restante dos Characiformes, dividida em 8 superfamílias. Uma delas é a superfamília Erythrinioidea, formada pelas famílias Erythrinidae, Lebiasinidae, Ctenoluciidae e Hepsetidae (*sensu* Buckup, 1998). A

família Erythrinidae é composta por três gêneros, *Erythrinus*, *Hoplerythrinus* e *Hoplias*, com total de 16 espécies válidas (Eschmeyer e Fong, 2014). A família Lebiasinidae é dividida em duas subfamílias: Lebiasininae - composta por dois gêneros, *Lebiasina* e *Piabucina*, com total de 29 espécies; e Pyrrhulininae - com quatro gêneros, *Copeina*, *Copella*, *Pyrrhulina* e *Nannostomus*, com 45 espécies válidas (Eschmeyer e Fong, 2014). A família Ctenoluciidae é composta por dois gêneros, *Boulengerella* e *Ctenolucius*, com total de 7 espécies válidas (Eschmeyer e Fong, 2014). A família africana Hepsetidae foi considerada por muito tempo como monotípica e abrigava apenas a espécie *Hepsetus odoe* (Nelson, 2006). Entretanto, mais recentemente, Zengeya e colaboradores (2011) revalidaram a espécie *Hepsetus cuvieri* e mais duas espécies novas foram descritas, *H. kingsleyae* (Decru *et al.*, 2013a) e *H. occidentalis* (Decru *et al.*, 2013b), e *H. lineata*, antes considerada como subespécie, foi elevada ao nível de espécie (Decru *et al.*, 2013a), totalizando 5 espécies válidas em Hepsetidae (Eschmeyer e Fong, 2014).

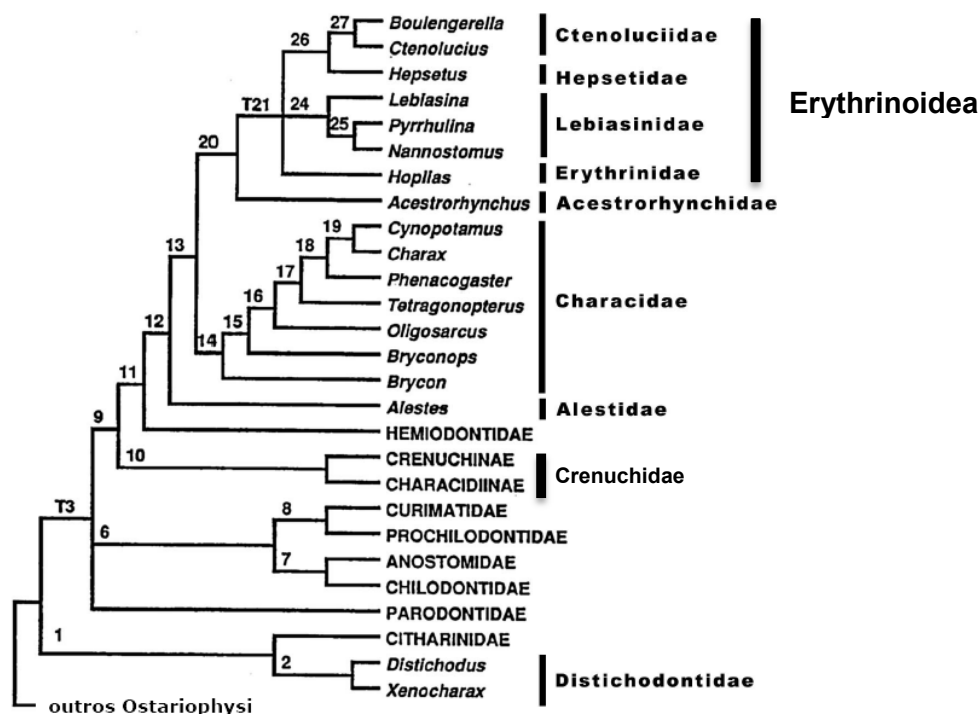


Figura 1. Relações filogenéticas na ordem Characiformes segundo Buckup (1998) e a proposição das superfamílias, uma delas Erythrinioidea, que seria composta pelas famílias Erythrinidae, Lebiasinidae, Hepsetidae e Ctenoluciidae. Os valores representam os números dos nós. Os valores de suporte não foram apresentados pelo autor.

Vari (1995) já havia proposto Erythrinioidea como monofilética (Fig. 2), mas suas relações internas diferem daquelas propostas por Buckup (1998), pois Ctenoluciidae aparece como grupo-irmão de Erythrinidae, enquanto que na hipótese de Buckup (1998) a família Ctenoluciidae representa o grupo-irmão da família africana Hepsetidae. Além disso, a posição da família Lebiasinidae não foi resolvida na hipótese de Buckup (1998), enquanto que na hipótese de Vari (1995) ela é obtida como irmã de (Hepsetidae (Erythrinidae + Ctenoluciidae)).

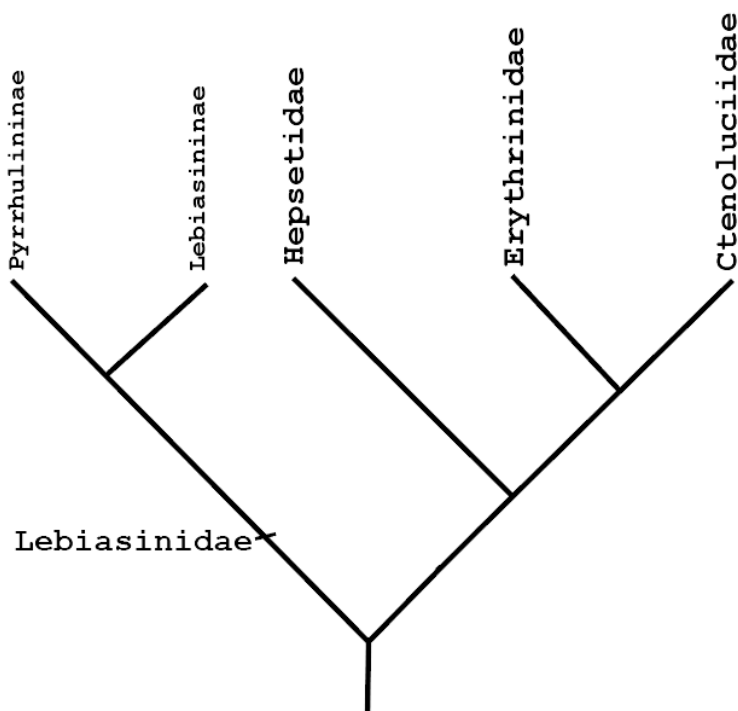


Figura 2. Cladograma das relações entre Lebiasinidae, Hepsetidae, Erythrinidae e Ctenoluciidae segundo Vari (1995). Os valores de suporte não foram calculados pelo autor.

Moreira (2007), em um estudo cujo objetivo foi analisar as relações suprafamiliares em Characiformes com base em caracteres morfológicos, apresenta uma hipótese mostrando o monofilismo da ordem e suas relações (Fig. 3). De acordo com esta hipótese, a ordem é composta por dois grandes clados, nos quais Distichodontidae e Citharinidae não são obtidos como basais para Characiformes e a superfamília Erythrinioidea não seria monofilética, não corroborando, portanto, as hipóteses de Vari (1995) e Buckup (1998). As famílias que compõem esta superfamília estariam no grande “Clado B” (Moreira, 2007), no qual as subfamílias Lebiasininae e Pyrrhulininae não formariam um grupo monofilético e,

portanto, a família Lebiasinidae seria parafilética. Em outro clado, a família Characidae não é monofilética e é considerada como grupo-irmão de (*Salminus* (*Brycon* (Cynodontidae (Acestrorhynchidae (Hepsetidae, Ctenoluciidae))))).

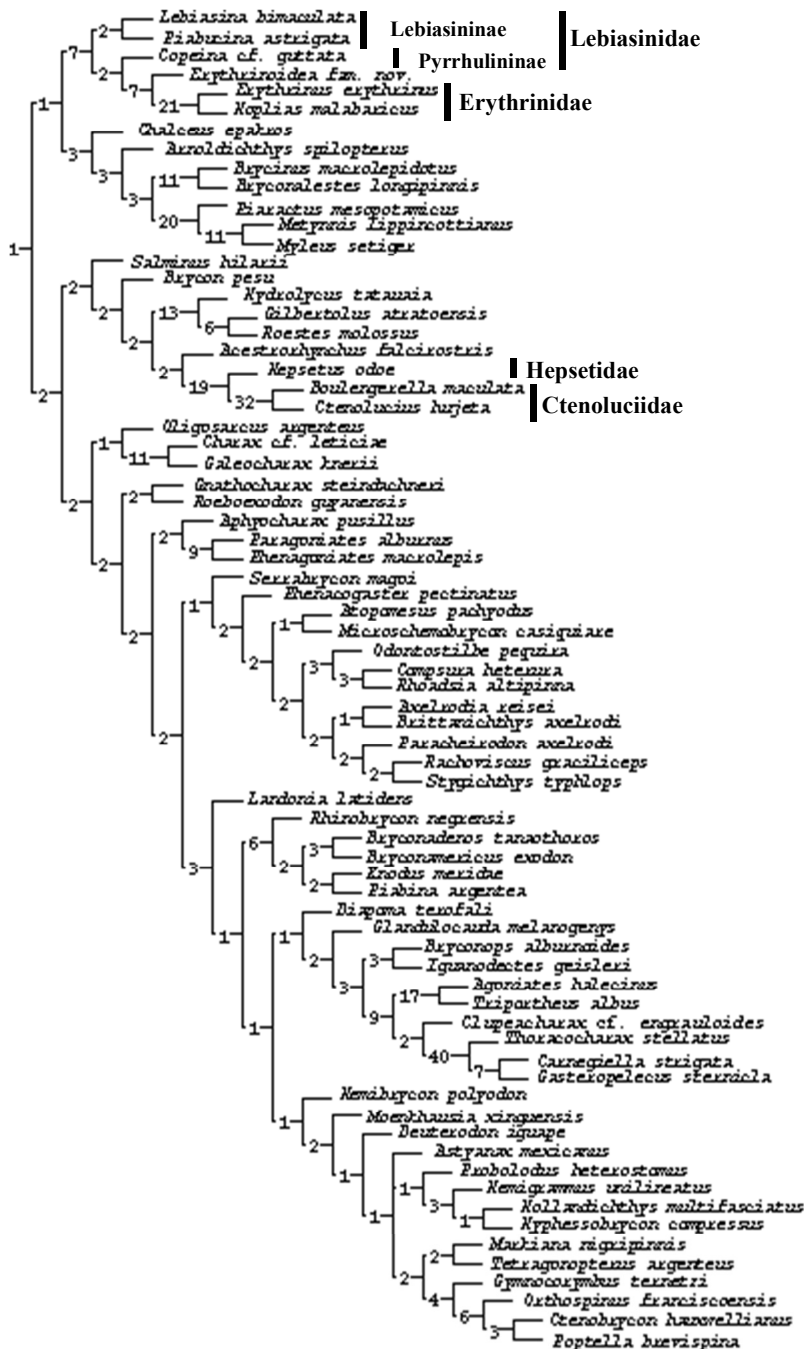


Figura 3. Cladograma parcial (Clado B) das relações familiares de Characiformes proposto por Moreira (2007). Os números representam o suporte de Bremer para cada nó. Em destaque estão as famílias que compõem Erythrinoides (*sensu* Buckup, 1998). Observe que Lebiasinidae não é obtida como monofilética.

Ortí e Meyer (1996) publicaram análises abrangentes com representantes da ordem Characiformes utilizando sequências parciais do gene *ependimina* e os genes mitocondriais 12S e 16S (Fig. 4). Posteriormente, Ortí (1997) e Ortí e Meyer (1997) propuseram duas hipóteses de relacionamento para Characiformes, nas quais a família africana Distichodontidae e Citharinidae são grupos-irmãos, considerados basais para os Characiformes, corroborando a hipótese de Buckup (1998). A superfamília Erythrinioidea não seria monofilética, não corroborando as hipóteses de Vari (1995) e Buckup (1998). Ainda de acordo com a hipótese de Ortí e Meyer (1997), Lebiasinidae seria irmão de Serrasalminidae (=Serrasalminae), grupo-irmão de (Erythrinidae + Hepsetidae) + outras famílias. Ctenoluciidae teria como grupo-irmão *Gnathocharax*, e ambos seriam irmãos de (Acestrorhynchidae + Alestidae (=Alestiinae)).

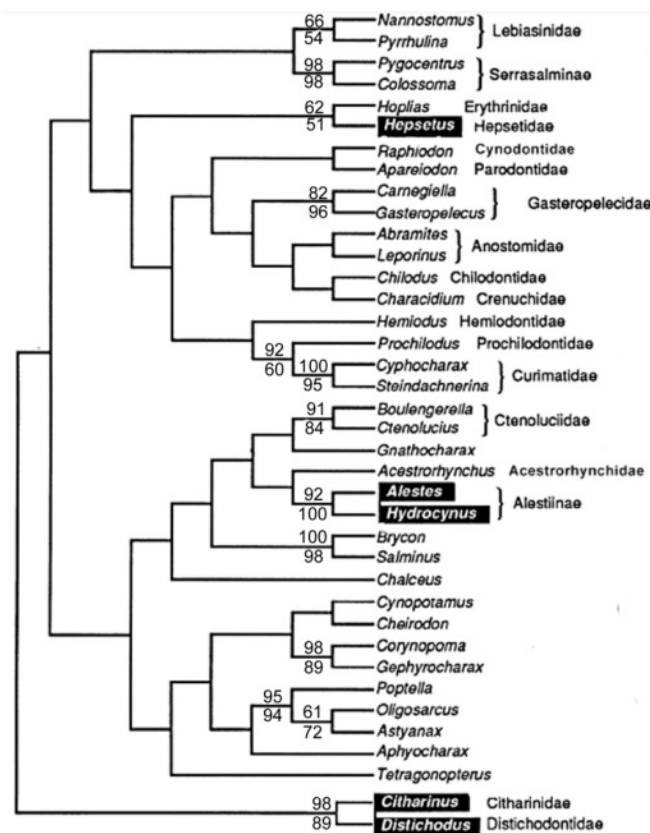


Figura 4. Cladograma mais parcimonioso das relações em Characiformes proposto por Ortí e Meyer (1997) com base em dados moleculares. Os números acima dos nós representam os valores de Bootstrap ($\geq 50\%$) para análise de Neighbor Joining e abaixo dos nós para a análise de Parcimônia. As famílias africanas estão denotadas em preto. Alestiinae = Alestidae.

Calcagnotto e colaboradores (2005) analisaram 135 táxons da ordem Characiformes representando as famílias da África e América do Sul, utilizando seis genes sendo dois do DNA mitocondrial (16S e citocromo B) e quatro nucleares (Rag2, Fkh, Sia e Trop) (Fig. 5). O uso de representantes de Siluriformes e Cypriniformes como grupos externos mostrou que a ordem Characiformes é monofilética, entretanto, as duas linhagens africana e sul-americana não são monofiléticas. Nesta hipótese, os grupos basais para a subordem Characoidei são (Erythrinidae + Crenuchidae) + (Alestidae + (Hepsetidae (Lebiasinidae + Ctenoluciidae))). Algumas das relações apresentadas por Calcagnotto e colaboradores (2005) não corroboram as hipóteses de Ortí e Meyer (1997), Buckup (1998) e Moreira (2007). Por exemplo, a família Crenuchidae na hipótese de Calcagnotto e colaboradores (2005) é obtida como grupo-irmão de Erythrinidae em uma posição basal em Characoidei.

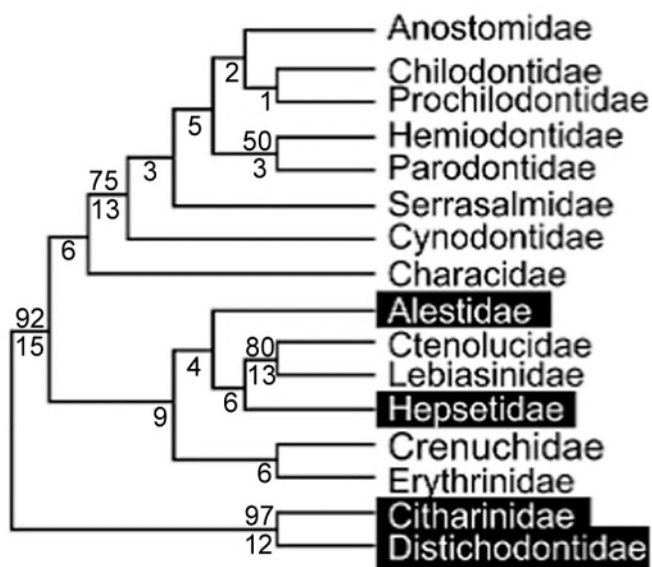


Figura 5. Cladograma consenso das relações familiares em Characiformes proposto por Calcagnotto e colaboradores (2005) com base em caracteres moleculares. Os números acima dos nós representam os valores de Bootstrap ($\geq 50\%$) e abaixo dos nós o suporte de Bremer para a análise de Parcimônia. As famílias africanas estão denotadas em preto.

Oliveira e colaboradores (2011) realizaram uma extensa análise filogenética com foco nas relações da família Characidae utilizando caracteres moleculares. Apesar de não ser o objetivo principal do trabalho a análise suprafamiliar em Characiformes, os autores incluíram representantes de 19 famílias que compõem a ordem, as 18 conforme descritas

por Nelson (2006) mais Serrasalminidae (Fig. 6). O elevado número de espécimens incluído nas análises realizadas por Oliveira e colaboradores (2011) representou um grande avanço no estudo das relações de Characidae com outras famílias da ordem Characiformes. No entanto, para um melhor entendimento das relações familiares e suprafamiliares de Erythrinioidea, a amostragem de representantes, principalmente das famílias Lebiasinidae e Crenuchidae, ainda necessitava ser aumentada. A família Crenuchidae, apesar de não ter sido incluída em Erythrinioidea na proposição inicial das superfamílias de Characiformes por Buckup (1998), foi obtida como grupo-irmão da família Erythrinidae na hipótese de Calcagnotto e colaboradores (2005). A hipótese de relação próxima entre Crenuchidae e Erythrinidae não foi confirmada por Oliveira e colaboradores (2011).

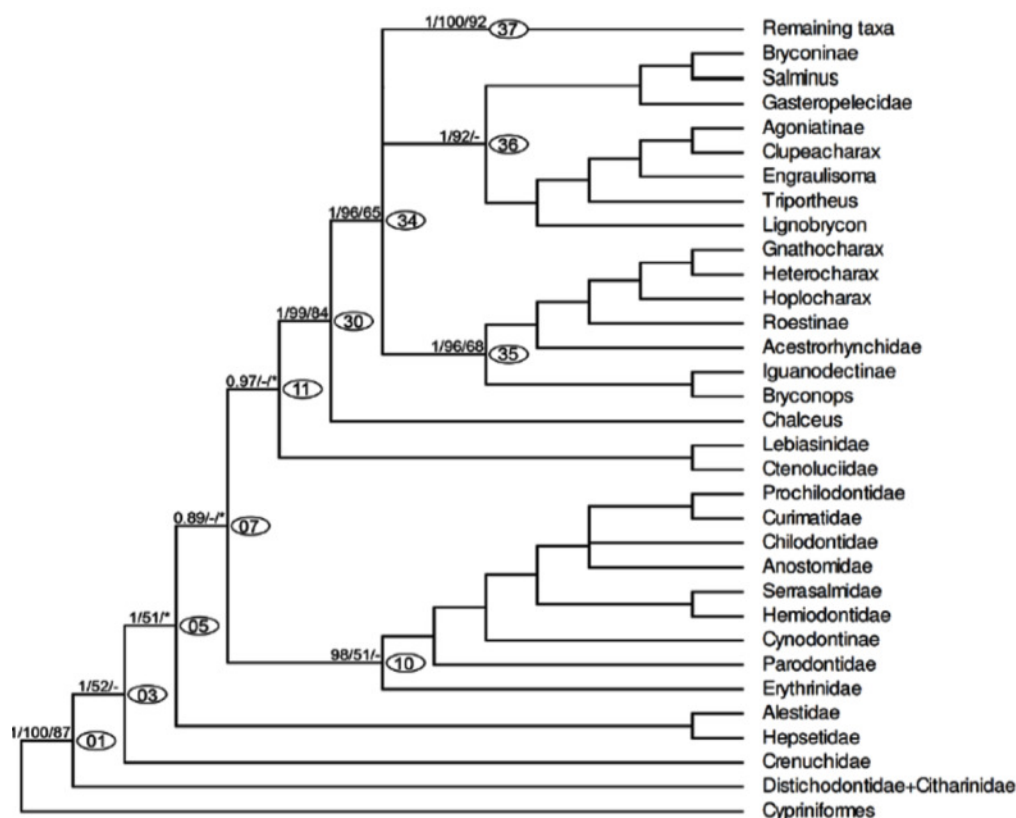


Figura 6. Cladograma resumido das relações da ordem Characiformes segundo Oliveira *et al.* (2011). Os números acima dos nós representam, respectivamente, a probabilidade posterior da Análise Bayesiana ($\geq 0,5$), valores de Bootstrap ($\geq 50\%$) para análise de Verossimilhança e análise de Parcimônia. Os asteriscos representam os nós que foram colapsados, e os traços representam valores menores que os valores de corte. Os números dos nós estão representados dentro dos círculos.

Embora o conhecimento atual sobre o padrão de relacionamento entre os Characiformes tenha sido inferido com base em caracteres morfológicos tradicionais (osteologia e miologia) e moleculares (Calcagnotto *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2011), outras características são úteis no estudo desta ordem. A exemplo, as características sexuais secundárias como ganchos nos raios das nadadeiras anal, dorsal e pélvica (Malabarba e Weitzman, 2003), a estrutura glandular na nadadeira anal (Weitzman *et al.*, 2005) e glândulas branquiais em caracídeos (Burns e Weitzman, 1996; Azevedo, 2004; Oliveira, 2003, 2007) tem sido empregadas como caracteres relativamente novas nas análises filogenéticas. Atualmente algumas hipóteses de relacionamento em Characiformes são sustentadas por estas características. Os ganchos nos raios das nadadeiras anal, dorsal e pélvica, bem como outras características, sustentam a hipótese de Malabarba e Weitzman (2003) de monofiletismo de um clado de Characiformes contendo a maioria dos gêneros atualmente classificados *incertae sedis* em Characidae (*sensu* Lima *et al.*, 2003). Estes últimos autores restringiram suas análises às famílias Gasteropelecidae e Characidae e a Subfamília Roestinae. Neste estudo parte dos gêneros *incertae sedis* em Characidae foram reunidos em um grupo hipoteticamente natural denominado de “clado A” que é constituído pela subfamília Glandulocaudinae, pelos gêneros *Monotocheirodon*, *Odontostoechus* e *Othonocheirodon* e parte dos gêneros *incertae sedis*, como *Bryconamericus*, *Boehlkea*, *Bryconacidnus*, *Creagrutus*, *Piabina*, dentre outros. A hipótese de Malabarba e Weitzman (2003) foi posteriormente confirmada por outros autores (Mirande, 2009, 2010; Javonillo *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2011). A presença de uma estrutura glandular na nadadeira caudal e a sua morfologia tem sido tradicionalmente empregada na definição da subfamília Glandulocaudinae e de suas tribos (Weitzman e Menezes, 1998). Weitzman e colaboradores (2005), com base principalmente na análise histológica destas glândulas, limitaram a subfamília Glandulocaudinae apenas à Tribo Glandulocaudini; as Tribos Corynopomini, Diapomini, Xenurobryconini, Landonini, Phenacobryconini, e Hysteronotini, anteriormente alocadas em Glandulocaudinae, passaram a integrar a subfamília Stevardiinae. Existem indícios de que várias das características reprodutivas das espécies contêm sinal filogenético útil na resolução de algumas relações de parentesco, pelo menos, ao nível intra e intergenérico (Baicere-Silva *et al.*, 2011a; Quagio-Grassiotto *et al.*, 2012; Santana *et al.*, 2013a, 2013b).

Os gametas masculinos dos animais em geral apresentam, numa sequência antero-posterior: acrossoma, núcleo esférico, dois centríolos, sendo que o distal se diferencia em corpúsculo basal e dá origem ao axonema do flagelo, mitocôndrias arredondadas e pouco numerosas, e flagelo contendo o axonema básico do tipo 9 + 2 (Franzén, 1970). Os espermatozoides dos peixes mostram uma imensa diversidade de formas (Jamieson, 1991; Mattei, 1991), independentemente do modo de reprodução que possuam (fecundação externa ou inseminação). Segundo Jamieson (1991), os espermatozoides dos peixes Neopterygii não possuem acrossoma. Esta ausência vem acompanhada da presença da micrópila nos óvulos destes animais (Jamieson, 1991). A micrópila é uma abertura no envoltório do óvulo que permite a passagem do espermatozoide no momento da fertilização (Amanze e Yvengar, 1990).

Conforme Mattei (1970), o eixo flagelar nos espermatozoides dos peixes pode posicionar-se paralela ou perpendicularmente ao núcleo. Estas posições resultam da ocorrência ou não da rotação e caracterizam dois tipos de espermiogênese, tipo I (Fig. 7) e II (Fig. 8) respectivamente. Na espermiogênese do Tipo I (Fig. 7), a espermatíde jovem apresenta núcleo central, mitocôndrias esparsas pelo citoplasma e diplosoma próximo à membrana plasmática. O centríolo distal diferencia-se em corpúsculo basal e dá origem ao flagelo. O complexo centriolar movimenta-se em direção ao núcleo, trazendo a membrana e o segmento inicial do flagelo que se invaginam. Forma-se assim um canal entre a membrana flagelar e a espermatíca, o canal citoplasmático. O flagelo dispõe-se tangencialmente ao núcleo e nesta face do contorno nuclear forma-se uma depressão ou fossa. O núcleo sofre uma rotação de 90° em relação ao eixo flagelar e o diplosoma se insere na fossa nuclear. A depressão determina a base do núcleo, região para a qual migram as mitocôndrias. Variações neste tipo de espermiogênese resultam em um canal citoplasmático pequeno ou inexistente, o mesmo ocorrendo com a fossa nuclear. Na espermiogênese do tipo II, o flagelo posiciona-se inicialmente lateral ao núcleo e, desde que a rotação nuclear é inexistente, o espermatozoide apresenta o flagelo também lateral ao núcleo (Fig. 8). Na espermiogênese do tipo III (Fig. 9), recentemente descrita (Quaggio-Grassiotto e Oliveira, 2008), o desenvolvimento do flagelo é medial, o núcleo não sofre rotação e a fossa nuclear e o canal citoplasmático não se formam.

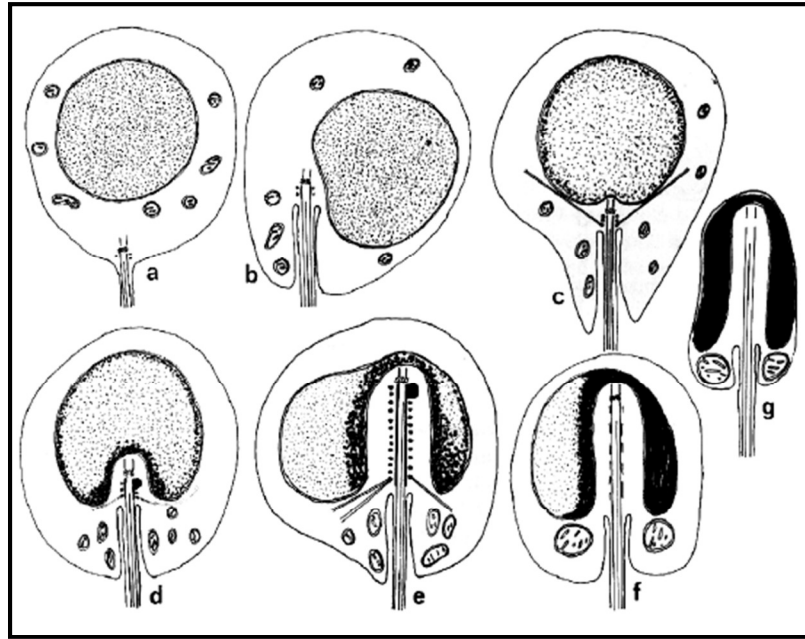


Figura 7. Esquema ilustrativo da espermiogênese do tipo I, exemplificada por *Upeneus prayensis* (Mullidae), conforme Mattei (1970). As letras indicam o desenvolvimento espaço-temporal gradativo (a – g).

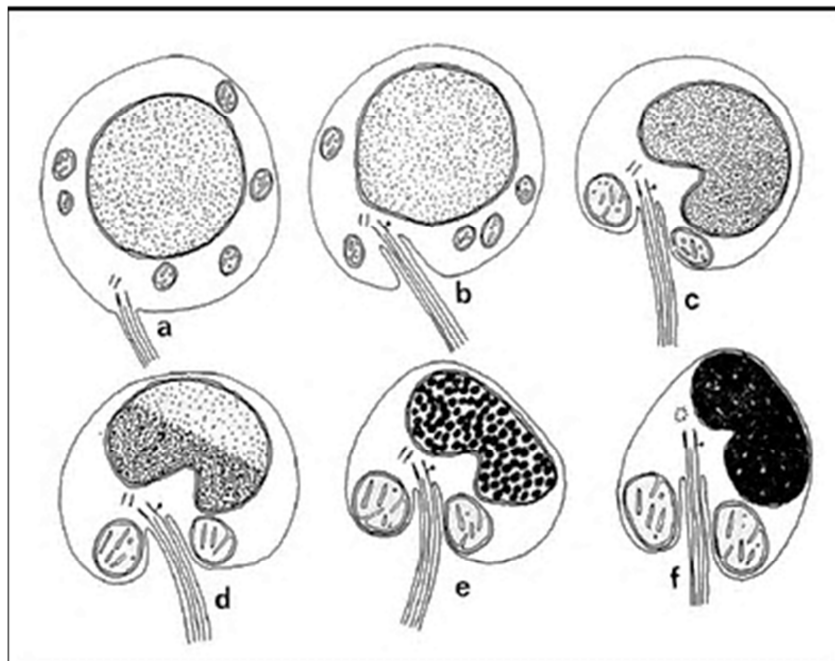


Figura 8. Esquema ilustrativo da espermiogênese do tipo II, exemplificada por *Parapristipoma octolineatum* (Haemulidae), conforme Mattei (1970). As letras indicam o desenvolvimento espaço-temporal gradativo (a – f).

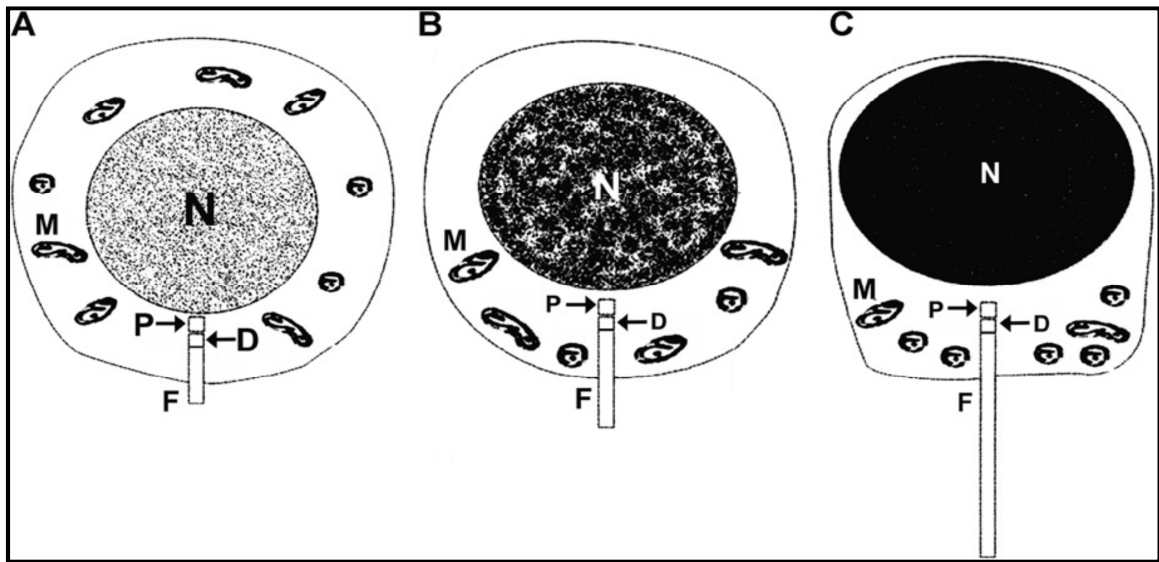


Figura 9. Esquema da espermiogênese do tipo III, mostrando espermatíde inicial (A), espermatíde (B) e espermatozoide (C). Conforme Quagio-Grassiotto e Oliveira (2008). N= núcleo, P= centríolo proximal, D= centríolo distal, M= mitocôndria, F= flagelo.

As espermiogêneses do tipo I e do tipo III resultam na formação de espermatozoides que apresentam, em geral, núcleo pequeno de forma ovoide ou arredondada. Os centríolos, em ângulos variados, situam-se total ou parcialmente na fossa nuclear, quando esta está presente. A peça intermediária é pequena e forma um colar ao redor da região inicial do flagelo. As mitocôndrias, pequenas e pouco numerosas, situam-se no colar citoplasmático, separadas do início do flagelo por um espaço existente entre as membranas plasmáticas e flagelar, o canal citoplasmático. O flagelo apresenta o axonema clássico formado por nove duplas periféricas de microtúbulos e um par central. A membrana flagelar pode ou não apresentar projeções laterais ou “aletas”. Variações neste tipo de espermatozoides são observadas principalmente quanto à presença e dimensão da fossa nuclear, tamanho e quantidade de mitocôndrias e número de flagelos (Jamieson, 1991; Mattei, 1991; Quagio-Grassiotto e Oliveira, 2008). Nas espécies com inseminação o núcleo apresenta-se forte ou moderadamente alongado no sentido posterior ou anterior (Burns e Weitzman, 2005).

A estrutura dos espermatozoides é bastante conservativa em espécies de uma mesma família ou subfamília (Baccetti *et al.*, 1984; Jamieson, 1991; Mattei, 1991; Burns *et al.*, 1998; Quagio-Grassiotto *et al.*, 2003; Quagio-Grassiotto e Oliveira, 2008; Burns *et al.*,

2009; Baicere-Silva *et al.*, 2011a, b; Santana *et al.*, 2013b), tornando sua caracterização bastante útil na identificação de padrões de relacionamento interfamiliar e/ou intrafamiliar.

Inicialmente, Jamieson (1991) resume o conhecimento a respeito da estrutura dos espermatozoides para os diversos grupos de peixes, assinalando as modificações estruturais que ocorreram em cada linhagem. O conhecimento a respeito da ultraestrutura dos espermatozoides dos Ostariophysi foi recentemente compilado por Burns e colaboradores (2009), com uma discussão sobre a grande variabilidade de formas apresentadas pelos peixes com fertilização externa dentro da superordem. Uma das características encontradas entre as espécies da superordem Ostariophysi é a rotação nuclear incompleta, intermediária entre a espermiogênese do tipo I e do tipo II. Além disso, são discutidas as modificações ocorridas nos espermatozoides das espécies inseminadoras dentro dos Ostariophysi, como alongamento do núcleo, presença de microtúbulos acessórios e aumento da peça intermediária (Javonillo *et al.*, 2009).

Na superfamília Erythrinioidea (*sensu* Buckup, 1998) apresentam-se descritas as características ultraestruturais dos espermatozoides de *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Veríssimo-Silveira, 2007), *Hoplias malabaricus* (Quagio-Grassiotto *et al.*, 2001), *Erythrinus erythrinus* (Burns *et al.*, 2009) - família Erythrinidae; *Nannostomus digrammus*, *N. marginatus* e *N. unifasciatus* (Veríssimo-Silveira, 2007), *Pyrrhulina australis* (Burns *et al.*, 2009) - família Lebiasinidae. Para a família Crenuchidae apenas o espermatozoide de *Characidium gomesi* (Veríssimo-Silveira, 2007) foi descrito. Além destes, várias outras descrições dos espermatozoides das famílias da subordem Characoidei apresentam-se disponíveis na literatura (Veríssimo-Silveira, 2007). Estas e outras novas descrições (presente estudo) têm melhorado este banco de dados, de forma a permitir o seu uso nas análises filogenéticas.

As hipóteses de relacionamento da superfamília Erythrinioidea tem sido controversas ao longo das mais recentes filogenias para a ordem Characiformes. A utilização de caracteres morfológicos provenientes de estudos osteológicos e partes moles, e também de caracteres moleculares, resultaram em hipóteses divergentes com relação ao monofiletismo e a composição de Erythrinioidea e suas relações com outras famílias da ordem. No intuito de aumentar a compreensão destas relações filogenéticas, propomos um estudo das relações suprafamiliares em Erythrinioidea com base na utilização de caracteres moleculares e de

caracteres morfológicos oriundos do processo de espermiogênese e da forma final dos espermatozoides de representantes da ordem Characiformes. A utilização de ambos os caracteres é apresentada de forma independente, isto é, uma análise apenas com dados moleculares e outra com dados morfológicos, e de modo combinado (evidência total). A utilização de caracteres da morfologia fina das células espermáticas em conjunto com dados moleculares é realizada pela primeira vez para a ordem Characiformes. Ainda, observada a grande variação existente no processo de espermiogênese dentro da ordem, verificou-se a distribuição do processo de espermiogênese como descrito em “tipos” (I, II, III) para testar se são filogeneticamente informativos.

OBJETIVO GERAL

1. Testar as hipóteses de relacionamento da superfamília Erythrinioidea dentro da ordem Characiformes com base em caracteres moleculares e da morfologia das células espermáticas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Testar a monofiletismo da superfamília Erythrinioidea e verificar com quais famílias de Characiformes está relacionada a partir da matriz de dados moleculares;
2. Testar a hipótese de estreito relacionamento da família Crenuchidae com Erythrinioidea a partir da matriz de dados moleculares (como proposto por Calcagnotto *et al.*, 2005);
3. Construir uma matriz de evidência total a partir dos dados moleculares e da morfologia da espermiogênese e dos espermatozoides;
4. Testar como os tipos de espermiogênese e forma de espermatozoides se relacionam dentro da superfamília Erythrinioidea e com outros grupos da ordem Characiformes e o padrão de evolução destes caracteres;
5. Testar se as descrições de espermiogênese na forma de “tipos” (I, II, III) são filogeneticamente informativas para a ordem Characiformes;
6. Elaborar uma lista de caracteres com a indicação de uso para os diferentes níveis de relação entre os táxons estudados, isto é, classificar alguns caracteres como mais conservados ou mais variáveis nos táxons estudados.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Classificação taxonômica

A classificação taxonômica da ordem Characiformes utilizada na descrição dos resultados e na discussão segue a proposta de Oliveira e colaboradores (2011), que está sendo adotada por Eschmeyer e Fong (2014 – Catalog of Fishes), na qual são elevadas ao nível de família quatro subfamílias antes alocadas em Characidae: Chalceidae, Triportheidae, Iguanodectidae e Bryconidae; mais a família Acestrorhynchidae, que foi redefinida para alocar as subfamílias Roestinae e Heterocharacinae, anteriormente em Characidae. De acordo com esta classificação, a ordem Characiformes é constituída por 23 famílias: Citharinidae, Distichodontidae, Alestidae, Hepsetidae, Hemiodontidae, Parodontidae, Curimatidae, Prochilodontidae, Anostomidae, Chilodontidae, Erythrinidae, Lebiasinidae, Gasteropelecidae, Ctenoluciidae, Acestrorhynchidae, Cynodontidae, Serrasalminidae, Characidae, Bryconidae, Triportheidae, Iguanodectidae, Chalceidae e Crenuchidae.

2. Análise morfológica

2.1 Amostras

2.1.1 Os espécimes Neotropicais

Os táxons foram coletados ou obtidos de coleções zoológicas, e ainda, obtidos em loja de aquarismo quando disponíveis. As coletas foram realizadas nas seguintes localidades: (1) Bacia do Tocantins-Araguaia, Rio Araguaia, município de Barra do Garças – MT, em 13/11/2010; (2) Bacia Amazônica, Drenagem Rio Xingu, Rio Culene, município de Canarana – MT, em 17/11/2010; (3) Bacia Amazônica, Drenagem Rio Negro, Rio Negro e afluentes, município de Santa Isabel do Rio Negro – AM, em 05 a 11/02/2011; (4) Drenagem Rio Guamá e afluentes, município de Bragança e arredores – PA, em 31/01 a 09/02/2012. Os indivíduos coletados a fresco foram anestesiados por imersão em solução de benzocaína (dissolvida em álcool absoluto na dose de 0,1 g para 5 l de água) e os órgãos presentes na cavidade abdominal foram expostos através de uma secção ventral do corpo do animal. Logo após, os machos sexualmente maduros tiveram o aparelho reprodutor retirado, e conservado em solução fixadora de Karnovsky para análise posterior. Todos os exemplares utilizados foram subsequentemente fixados em formol 4%, conservados em

álcool 70% e serão depositados em coleções zoológicas como espécimes-testemunho. Nos casos em que os espécimes não foram coletados a fresco, estes foram obtidos como espécimes já fixados em formol a 4% e preservados em álcool 70% na condição de empréstimo ou doação das Coleções Ictiológicas e Museus que apresentaram disponibilidade para tal. Os exemplares fixados e tomados como empréstimo foram re-hidratados em série decrescente de álcool e imersos em solução fixadora apropriada, como descrito para os indivíduos coletados a fresco.

2.1.2 Os espécimes representantes das famílias Africanas

Foram coletadas 124 amostras de tecidos gonadais que representam as famílias Alestidae, Hepsetidae, Citharinidae e Distichodontidae, sendo 55 provenientes do South African Institute for Aquatic Biodiversity (SAIAB), que abriga a National Fish Collection, localizada em Grahamstown - África do Sul, e 69 da coleção ictiológica do American Museum of Natural History (AMNH), Nova Iorque, Estados Unidos da América. Ao final da tese está anexada a carta de permanência e utilização da coleção e das instalações do SAIAB (Anexo I) e AMNH (Anexo II).

A tabela 1 apresenta todos os táxons analisados (Neotropicais e Africanos).

2.2 Preparação do material para a microscopia eletrônica de transmissão

Os fragmentos dos testículos de espécimes sexualmente maduros, contendo esperma, foram pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% por 2 horas, no escuro, lavados em água destilada, contrastados em bloco com solução aquosa de acetato de uranila 0,5% e novamente lavados. Seguiu-se, então, a desidratação em série crescente de concentração de acetona e a infiltração por um período de 12 horas em solução 1:1 de mistura de acetona e Araldite. Após a infiltração, os fragmentos de testículos foram pré-incluídos em mistura de Araldite, em frasco aberto, colocados em estufa a 37° C por 1 hora, seguindo-se a inclusão em nova mistura de Araldite, em estufa a 58-60 °C por 48 horas. Os cortes ultrafinos foram obtidos em ultramicrotomo Ultratome III do LKB, equipado com navalha de diamante, coletados em telas de cobre, sem filme suporte e contrastados em acetato de uranila a partir de uma solução saturada preparada em etanol 50%, por 20 minutos, no escuro. Após lavagem por várias vezes em álcool 50%, o material sofreu nova contrastação em citrato de

chumbo por 10 minutos, seguida de lavagem, por várias vezes, em água destilada. Os cortes assim preparados foram observados em microscópio eletrônico de transmissão Phillips-EM 301 e fotografados em filme 35 mm da Kodak (Eastman 5302). As cópias fotográficas foram feitas em papel fotográfico da Kodak (Kodabrome RC Print).

Tabela 1. Relação dos táxons utilizados na descrição da espermiogênese e da forma final dos espermatozoides e para a análise filogenética morfológica. Em destaque estão as espécies descritas neste estudo.

Referência	Nº	Família	Subfamília	Espécie
Outgroup - Enraizamento		Siluriformes		
Burns <i>et al.</i> (2009)	1	Heptapteridae		<i>Pimelodella</i> sp.
Ingroup		Characiformes		
Matos <i>et al.</i> (2000)	1	Acestrorhynchidae		<i>Acestrorhynchus falcatus</i>
Veríssimo-Silveira (2007)	2	Acestrorhynchidae		<i>Acestrorhynchus pantaneiro</i>
Baicere-Silva (2013)	3	Acestrorhynchidae		<i>Acestrorhynchus falcistrostris</i>
Shahin (2006)	4	Alestidae		<i>Alestes dentex</i>
Este estudo	5	Alestidae		<i>Bryconalestes longipinnis</i>
Este estudo	6	Alestidae		<i>Alestopetersius compressus</i>
Este estudo	7	Alestidae		<i>Arnoldichthys spilopterus</i>
Este estudo	8	Alestidae		<i>Brachypetersius altus</i>
Este estudo	9	Alestidae		<i>Brycinus imberi</i>
Este estudo	10	Alestidae		<i>Brycinus lateralis</i>
Este estudo	11	Alestidae		<i>Micralestes acutidens</i>
Este estudo	12	Alestidae		<i>Rhabdalestes rhodesiensis</i>
Pecio (2009)	13	Alestidae		<i>Phenacogrammus interruptus</i>
Veríssimo-Silveira (2007)	14	Anostomidae		<i>Abramites</i> sp.
Veríssimo-Silveira (2007)	15	Anostomidae		<i>Leporinus lacustris</i>
Veríssimo-Silveira <i>et al.</i> (2006)	16	Bryconidae		<i>Brycon microlepis</i>
Veríssimo-Silveira <i>et al.</i> (2006)	17	Bryconidae		<i>Brycon orbignyanus</i>
Veríssimo-Silveira <i>et al.</i> (2006)	18	Bryconidae		<i>Salminus brasiliensis</i>
Baicere-Silva (2013)	19	Bryconidae		<i>Brycon hilarii</i>
Baicere-Silva (2013)	20	Bryconidae		<i>Salminus maxillosus</i>
Santana <i>et al.</i> (2013a)	21	Characidae		<i>Astyanax altiparanae</i>
Gusmão-Pompiani (2003)	22	Characidae		<i>Tetragonopterus argenteus</i>
Baicere-Silva (2013)	23	Characidae		<i>Astyanax bimaculatus</i>
Santana <i>et al.</i> (2013a)	24	Characidae		<i>Moenkhausia sanctaefilomenae</i>
Baicere-Silva (2013)	25	Characidae		<i>Inpaychthys kerri</i>
Baicere-Silva <i>et al.</i> (2011a)	26	Characidae	Stevardiinae	<i>Bryconamericus stramineus</i>
Baicere-Silva (2013)	27	Characidae	Cheirodontinae	<i>Cheirodon stenodon</i>
Baicere-Silva <i>et al.</i> (2011a)	28	Characidae	Stevardiinae	<i>Creagrutus meridionalis</i>
Baicere-Silva <i>et al.</i> (2011a)	29	Characidae	Stevardiinae	<i>Hemibrycon surinamensis</i>
Pecio <i>et al.</i> (2007)	30	Characidae		<i>Hemigrammus herythronus</i>
Baicere-Silva (2013)	31	Characidae		<i>Hyphessobrycon eques</i>
Baicere-Silva <i>et al.</i> (2011a)	32	Characidae	Stevardiinae	<i>Knodus meridae</i>
Gusmão-Pompiani (2003)	33	Characidae	Characinae	<i>Roeboides microlepis</i>
Baicere-Silva (2013)	34	Characidae	Stevardiinae	<i>Mimagoniates microlepis</i>
Burns <i>et al.</i> (2009)	35	Characidae	Stevardiinae	<i>Gephyrocharax atricaudatus</i>
Este estudo	36	Chalceidae		<i>Chalceus epakros</i>

Mattei <i>et al.</i> (1995- <i>apud</i> Burns <i>et al.</i> 2009)	37	Citharinidae		<i>Citharinus</i> sp.
Verissimo-Silveira (2007)	38	Crenuchidae	Characidiinae	<i>Characidium gomesi</i>
Este estudo	39	Crenuchidae	Characidiinae	<i>Characidium</i> sp.
Este estudo	40	Crenuchidae	Crenuchinae	<i>Crenuchus spilurus</i>
Verissimo-Silveira (2007)	41	Curimatidae		<i>Psectrogaster essequeibenses</i>
Este estudo	42	Ctenoluciidae		<i>Boulengerella cuvieri</i>
Este estudo	43	Ctenoluciidae		<i>Ctenolucius hujeta</i>
Verissimo-Silveira (2007)	44	Cynodontidae		<i>Raphiodon vulpinus</i>
Este estudo	45	Distichodontidae		<i>Distichodus affinis</i>
Este estudo	46	Distichodontidae		<i>Distichodus decemmaculatus</i>
Este estudo	47	Distichodontidae		<i>Distichodus fasciolatus</i>
Este estudo	48	Distichodontidae		<i>Ichthyborus ornatus</i>
Este estudo	49	Distichodontidae		<i>Nannocharax</i> sp.
Este estudo	50	Distichodontidae		<i>Neolebias trilineatus</i>
Este estudo	51	Distichodontidae		<i>Phago boulengeri</i>
Este estudo	52	Distichodontidae		<i>Xenocharax spilurus</i>
Burns <i>et al.</i> (2009)	53	Erythrinidae		<i>Erythrinus erythrinus</i>
Verissimo-Silveira (2007)	54	Erythrinidae		<i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i>
Quagio-Grassiotto <i>et al.</i> (2001)	55	Erythrinidae		<i>Hoplias malabaricus</i>
Este estudo	56	Hepsetidae		<i>Hepsetus odoe</i>
Santana <i>et al.</i> (2013a)	57	Iguanodectidae		<i>Bryconops affinis</i>
Este estudo	58	Lebiasinidae	Pyrrhulininae	<i>Nannostomus beckfordi</i>
Este estudo	59	Lebiasinidae	Pyrrhulininae	<i>Nannostomus eques</i>
Este estudo	60	Lebiasinidae	Pyrrhulininae	<i>Nannostomus nitidus</i>
Este estudo - Santana <i>et al.</i> (2013b)	61	Lebiasinidae	Lebiasininae	<i>Lebiasina</i> aff. <i>festae</i>
Este estudo - Santana <i>et al.</i> (2013b)	62	Lebiasinidae	Lebiasininae	<i>Lebiasina bimaculata</i>
Este estudo - Santana <i>et al.</i> (2013b)	63	Lebiasinidae	Lebiasininae	<i>Lebiasina erythrinoides</i>
Este estudo - Santana <i>et al.</i> (2013b)	64	Lebiasinidae	Lebiasininae	<i>Lebiasina melanoguttata</i>
Este estudo - Santana <i>et al.</i> (2013b)	65	Lebiasinidae	Lebiasininae	<i>Lebiasina</i> aff. <i>uruyensis</i>1
Este estudo - Santana <i>et al.</i> (2013b)	66	Lebiasinidae	Lebiasininae	<i>Lebiasina</i> aff. <i>uruyensis</i>2
Este estudo - Santana <i>et al.</i> (2013b)	67	Lebiasinidae	Lebiasininae	<i>Piabucina boruca</i>
Este estudo - Santana <i>et al.</i> (2013b)	68	Lebiasinidae	Lebiasininae	<i>Piabucina elongata</i>
Este estudo - Santana <i>et al.</i> (2013b)	69	Lebiasinidae	Lebiasininae	<i>Piabucina panamensis</i>
Este estudo	70	Lebiasinidae	Pyrrhulininae	<i>Copella nattereri</i>
Este estudo	71	Lebiasinidae	Pyrrhulininae	<i>Copeina</i> sp.
Burns <i>et al.</i> (2009)	72	Lebiasinidae	Pyrrhulininae	<i>Pyrrhulina australis</i>
Verissimo-Silveira (2007)	73	Prochilodontidae		<i>Prochilodus lineatus</i>
Gusmão-Pompiani (2009)	74	Serrasalmididae		<i>Piaractus mesopotamicus</i>
Gusmão-Pompiani (2009)	75	Serrasalmididae		<i>Serrasalmus maculatus</i>
Gusmão-Pompiani (2009)	76	Serrasalmididae		<i>Mylossoma duriventre</i>
Gusmão-Pompiani (2009)	77	Serrasalmididae		<i>Metynnis mola</i>
Gusmão-Pompiani (2003)	78	Triportheidae		<i>Triportheus paranensis</i>

3. Análise das sequências nucleotídicas

3.1 Amostras

Foram realizadas as atividades de extração de DNA, PCR (Polymerase Chain Reaction) e o sequenciamento de 24 espécimens, correspondentes às famílias que constituem a superfamília Erythrinioidea + a família Crenuchidae, além de representantes das famílias Acestrorhynchidae e Iguanodectidae (Tabela 2). As sequências de mais 127 espécimens (Anexo III) provenientes da matriz de dados de Calcagnotto e colaboradores (2005) foram incluídos na matriz final de dados.

Tabela 2. Relação de espécies coletadas para a análise filogenética molecular e os genes efetivamente sequenciados para cada táxon.

Família	Espécie	Nº	Genes obtidos				
			Sia	FKh	16S	Rag2	Cyt b
Crenuchidae: Characidiinae	<i>Ammocryptocharax minutus</i>	1		X	X	X	X
	<i>Elachocharax geryi</i>	2	X	X	X	X	X
	<i>Characidium</i> sp.	3	X	X	X	X	X
	<i>Odontocharacidium aphanes</i>	4	X	X	X	X	X
Crenuchidae: Crenuchinae	<i>Poecilocharax</i> cf. <i>weitzmani</i>	5		X	X	X	
	<i>Crenuchus spilurus</i>	6	X	X	X	X	
	<i>Crenuchus</i> sp.	7	X	X	X	X	X
Ctenoluciidae	<i>Boulengerella cuvieri</i>	8	X	X	X	X	
	<i>Boulengerella maculata</i>	9	X	X	X	X	
Erythrinidae	<i>Erythrinus</i> sp. 1	10	X	X	X	X	
	<i>Erythrinus</i> sp. 2	11	X	X	X	X	X
	<i>Hoplias</i> sp. (Pará)	12	X	X	X	X	X
	<i>Hoplias malabaricus</i>	13	X	X	X	X	X
	<i>Hoplerythrinus uniataeniatus</i>	14	X	X	X	X	X
Lebiasinidae	<i>Copella</i> sp. (Pará)	15	X	X	X	X	
	<i>Copella nattereri</i>	16	X	X	X		
	<i>Pyrrhulina</i> sp. (Pará)	17	X	X	X	X	X
	<i>Nannostomus eques</i>	18	X	X	X	X	
	<i>Nannostomus nitidus</i>	19		X	X	X	X
	<i>Nannostomus marilynae</i>	20		X	X	X	X
Acestrorhynchidae	<i>Nannostomus marginatus</i>	21		X	X		X
	<i>Acestrorhynchus</i> cf. <i>falcistrostris</i>	22	X	X	X	X	
	<i>Acestrorhynchus grandoculis</i>	23	X	X	X	X	X
Iguanodectidae	<i>Iguanodectes</i> sp.	24	X	X	X	X	X

3.2 Obtenção das sequências nucleotídicas

Amostras de tecido, principalmente músculo, foram obtidas a partir de espécimens coletados a fresco. O DNA foi extraído de tecidos preservados em EtOH 95% utilizando o método de extração Salina (Aljanabi e Martinez, 1997). Para a reação de amplificação por PCR foram utilizados os mesmos *primers* utilizados por Calcagnotto e colaboradores (2005) para as sequências parciais dos genes RAG2 (nuclear recombination activating gene), FKh (forkhead), Sia (seven in absentia), 16S e Cyt b (cytochrome b) (Tabela 3). Sendo 16S e Cyt b genes mitocondriais e os genes RAG2, Fkh e Sia nucleares. A reação de PCR (Tabela 4) foi realizada com um total de 25 µl cada (2,5 µl 10mM (NH₄)SO₂ + 0,75 µl 15mM MgCl₂; 1,5 µl 10mM de cada *primer*; 2,5 µl dNTP 200nM; 0,5 µl Amplitaq (Perkin- Elmer); 1 µl de DNA e 14,75 µl dH₂O). As reações de PCR apenas para o gene RAG2 seguiram dois ciclos de amplificação (*Nested* - PCR): um primeiro ciclo (1º PCR) com o par de *primers* descritos por Lovejoy (2001) e o segundo ciclo (2º PCR) com o par descrito por Oliveira e colaboradores (2011), sendo que a primeira amplificação realizada para o gene resultou em um produto de PCR que foi utilizado como molde nas reações com o segundo par de *primers*. Para a reação de sequenciamento, os amplicons foram diretamente sequenciados em ambas as direções (3'-5' e 5'-3') utilizando os mesmos primers utilizados durante a reação de amplificação, utilizando-se Big-Dye (Perkin-Elmer) em termociclador. Após, os produtos da reação de sequenciamento foram purificados por precipitação com etanol e glicogênio, e analisados em sequenciador automático ABI Prism Genetic Analyzer 3100.

Tabela 3. Sequências dos *primers* utilizados para os genes estudados. As sequências estão listadas no sentido 5' para 3'.

Gene	Sequência do <i>primer</i>	Fonte
16S ar	ACG CCT GTT TAT CAA AAA CAT	Palumbi (1996)
16S br	CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T	Palumbi (1996)
Cyt b L 14841	AAA AAG CTT CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA	Kocher <i>et al.</i> (1989)
Cyt b H 15915	AAC TGC CAG TCA TCT CCG GTT TAC AAG AC	Irwing <i>et al.</i> (1991)
sia/T3	ATT AAC CCT CAC TAA AGT CGA GTG CCC CGT GTG YTT YGA YTA	Friesen (1999)
sia/T7	AAT ACG ACT CAC TAT AGG AAG TGG AAG CCG AAG CAG SWY TGC ATC AT	Friesen (1999)
fkh/T3	ATT AAC CCT CAC TAA AGT CCC TAC TCC TAC ATC TCC CTG ATH ACN ATG	Friesen (1999)
fkh/T7	AAT ACG ACT CAC TAT AGC GCA GGT AGC AGC CGT TYT CRA ACA TRT	Friesen (1999)

RAG2 – 1º PCR		
RAG2 aF	TTT GGR CAR AAG GGC TGG CC	Lovejoy (2001)
RAG2 bF	GTR GAR TAG TAG GGC TCC CA	Lovejoy (2001)
RAG2 bR	TGR TCC ARG CAG AAG TAC TT G	Lovejoy (2001)
RAG2 - 2º PCR		
176R	GYGCCATCTCATTCTCCAACA	Oliveira <i>et al.</i> (2011)
Rag2Ri	AGAACAAAAGATCATTGCTGGTCGGG	Oliveira <i>et al.</i> (2011)

Tabela 4. Condições da reação de amplificação (PCR) para cada *primer*.

<i>Primer</i>	Denaturação (95°)	Ciclos	Extensão (72°)
16S	10 minutos	35x 95 °C/30 s, 48 °C/45 s, 72 °C/45 s	7 minutos
Cyt <i>b</i>	5 minutos	30x 95 °C/30 s, 48 °C/45 s, 72 °C/90 s	7 minutos
fkf	5 minutos	30x 95 °C/30 s, 55 °C/30 s, 72 °C/45 s	7 minutos
sia	5 minutos	30x 95 °C/30 s, 60 °C/30 s, 72 °C/45 s	7 minutos
RAG2 – 1º e 2º PCR	5 minutos	30x 95 °C/30 s, 48 °C/45 s, 72 °C/90 s	7 minutos

4. Análise filogenética

4.1 Reconstrução filogenética molecular e de evidência total

Todas as sequências obtidas foram editadas com a utilização do programa Sequencher (Gene Codes Corporation) através de inspeção visual e comparação com seus respectivos eletroferogramas. As sequências foram alinhadas utilizando o programa Muscle (Edgar, 2004) com os parâmetros de *default*, e os alinhamentos foram visualmente checados na busca de erros óbvios de alinhamento. As sequências alinhadas foram analisadas no TNT 1.1 (Goloboff *et al.*, 2008) utilizando Máxima Parcimônia. A análise molecular e de evidência total incluíram representantes de 21 famílias da ordem Characiformes, sendo 04 que compõem Erythrinioidea (Erythrinidae, Ctenoluciidae, Lebiasinidae e Hepsetidae) e 17 das outras famílias (Citharinidae, Distichodontidae, Crenuchidae, Chalceidae, Triportheidae, Acestrorhynchidae, Iguanodectidae, Bryconidae, Characidae, Serrasalminidae, Cynodontidae, Parodontidae, Hemiodontidae, Prochilodontidae, Chilodontidae, Anostomidae, Alestidae). Para análise de evidência total, os caracteres foram concatenados utilizando um script em editor de texto (*.txt) conforme exemplificado na documentação do TNT. Além das sequências obtidas no presente trabalho, foi utilizada a matriz de dados moleculares de Calcagnotto e colaboradores (2005). Foi aplicado o método de busca heurística com 1000 réplicas utilizando o algoritmo TBR, com 100 árvores mantidas na memória a cada replicação. Os *gaps* foram tratados como entradas faltantes

(*missing data*), e todos os caracteres como não ordenados, e as transformações dos caracteres foram igualmente pesadas. Os nós com comprimento igual a zero foram colapsados. O suporte relativo dos nós, na análise molecular e evidência total, foi estimado usando Bootstrap (BT, Felsenstein, 1985) e o suporte de Bremer (BR, Bremer, 1988, 1994). Os valores de Bootstrap foram estimados a partir de 1000 pseudoréplicas, cada uma empregando RAS (Random stepwise addition sequences). Para o suporte de Bremer foi usada a busca heurística com algoritmo TBR.

4.2 Reconstrução filogenética morfológica

A matriz de caracteres foi construída e editada utilizando-se o programa WinClada (versão 1.00.18), e o conjunto de dados obtidos foram tratados como não-ordenados. Para esta análise filogenética, que envolve grupos com diferentes eventos durante a espermiogênese, os caracteres oriundos da espermiogênese e dos espermatozoides foram descritos na sua unidade e não como tipos. Alguns caracteres foram tratados como dependentes da espermiogênese, seguindo a proposição realizada por Baicere-Silva (2013). Para testar a monofiletismo da superfamília Erythrinioidea com base nos caracteres espermáticos, foram incluídos representantes das quatro famílias que a compõe: Ctenoluciidae, Erythrinidae, Hepsetidae e Lebiasinidae, de acordo com a proposta de Buckup (1998). Ainda, considerando principalmente a proposta de relações filogenéticas de Calcagnotto e colaboradores (2005), foram incluídos representantes das famílias de Characiformes africanos Distichodontidae, Citharinidae e Alestidae, além das famílias neotropicais Bryconidae, Chalceidae, Crenuchidae, Characidae, Acestrorhynchidae, Cynodontidae, Serrasalminidae, Prochilodontidae, Anostomidae e Curimatidae, conforme a tabela 1. A matriz foi enraizada em *Pimelodella* sp. (ordem Siluriformes). A análise de parcimônia foi realizada utilizando-se o programa TNT 1.1 (Goloboff *et al.*, 2008). Para análise computacional foi empregado o algoritmo de busca tradicional, com 1000 réplicas (com retenção de até 100 árvores na memória por replicação) com o algoritmo TBR (tree bisection-reconnection). Após a busca heurística, as árvores igualmente parcimoniosas foram submetidas novamente ao TBR para garantir que todas as árvores ótimas tenham sido encontradas. Os valores de suporte foram calculados através do Bremer utilizando a árvore de consenso estrito através de busca heurística utilizando o algoritmo TBR.

RESULTADOS

1. Dados morfológicos

1.1 Descrição do processo de espermiogênese

A descrição da espermiogênese foi organizada por família. Nos casos em que não há diferença nos padrões de espermiogênese observados entre os táxons de uma mesma família ou gênero, preferencialmente foi realizada uma descrição representativa para estes táxons. A espermiogênese não foi obtida para a espécie *Chalceus epakros* devido à condição inadequada de fixação do material.

Espermiogênese na família Alestidae

Alestopetersius compressus, *Arnoldichthys spilopterus*, *Micralestes acutidens*, *Rhabdalestes rhodesiensis*

Os detalhes da espermiogênese são similares entre os quatro táxons analisados, e é apresentada uma descrição geral para eles. Nas espermatídes iniciais, o núcleo é esférico e apresenta cromatina finamente granular e homogeneamente distribuída (Figs. 10A-B). O complexo centriolar posiciona-se lateralmente ao núcleo e está ancorado na membrana plasmática (Fig. 10A). O centríolo proximal é anterior e oblíquo em relação ao centríolo distal (Fig. 10A-B). O centríolo distal diferencia-se em corpúsculo basal e organiza o axonema do flagelo em formação. O complexo centriolar migra em direção ao núcleo. O núcleo se movimenta sobre o complexo centriolar, no local onde uma depressão, a fossa nuclear, é formada no contorno nuclear, na altura do complexo centriolar. A massa de organelas está dispersa ao redor do núcleo, na região oposta ao complexo centriolar (Fig. 10A). A cromatina inicia gradualmente um processo sincrônico de condensação (Fig. 10A-C). Em *Alestopetersius compressus*, o núcleo sofre uma rotação completa em direção ao flagelo em desenvolvimento assumindo uma posição excêntrica (Fig. 10B); em *Arnoldichthys spilopterus*, *Micralestes acutidens*, *Rhabdalestes rhodesiensis* a rotação nuclear é parcial em direção ao flagelo em desenvolvimento, assumindo uma posição fortemente excêntrica (Fig. 10C). Com o processo de rotação nuclear, o citoplasma também se desloca em direção ao eixo flagelar, originando a peça intermediária (Fig. 10C). Como o centríolo distal está ancorado na membrana plasmática, no momento em que o citoplasma desloca-se em direção ao eixo flagelar, ele circunda o segmento inicial do flagelo, formando o canal citoplasmático (Fig. 10A, C). A peça intermediária é fortemente assimétrica em relação ao eixo flagelar (Fig. 10C). O axonema do flagelo é representado pelo arranjo clássico, 9+2 (não mostrado).

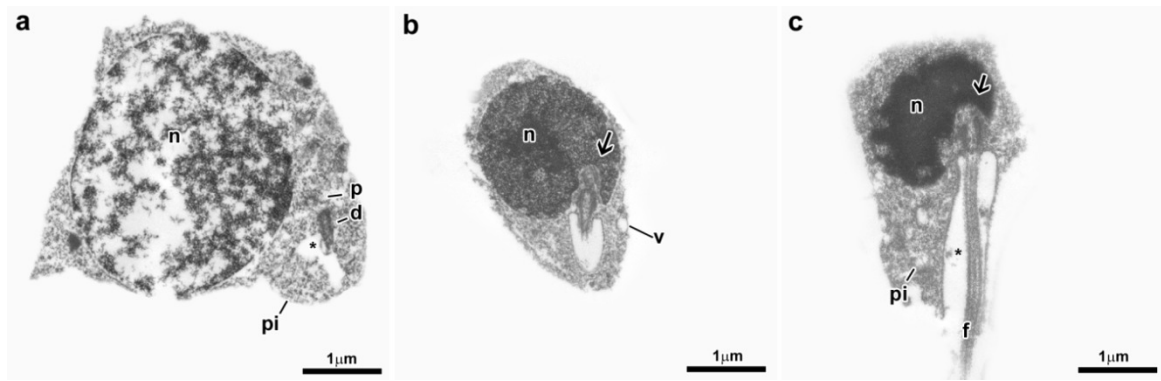


Figura 10. Espermiogênese representativa para *Alestopetersius compressus*, *Arnoldichthys spilopterus*, *Micralestes acutidens*, *Rhabdalestes rhodesiensis*. As eletromicrografias são cortes longitudinais correspondentes a (A, B) *Alestopetersius compressus* e (C) *Micralestes acutidens*. O flagelo é inicialmente lateral ao núcleo. A rotação nuclear está presente, sendo completa em *Alestopetersius compressus* (B), e incompleta em *Arnoldichthys spilopterus*, *Micralestes acutidens*, *Rhabdalestes rhodesiensis* (C). Legendas: d: centríolo distal, f: flagelo, n: núcleo, p: centríolo proximal, pi: peça intermediária, v: vesícula, asterisco: canal citoplasmático, seta: fossa nuclear.

Brachypetersius altus

O núcleo da espermátide inicial é esférico e apresenta cromatina granular e homogeneamente distribuída (Fig. 11A). O complexo centriolar posiciona-se lateralmente ao núcleo e está ancorado na membrana plasmática (Fig. 11A). O centríolo proximal é aparentemente perpendicular em relação ao centríolo distal (Fig. 11A-B). Estes estão ancorados, respectivamente, ao envelope nuclear e à membrana plasmática, e também um em relação ao outro, por fibrilas de estabilização. O centríolo distal diferencia-se em corpúsculo basal e organiza o axonema do flagelo em formação. O complexo centriolar migra em direção ao núcleo (Fig. 11C). O núcleo se movimenta sobre o complexo centriolar, então, uma depressão, a fossa nuclear, é formada no contorno nuclear, na altura do complexo centriolar (Fig. 11D). A massa de organelas está dispersa ao redor do núcleo, na região oposta ao complexo centriolar (Fig. 11A). A cromatina inicia gradualmente um processo sincrônico de condensação (Fig. 11A-D). O núcleo sofre uma rotação em direção ao flagelo em desenvolvimento e assume uma posição medial (Fig. 11B-D). Com o processo de rotação nuclear, o citoplasma também se desloca em direção ao eixo flagelar, originando a peça intermediária (Fig. 11D). Como o centríolo distal está ancorado na membrana plasmática, no momento em que o citoplasma desloca-se em direção ao eixo flagelar, ele circunda o segmento inicial do flagelo, formando o canal citoplasmático (Fig. 11D). A peça intermediária é assimétrica em relação ao eixo flagelar e contém as mitocôndrias e as vesículas (Fig. 11D). O axonema do flagelo é representado pelo arranjo clássico, 9+2 (não mostrado).

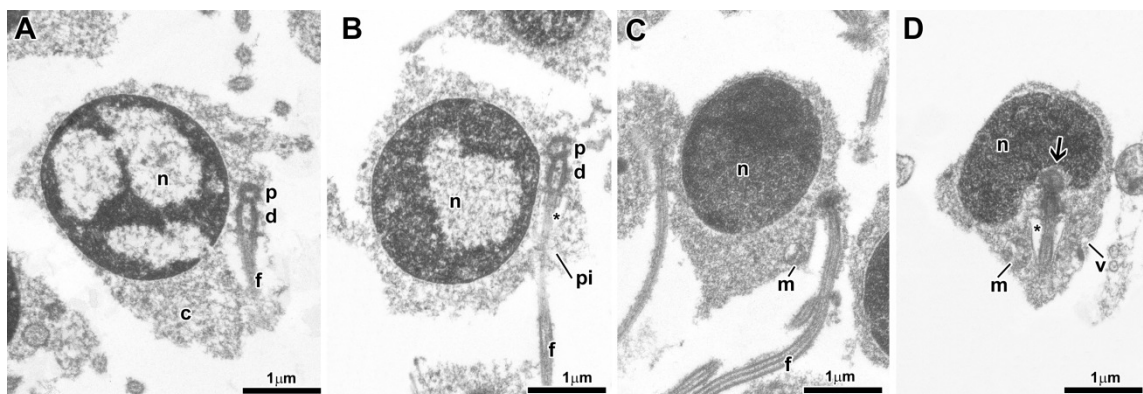


Figura 11. Espermiogênese em *Brachypetersius altus*. A – D. Cortes longitudinais a partir da espermátide inicial (A) até a espermátide final (D). Note que o núcleo inicialmente é lateral ao flagelo e ao complexo centriolar. A rotação nuclear ocorre, com o núcleo deslocando-se em direção ao flagelo, sobre o complexo centriolar, assumindo uma posição medial na espermátide final (D). Legenda: c: citoplasma, d: centríolo distal, f: flagelo, m: mitocôndria, n: núcleo, p: centríolo proximal, pi: peça intermediária, v: vesícula, asterisco: canal citoplasmático em formação, seta: fossa nuclear.

Bricynus imberi

O núcleo da espermatíde inicial é esférico e apresenta cromatina granular e homogeneamente distribuída (Fig. 12A). O complexo centriolar posiciona-se lateralmente ao núcleo e está ancorado na membrana plasmática (Fig. 12B-D). O centríolo proximal é aparentemente perpendicular em relação ao centríolo distal (Fig. 12D). Estes estão ancorados, respectivamente, ao envelope nuclear e à membrana plasmática, e também um em relação ao outro, por fibrilas de estabilização. O centríolo distal diferencia-se em corpúsculo basal e organiza o axonema do flagelo em formação. O complexo centriolar migra em direção ao núcleo. O núcleo se movimenta sobre o complexo centriolar, então, uma depressão, a fossa nuclear, é formada no contorno nuclear, na altura do complexo centriolar (Fig. 12C-E). A massa de organelas está dispersa ao redor do núcleo, na região oposta ao complexo centriolar (Fig. 12A-D). A cromatina inicia gradualmente um processo sincrônico de condensação (Fig. 12B-E). O núcleo sofre uma rotação em direção ao flagelo em desenvolvimento e assume uma posição medial (Fig. 12B-F). Com o processo de rotação nuclear, o citoplasma também se desloca em direção ao eixo flagelar, originando a peça intermediária (Fig. 12F). Como o centríolo distal está ancorado na membrana plasmática, no momento em que o citoplasma desloca-se em direção ao eixo flagelar, ele circunda o segmento inicial do flagelo, formando o canal citoplasmático (Fig. 12D-F). A peça intermediária é ligeiramente assimétrica em relação ao eixo flagelar e contém as mitocôndrias e as vesículas (Fig. 12F). O axonema do flagelo é representado pelo arranjo clássico, 9+2 (não mostrado).

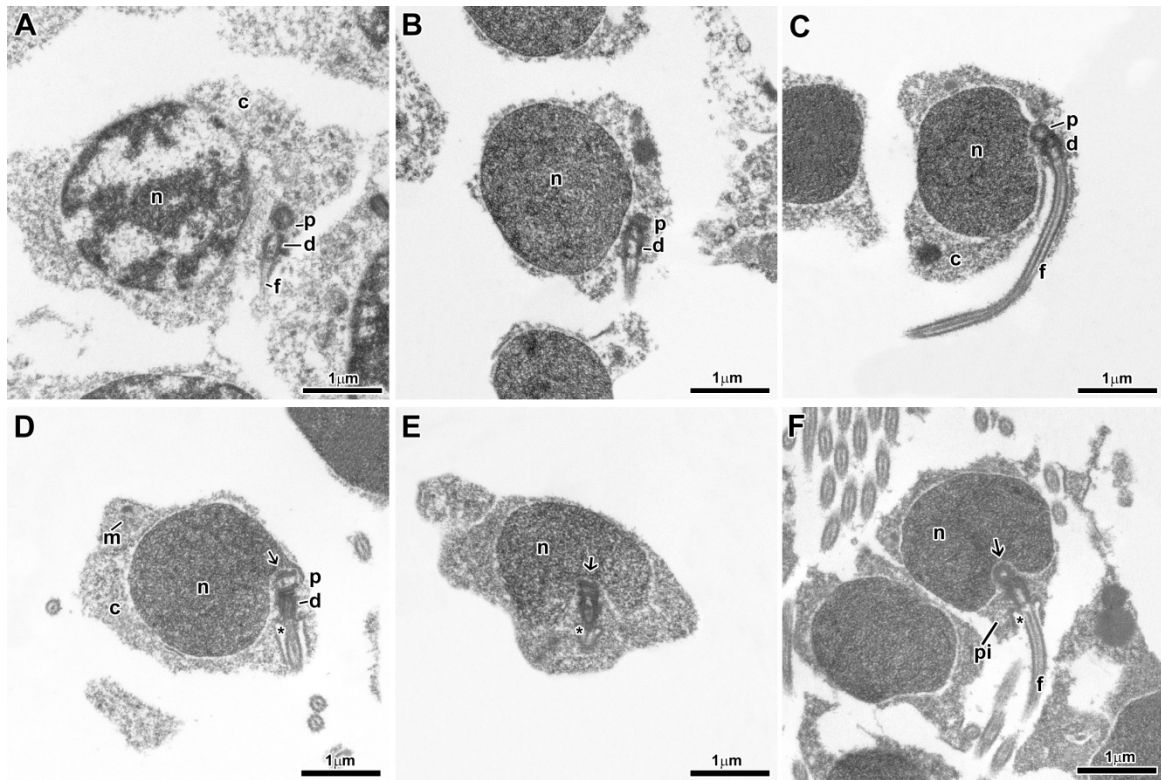


Figura 12. Espermiogênese em *Brycinus imberi*. Cortes longitudinais a partir da espermatíde inicial (A) até a espermatíde final (F). Note que o núcleo inicialmente é lateral ao flagelo e ao complexo centriolar. A rotação nuclear ocorre, com o núcleo deslocando-se em direção ao flagelo, sobre o complexo centriolar, assumindo uma posição medial na espermatíde final (F). Legenda: c: citoplasma, d: centríolo distal, f: flagelo, m: mitocôndria, n: núcleo, p: centríolo proximal, pi: peça intermediária, asterisco: canal citoplasmático em formação, seta: fossa nuclear.

Brycinus lateralis

O núcleo da espermatíde inicial é esférico e apresenta cromatina granular e homogeneamente distribuída (Fig. 13A). O complexo centriolar posiciona-se lateralmente ao núcleo e está ancorado na membrana plasmática (Fig. 13A-B). O centríolo proximal é aparentemente perpendicular em relação ao centríolo distal (Fig. 13A-D). Estes estão ancorados, respectivamente, ao envelope nuclear e à membrana plasmática, e também um em relação ao outro, por fibrilas de estabilização. O centríolo distal diferencia-se em corpúsculo basal e organiza o axonema do flagelo em formação. O complexo centriolar migra em direção ao núcleo. O núcleo se movimenta sobre o complexo centriolar, então, uma depressão, a fossa nuclear, é formada no contorno nuclear, na altura do complexo centriolar (Fig. 13B-E). A massa de organelas está dispersa ao redor do núcleo, na região oposta ao complexo centriolar (Fig. 13B-D). A cromatina inicia gradualmente um processo sincrônico de condensação. O núcleo sofre uma rotação em direção ao flagelo em desenvolvimento e assume uma posição medial (Fig. 13B-F). Com o processo de rotação nuclear, o citoplasma também se desloca em direção ao eixo flagelar, originando a peça intermediária (Fig. 13D-F). Como o centríolo distal está ancorado na membrana plasmática, no momento em que o citoplasma desloca-se em direção ao eixo flagelar, ele circunda o segmento inicial do flagelo, formando o canal citoplasmático (Fig. 13D-F). A peça intermediária é ligeiramente assimétrica em relação ao eixo flagelar e contém as mitocôndrias e as vesículas (Fig. 13F). O axonema do flagelo é representado pelo arranjo clássico, 9+2 (não mostrado).

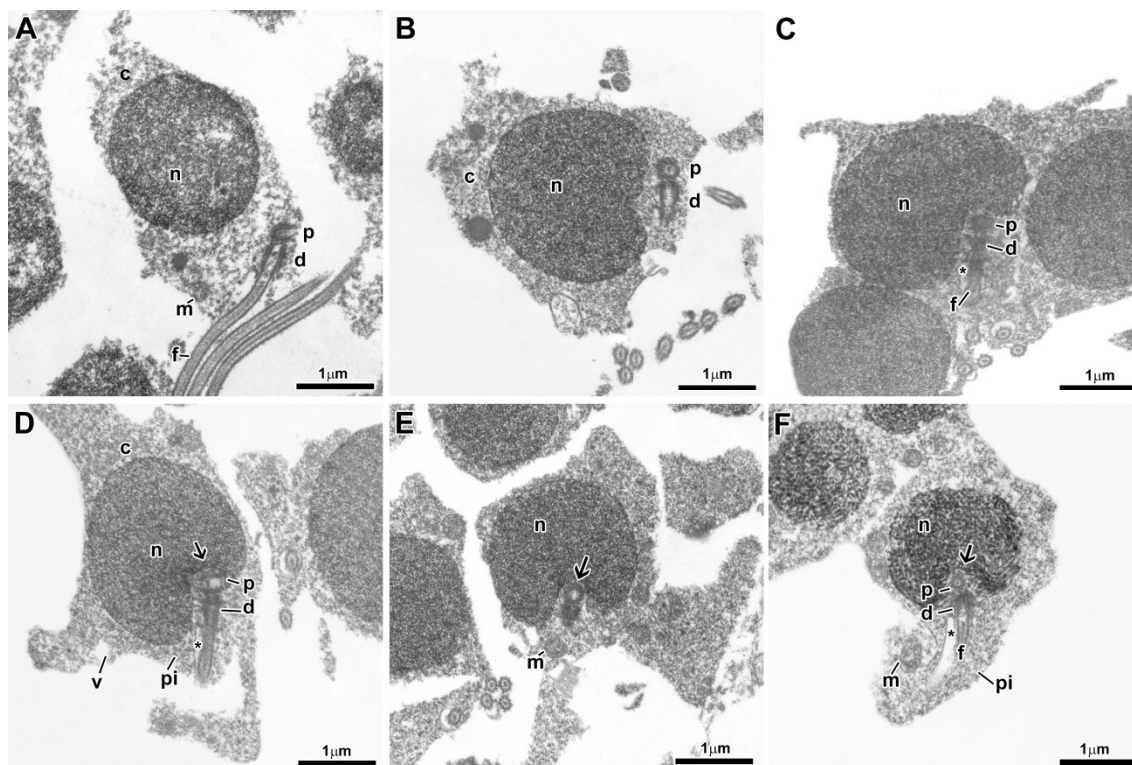


Figura 13. Espermiação em *Brycinus lateralis*. Cortes longitudinais a partir da espermátide inicial (A) até a espermátide final (F). Note que o núcleo inicialmente é lateral ao flagelo e ao complexo centriolar. A rotação nuclear ocorre, com o núcleo deslocando-se em direção ao flagelo, sobre o complexo centriolar, assumindo uma posição medial na espermátide final (F). Legenda: c: citoplasma, d: centríolo distal, f: flagelo, m: mitocôndria, n: núcleo, p: centríolo proximal, pi: peça intermediária, v: vesícula, asterisco: canal citoplasmático em formação, seta: fossa nuclear.

Bryconalestes longipinnis

O núcleo da espermátide inicial é esférico e apresenta cromatina granular e homogeneamente distribuída (Fig. 14A). O complexo centriolar posiciona-se lateralmente ao núcleo e está ancorado na membrana plasmática (Fig. 14A). O centríolo proximal é aparentemente perpendicular em relação ao centríolo distal (Fig. 14A). Estes estão ancorados, respectivamente, ao envelope nuclear e à membrana plasmática, e também um em relação ao outro, por fibrilas de estabilização. O centríolo distal diferencia-se em corpúsculo basal e organiza o axonema do flagelo em formação. O complexo centriolar migra em direção ao núcleo. O núcleo se movimenta sobre o complexo centriolar, então, uma depressão, a fossa nuclear, é formada no contorno nuclear, na altura do complexo centriolar. A massa de organelas está dispersa ao redor do núcleo, na região oposta ao complexo centriolar (Fig. 14A). A cromatina inicia gradualmente um processo sincrônico de condensação (Fig. 14A-D). O núcleo sofre uma rotação em direção ao flagelo em desenvolvimento e assume uma posição medial (Fig. 14A-D). Com o processo de rotação nuclear, o citoplasma também se desloca em direção ao eixo flagelar, originando a peça intermediária (Fig. 14B-D). Como o centríolo distal está ancorado na membrana plasmática, no momento em que o citoplasma desloca-se em direção ao eixo flagelar, ele circunda o segmento inicial do flagelo, formando o canal citoplasmático (Fig. 14B, D). A peça intermediária é ligeiramente assimétrica em relação ao eixo flagelar e contém as mitocôndrias e as vesículas (Fig. 14D). O axonema do flagelo é representado pelo arranjo clássico, 9+2 (não mostrado).

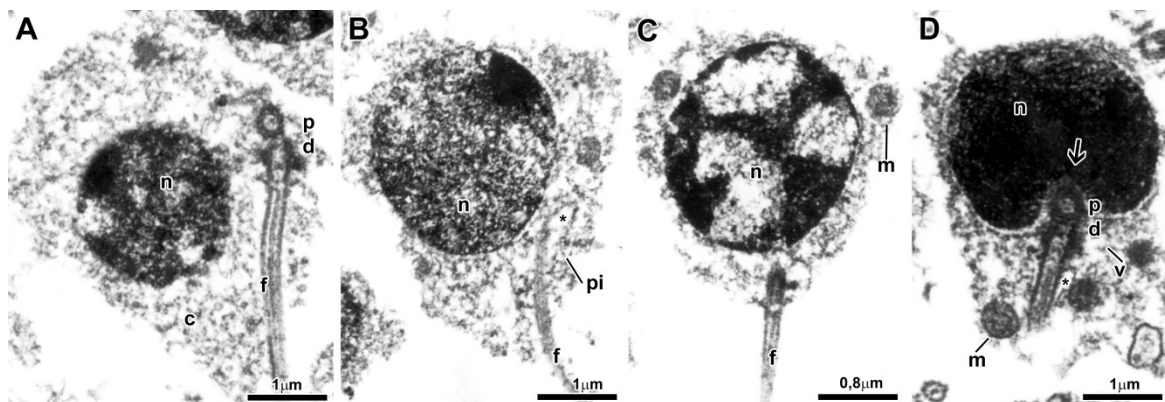


Figura 14. Espermiogênese em *Bryconalestes longipinnis*. A – D. Cortes longitudinais a partir da espermatíde inicial (A) até a espermatíde final (D). Note que o núcleo inicialmente é lateral ao flagelo e ao complexo centriolar. A rotação nuclear ocorre, com o núcleo deslocando-se em direção ao flagelo, sobre o complexo centriolar, assumindo uma posição medial na espermatíde final (D). Legenda: c: citoplasma, d: centríolo distal, f: flagelo, m: mitocôndria, n: núcleo, p: centríolo proximal, pi: peça intermediária, v: vesícula, asterisco: canal citoplasmático em formação, seta: fossa nuclear.

Família Crenuchidae

Subfamília Characidiinae

Characidium sp.

As informações da espermiogênese utilizadas neste estudo, na seção discussão e na matriz de caracteres para *Characacidium sp.*, foram aquelas descritas por Veríssimo-Silveira (2007) utilizando a espécie *Characidium gomesi*.

Subfamília Crenuchinae

Crenuchus spilurus

O núcleo da espermátide inicial é esférico e apresenta cromatina granular e homogeneamente distribuída (Fig. 15A). O complexo centriolar posiciona-se lateralmente ao núcleo e está ancorado na membrana plasmática (Fig. 15A). O centríolo proximal é antero-lateral em relação ao centríolo distal (Fig. 15A). Estes estão ancorados, respectivamente, ao envelope nuclear e à membrana plasmática, e também um em relação ao outro, por fibrilas de estabilização. O centríolo distal diferencia-se em corpúsculo basal e organiza o axonema do flagelo em formação. O complexo centriolar migra em direção ao núcleo. O núcleo se movimenta sobre o complexo centriolar, e então, uma depressão, a fossa nuclear dupla, é formada no contorno nuclear, na altura do complexo centriolar (15A, C). A massa de organelas está dispersa ao redor do núcleo, na região oposta ao complexo centriolar (Fig. 15A). A cromatina inicia gradualmente um processo sincrônico de condensação (Fig. 15A-C). O núcleo sofre uma rotação em direção ao flagelo em desenvolvimento e assume uma posição medial (Fig. 15C). Com o processo de rotação nuclear, o citoplasma também se desloca em direção ao eixo flagelar, originando a peça intermediária (Fig. 15A, C). Como o centríolo distal está ancorado na membrana plasmática, no momento em que o citoplasma desloca-se em direção ao eixo flagelar, ele circunda o segmento inicial do flagelo, formando o canal citoplasmático (Fig. 15C). A peça intermediária é simétrica em relação ao eixo flagelar e contém as mitocôndrias e as vesículas (Fig. 15A, C). O axonema do flagelo é representado pelo arranjo clássico, 9+2 (não mostrado).

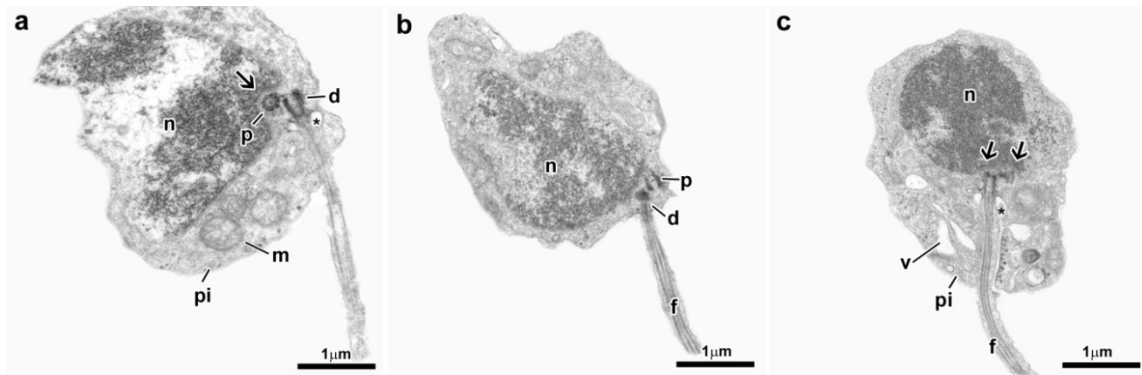


Figura 15. Espermiogênese em *Crenuchus spilurus*. A – C. Cortes longitudinais a partir da espermátide inicial (A) até a espermátide final (C). Note que o núcleo é inicialmente lateral ao flagelo e ao complexo centriolar. A rotação nuclear ocorre, com o núcleo deslocando-se em direção ao flagelo, sobre o complexo centriolar, assumindo uma posição medial na espermátide final (C). Legenda: d: centríolo distal, f: flagelo, m: mitocôndria, n: núcleo, p: centríolo proximal, pi: peça intermediária, v: vesícula, asterisco: canal citoplasmático em formação, seta: fossa nuclear.

Família Ctenoluciidae

Boulengerella cuvieri

O núcleo da espermatíde inicial é esférico e apresenta cromatina granular e homogeneamente distribuída (Fig. 16A). O complexo centriolar posiciona-se lateralmente ao núcleo e está ancorado na membrana plasmática (Fig. 16A). O centríolo proximal é ligeiramente oblíquo a perpendicular em relação ao centríolo distal (Fig. 16B-inset). Estes estão ancorados, respectivamente, ao envelope nuclear e à membrana plasmática, e também um em relação ao outro, por fibrilas de estabilização. O centríolo distal diferencia-se em corpúsculo basal e organiza o axonema do flagelo em formação. O complexo centriolar migra em direção ao núcleo. O núcleo se movimenta sobre o complexo centriolar, então, uma depressão, a fossa nuclear, é formada no contorno nuclear, na altura do complexo centriolar (Fig. 16B-C). A massa de organelas está dispersa ao redor do núcleo, na região oposta ao complexo centriolar (Fig. 16A-C). A cromatina inicia gradualmente um processo sincrônico de condensação. O núcleo sofre uma rotação em direção ao flagelo em desenvolvimento e assume uma posição medial (Fig. 16B-E). Com o processo de rotação nuclear, o citoplasma também se desloca em direção ao eixo flagelar, originando a peça intermediária (Fig. 16D-F). Como o centríolo distal está ancorado na membrana plasmática, no momento em que o citoplasma desloca-se em direção ao eixo flagelar, ele circunda o segmento inicial do flagelo, formando o canal citoplasmático (Fig. 16F). A peça intermediária é ligeiramente assimétrica em relação ao eixo flagelar e contém as mitocôndrias e as vesículas (Fig. 16F). O axonema do flagelo é representado pelo arranjo clássico, 9+2 (não mostrado).

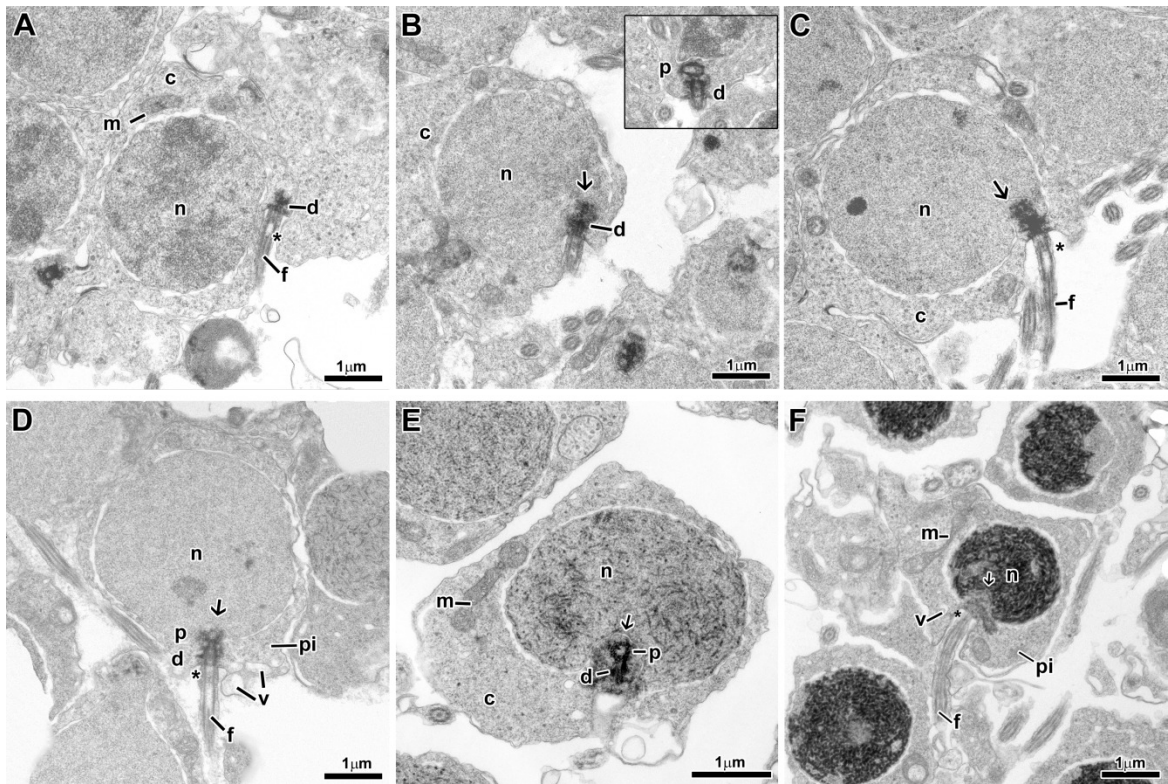


Figura 16. Espermiogênese em *Boulengerella cuvieri*. Cortes longitudinais a partir da espermátide inicial (A) até a espermátide final (F). Note que o núcleo inicialmente é lateral ao flagelo e ao complexo centriolar. A rotação nuclear ocorre, com o núcleo deslocando-se em direção ao flagelo, sobre o complexo centriolar, assumindo uma posição medial na espermátide final (F). Legenda: c: citoplasma, d: centríolo distal, f: flagelo, m: mitocôndria, n: núcleo, p: centríolo proximal, pi: peça intermediária, v: vesícula, asterisco: canal citoplasmático em formação, seta: fossa nuclear.

Ctenolucius hujeta

O núcleo da espermatíde inicial é esférico e apresenta cromatina granular e homogeneamente distribuída (Fig. 17a). O complexo centriolar posiciona-se lateralmente ao núcleo e está ancorado na membrana plasmática (Fig. 17a, b). O centríolo proximal é ligeiramente oblíquo a perpendicular em relação ao centríolo distal (Fig. 17b). Estes estão ancorados, respectivamente, ao envelope nuclear e à membrana plasmática, e também um em relação ao outro, por fibrilas de estabilização. O centríolo distal diferencia-se em corpúsculo basal e organiza o axonema do flagelo em formação. O complexo centriolar migra em direção ao núcleo. O núcleo se movimenta sobre o complexo centriolar, então, uma depressão, a fossa nuclear, é formada no contorno nuclear, na altura do complexo centriolar (Fig. 17b, d). As organelas estão dispersas ao redor do núcleo, na região oposta ao complexo centriolar. A cromatina inicia gradualmente um processo sincrônico de condensação. O núcleo sofre uma rotação em direção ao flagelo em desenvolvimento e assume uma posição medial (Fig. 17b-d). Com o processo de rotação nuclear, o citoplasma também se desloca em direção ao eixo flagelar, originando a peça intermediária (Fig. 17b-d). Como o centríolo distal está ancorado na membrana plasmática, no momento em que o citoplasma desloca-se em direção ao eixo flagelar, ele circunda o segmento inicial do flagelo, formando o canal citoplasmático (Fig. 17b-d). A peça intermediária é ligeiramente assimétrica em relação ao eixo flagelar e contém as mitocôndrias e as vesículas (Fig. 17b-d). O axonema do flagelo é representado pelo arranjo clássico, 9+2 (não mostrado).

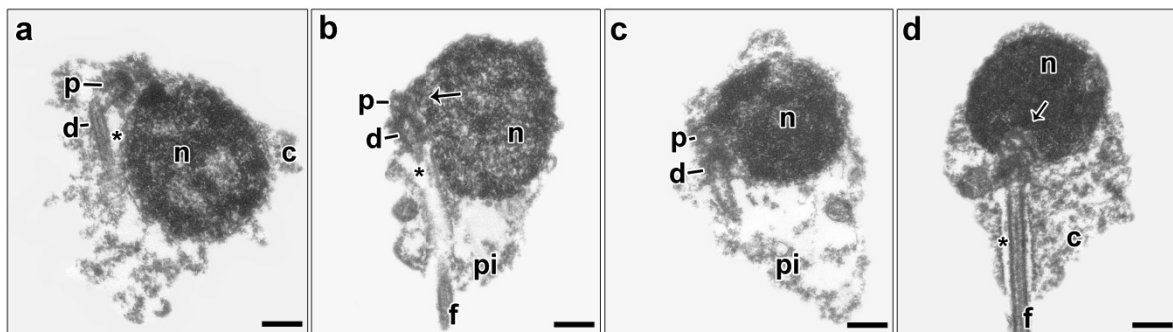


Figura 17. Espermiogênese em *Ctenolucius hujeta*. Cortes longitudinais a partir da espermátide inicial (A) até a espermátide final (D). Note que o núcleo inicialmente é lateral ao flagelo e ao complexo centriolar. A rotação nuclear ocorre, com o núcleo deslocando-se em direção ao flagelo, sobre o complexo centriolar, assumindo uma posição medial na espermátide final (D). Legenda: c: citoplasma, d: centríolo distal, f: flagelo, n: núcleo, p: centríolo proximal, pi: peça intermediária, asterisco: canal citoplasmático em formação, seta: fossa nuclear. Barra: 0,5 μm .

Espermiogênese na família Distichodontidae

Nannocharax sp. (Este táxon está sendo utilizado como representativo para toda a família)

O núcleo da espermátide inicial é esférico e apresenta cromatina granular e homogeneamente distribuída (Fig. 18A). O complexo centriolar posiciona-se excêntrico à medial ao núcleo e está ancorado na membrana plasmática (Fig. 18A). Estes estão ancorados, respectivamente, ao envelope nuclear e à membrana plasmática, e também um em relação ao outro, por fibrilas de estabilização. O centríolo distal diferencia-se em corpúsculo basal e organiza o axonema do flagelo em formação. O complexo centriolar migra em direção ao núcleo. O núcleo se movimenta sobre o complexo centriolar (Fig. 18B). A fossa nuclear não é formada no contorno nuclear (Fig. 18B-C). A massa de organelas está dispersa ao redor do núcleo, na região oposta ao complexo centriolar (Fig. 18A-C). O núcleo sofre uma rotação em direção ao flagelo em desenvolvimento e assume uma posição medial (Fig. 18B-F). A cromatina inicia gradualmente um processo assíncrono de condensação, a partir da base para o ápice do núcleo (Fig. 18D-F). Nesta etapa, o núcleo inicia o processo de alongamento em direção oposta ao flagelo (Fig. 18F), e torna-se com o formato mais próximo daquele encontrado no espermatozoide, cônico. Com o processo de rotação nuclear, o citoplasma também se desloca em direção ao eixo flagelar, originando a peça intermediária (Fig. 18F). Como o centríolo distal está ancorado na membrana plasmática, no momento em que o citoplasma desloca-se em direção ao eixo flagelar, ele circunda o segmento inicial do flagelo, formando o canal citoplasmático. A peça intermediária é ligeiramente assimétrica em relação ao eixo flagelar e contém as mitocôndrias e as vesículas (Fig. 18F). O axonema do flagelo é representado pelo arranjo clássico, 9+2 (não mostrado).

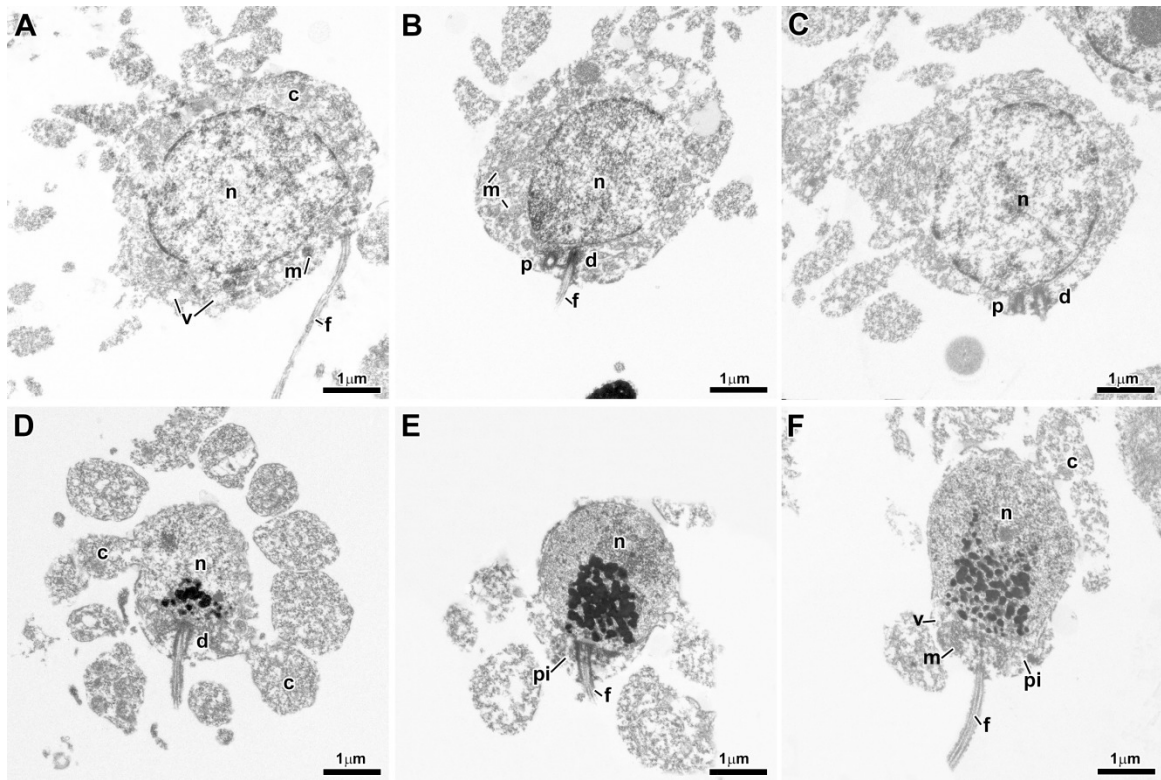


Figura 18. Espermiogênese em *Nannocharax* sp. Cortes longitudinais a partir da espermatíde inicial (A) até a espermatíde final (F). Note que o núcleo inicialmente é excêntrico à medial ao flagelo e ao complexo centriolar. A rotação nuclear ocorre, com o núcleo deslocando-se em direção ao flagelo, sobre o complexo centriolar, assumindo uma posição medial na espermatíde final (F). Note em (D) o excesso de citoplasma (c) sendo liberado a partir da espermatíde intermediária. Em (F) o núcleo inicia o processo de alongamento em direção oposto ao eixo flagelar. Legenda: c: citoplasma, d: centríolo distal, f: flagelo, m: mitocôndria, n: núcleo, p: centríolo proximal, pi: peça intermediária, v: vesícula, asterisco: canal citoplasmático em formação, seta: fossa nuclear.

Família Hepsetidae

Hepsetus odoe

Nas espermatídes iniciais o núcleo é esférico, preenchido por cromatina granular e homogeneamente distribuída e circundado por citoplasma contendo as organelas (Fig. 19A). O complexo centriolar dispõe-se lateralmente ao núcleo (Fig. 19A). O centríolo proximal é anterior e oblíquo em relação ao distal (Fig. 19A). O centríolo distal diferencia-se em corpúsculo basal e organiza o axonema do flagelo. O complexo centriolar não migra em direção ao núcleo. O núcleo desloca-se ligeiramente em direção ao complexo centriolar, permanecendo apenas uma pequena porção dele cobrindo o complexo centriolar (Fig. 19B, C). Uma única depressão rasa, a fossa nuclear, é formada no contorno nuclear, na altura do complexo centriolar (Fig. 19C). O citoplasma desloca-se em direção ao eixo flagelar formando a peça intermediária (Fig. 19A, C). Como o centríolo distal está ancorado à membrana plasmática, no momento em que o citoplasma desloca-se em direção ao flagelo, ele circunda o segmento inicial do flagelo formando o canal citoplasmático (Fig. 19B, C). A compactação da cromatina avança gradativamente (Fig. 19A-C). A peça intermediária é baso-lateral ao flagelo sendo, conseqüentemente, fortemente assimétrica. Mitocôndrias alongadas e vesículas estão presentes na peça intermediária (Fig. 19A, C). Nas espermatídes finais, a cromatina é altamente condensada preenchendo todo o núcleo (Fig. 19C). O flagelo possui o axonema com arranjo clássico (9 + 2) e não foram observadas aletas flagelares (não mostrado).

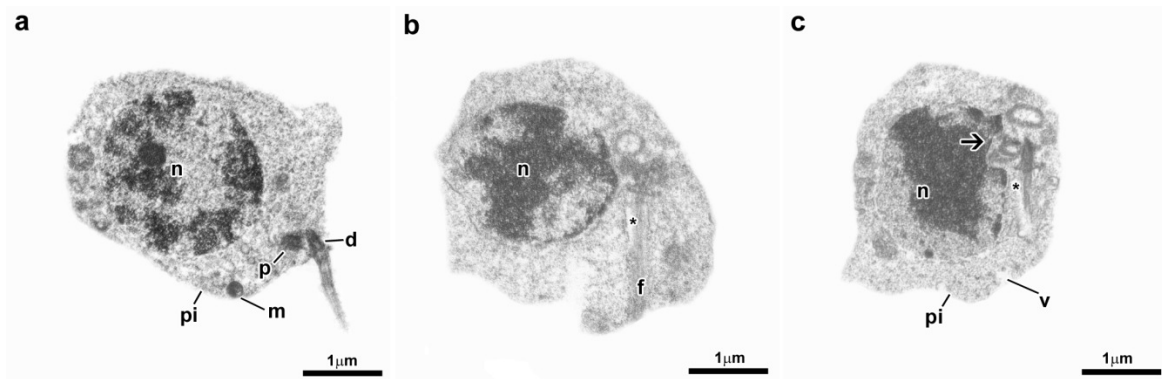


Figura 19. Espermiogênese de *Hepsetus odoe*. As fotomicrografias são cortes longitudinais das espermátide inicial (A) até a final (C). O flagelo (f) é inicialmente lateral núcleo (n). O núcleo não sofre rotação em direção ao eixo flagelar (f). Consequentemente o complexo centriolar (p, d) e a fossa nuclear (seta) são laterais. O citoplasma desloca-se em direção ao eixo flagelar e forma a peça intermediária (pi). Legendas: asterisco: canal citoplasmático, seta: fossa nuclear, m: mitocôndria, v: vesícula.

Família Lebiasinidae

Subfamília Lebiasininae

Lebiasina aff. *festae*, *L. bimaculata*, *L. erythrinoides*, *L. melanoguttata*, *L. aff. uruyensis*¹, *L. aff. uruyensis*², *Piabucina boruca*, *P. elongata* e *P. panamensis*

Nas espermatídes iniciais o núcleo é esférico, preenchido por cromatina granular e homogeneamente distribuída e circundado por citoplasma contendo as organelas (Fig. 20a). O complexo centriolar dispõe-se lateralmente ao núcleo (Fig. 20a). O centríolo proximal é anterior e ligeiramente oblíquo em relação ao distal (Fig. 20a, b). No complexo centriolar duas raízes estriadas irradiam-se a partir dos lados opostos do centríolo distal (Fig. 20b-inset). O centríolo distal diferencia-se em corpúsculo basal e organiza o axonema do flagelo. O complexo centriolar não migra em direção ao núcleo. O núcleo desloca-se ligeiramente em direção ao complexo centriolar e depois retorna, permanecendo apenas uma pequena porção dele cobrindo o complexo centriolar (Fig. 20b, c, d). Uma depressão dupla e rasa, a fossa nuclear, é formada no contorno nuclear, na altura do complexo centriolar (Fig. 20b). O citoplasma desloca-se em direção ao eixo flagelar formando a peça intermediária (Fig. 20b, d). Como o centríolo distal está ancorado à membrana plasmática, no momento em que o citoplasma desloca-se em direção ao flagelo, ele circunda o segmento inicial do flagelo formando o canal citoplasmático (Fig. 20b, d). A compactação da cromatina avança e o núcleo alonga-se ligeiramente em direção ao eixo flagelar (Fig. 20d). A peça intermediária é baso-lateral ao flagelo sendo, conseqüentemente, fortemente assimétrica. Algumas mitocôndrias oblongas e vesículas estão presentes na peça intermediária. Nas espermatídes finais, a cromatina é altamente condensada preenchendo todo o núcleo (Fig. 20d). Não foram observadas aletas flagelares (Fig. 20d).

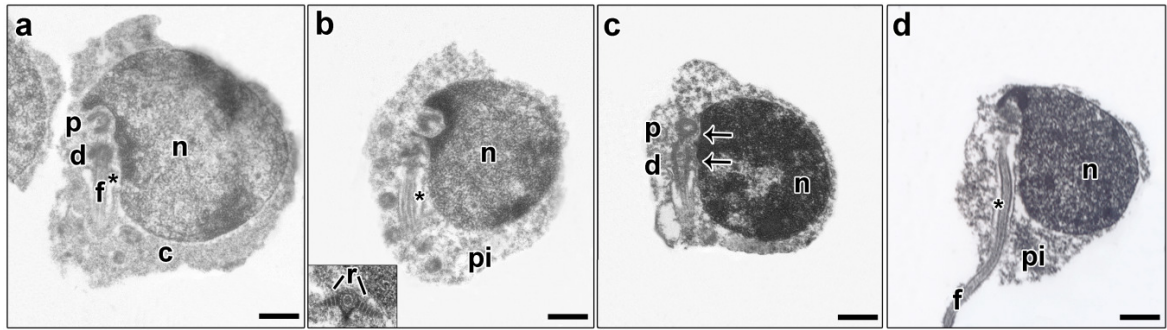


Figura 20. Espermiogênese representativa para as espécies dos gêneros *Lebiasina* e *Piabucina*. As fotomicrografias são cortes longitudinais das espermatídes iniciais (A, B) até as finais (C, D) correspondendo à (A) *Lebiasina* aff. *uruyensis*1, (B) *L.* aff. *uruyensis*1, (C) *Piabucina* *boruca* e (D) *P.* *elongata*. O flagelo (f) é inicialmente lateral núcleo (n). O núcleo sofre uma rotação breve e incompleta em direção ao eixo flagelar (f). Consequentemente o complexo centriolar (p, d) e a fossa nuclear (seta) são superolaterais. Durante a espermiogênese ocorre a formação de duas raízes estriadas (r - inset) nos dois lados opostos do centríolo distal (d). O citoplasma (c) desloca-se em direção ao eixo flagelar e forma a peça intermediária (pi). asterisco: canal citoplasmático, seta: fossa nuclear. Barras: 0,5 μ m.

Família Lebiasinidae

Subfamília Pyrrhulininae

Copeina sp., *Copella nattereri*

Nas espermátides iniciais o núcleo é esférico, preenchido por cromatina granular e homogeneamente distribuída e circundado por citoplasma contendo as organelas (Fig. 21A). O complexo centriolar dispõe-se lateralmente ao núcleo (Fig. 21Ainset). O centríolo proximal é antero-lateral e oblíquo em relação ao distal (Fig. 21 Ainset). O centríolo distal diferencia-se em corpúsculo basal e organiza o axonema do flagelo. O complexo centriolar não migra em direção ao núcleo. O núcleo desloca-se ligeiramente em direção ao complexo centriolar e depois retorna, permanecendo apenas uma pequena porção dele cobrindo o complexo centriolar (Fig. 21B, C). Uma depressão única, a fossa nuclear, é formada no contorno nuclear, na altura do complexo centriolar (Fig. 21B). O citoplasma desloca-se em direção ao eixo flagelar formando a peça intermediária (Fig. 21A, C). Como o centríolo distal está ancorado à membrana plasmática, no momento em que o citoplasma desloca-se em direção ao flagelo, ele circunda o segmento inicial do flagelo formando o canal citoplasmático (Fig. 21A-C). A compactação da cromatina avança e o núcleo alonga-se ligeiramente em direção ao eixo flagelar (Fig. 21C). A peça intermediária é baso-lateral ao flagelo sendo, conseqüentemente, fortemente assimétrica. Várias mitocôndrias oblongas e vesículas estão presentes na peça intermediária (Fig. 21A). Nas espermátides finais, a cromatina é altamente condensada preenchendo todo o núcleo (Fig. 21C). Não foram observadas aletas flagelares (não mostrado) .

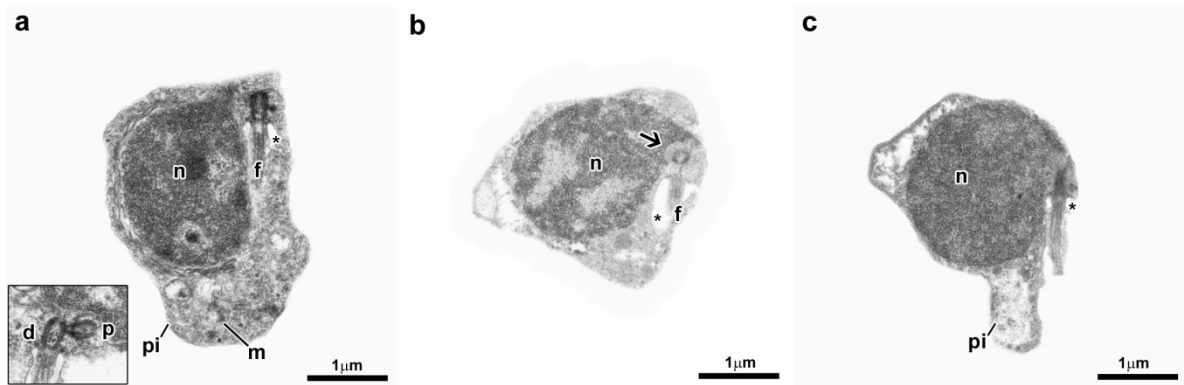


Figura 21. Espermiogênese representativa para as espécies *Copeina* sp. e *Copella nattereri*. As fotomicrografias são cortes longitudinais da espermatíde inicial (A) até a espermatíde final (C), correspondendo à *Copella nattereri*. O flagelo (f) é inicialmente lateral núcleo (n). O núcleo não sofre rotação em direção ao eixo flagelar (f). Consequentemente o complexo centriolar (p, d – *Ainset*) e a fossa nuclear (seta) são laterais. O citoplasma desloca-se em direção ao eixo flagelar e forma a peça intermediária (pi). Legendas: asterisco: canal citoplasmático, seta: fossa nuclear, m: mitocôndria.

1.2 Descrição das formas dos espermatozoides

A descrição dos espermatozoides foi organizada por família.

Família Alestidae

Alestopetersius compressus

O núcleo é esférico e excêntrico em relação ao eixo flagelar, com diâmetro aproximado de 1,7 μm (Fig. 22A-B). A cromatina é granular e altamente compactada entremeadada por áreas elétricas-lúcidas (Fig. 22A-B). O contorno nuclear possui uma única depressão côncava em forma de arco, a fossa nuclear, localizada excentricamente ao núcleo, e abriga totalmente o centríolo proximal e o distal (Fig. 22A). O centríolo proximal dispõe-se anteriormente ao centríolo distal e apresentam-se ligeiramente oblíquos a perpendiculares, um em relação ao outro (Fig. 22A). A peça intermediária localiza-se na base do núcleo, é assimétrica e abriga o canal citoplasmático, as mitocôndrias e as vesículas (Fig. 22A-C). O canal citoplasmático está localizado entre a membrana da peça intermediária e a flagelar, apresentando-se longo (Fig. 22A-C). Várias mitocôndrias com formato arredondado a oblongo estão distribuídas em apenas uma região da peça intermediária (Fig. 22C-D). O sistema de endomembranas é composto por algumas vesículas de diâmetro variável, distribuídas por toda a peça intermediária (Fig. 22E-F). Ao final da peça intermediária está presente a bainha citoplasmática (Fig. 22F). O flagelo possui o arranjo clássico do axonema (9+2) (Fig.) e apresenta algumas vesículas em suas membranas (Fig. 22B, F).

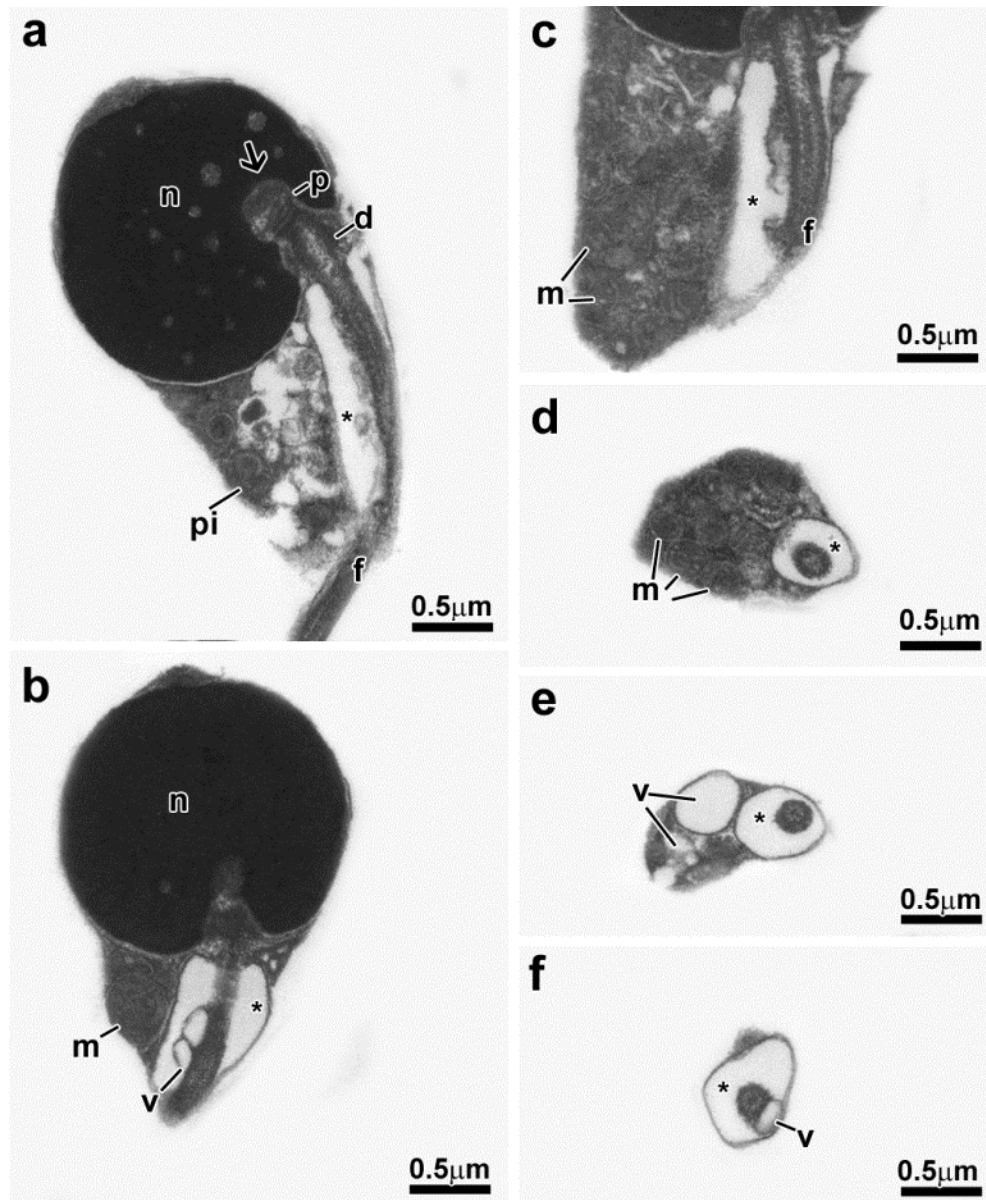


Figura 22. Espermatozoide de *Alestopetersius compressus*. A, B, C: cortes longitudinais. D, E, F: cortes transversais. O núcleo (n) é esférico e posiciona-se excêntrico ao flagelo (f). O complexo centriolar (p, d) e a fossa nuclear (seta) são excêntricos. O centríolo proximal (p) é oblíquo em relação ao centríolo distal (d). O canal citoplasmático está presente (*). A peça intermediária (pi) é fortemente assimétrica, e abriga as mitocôndrias esféricas (m) e vesículas (v). A membrana flagelar apresenta vesículas e o axonema.

Arnoldichthys spilopterus

O núcleo é esférico e excêntrico em relação ao eixo flagelar, com diâmetro aproximado de 1,5 μm (Fig. 23A-C). A cromatina é granular e altamente compactada entremeada por áreas elétron-lucidas (Fig. 23A). O contorno nuclear possui uma única depressão côncava em forma de arco, a fossa nuclear, localizada excentricamente ao núcleo, e abriga totalmente o centríolo proximal e o distal (Fig. 23A). O centríolo proximal dispõe-se anterior e lateral ao centríolo distal e apresentam-se ligeiramente oblíquos, um em relação ao outro (Fig. 23A). A peça intermediária localiza-se na base do núcleo, é assimétrica e abriga o canal citoplasmático, as mitocôndrias e as vesículas (Fig. 23A-B, E). O canal citoplasmático está localizado entre a membrana da peça intermediária e a flagelar, apresentando-se longo (Fig. 23A-B, D). As mitocôndrias, com formato oblongo, estão distribuídas em todas as regiões da peça intermediária (Fig. 23B). O sistema de endomembranas é composto por algumas vesículas de diâmetro variável, distribuídas por toda a peça intermediária (Fig. 23E). O flagelo possui o arranjo clássico do axonema (9+2) (Fig.) e não tem aletas (não mostrado).

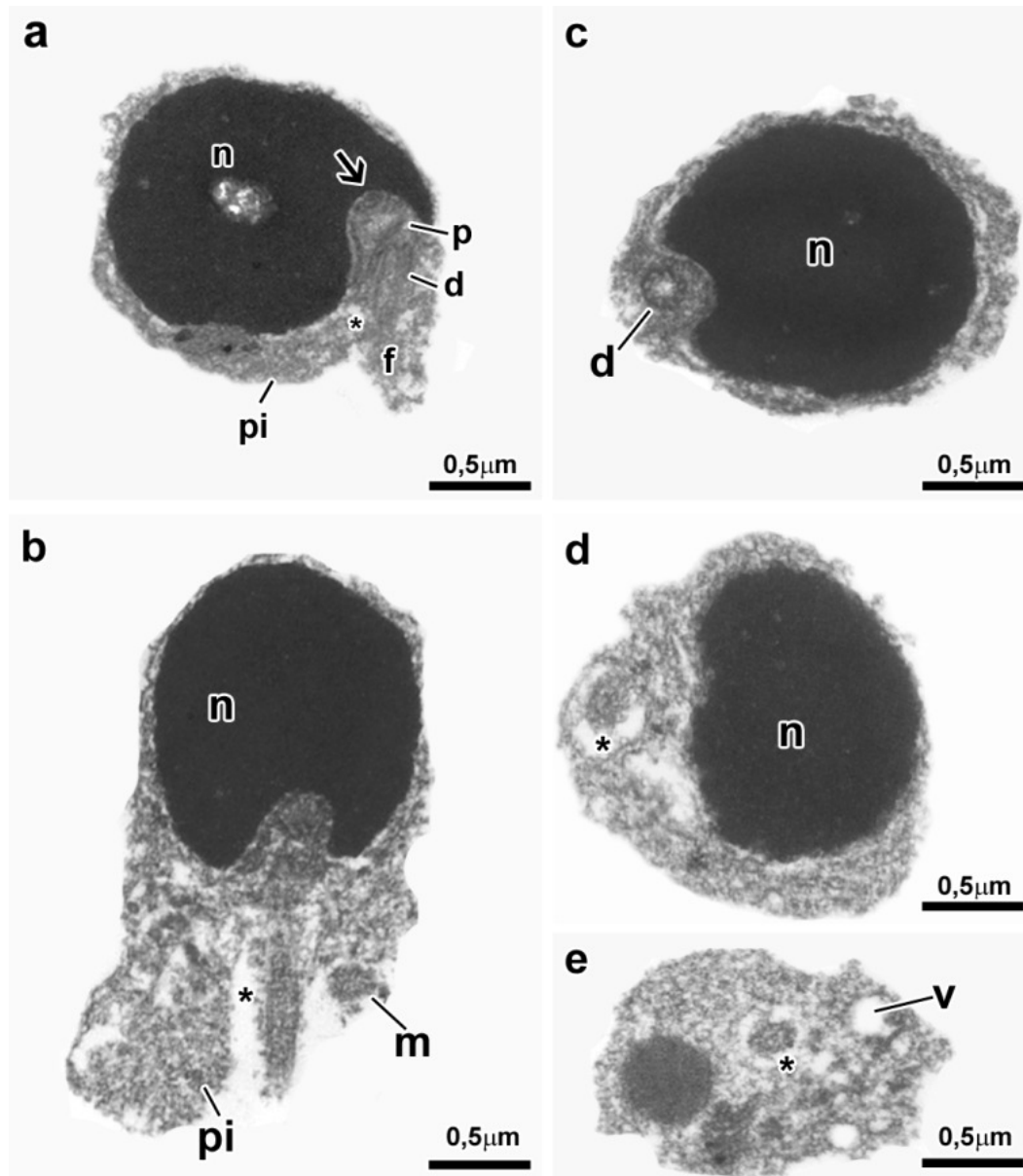


Figura 23. Espermatozoide de *Arnoldichthys spilopterus*. a, b: cortes longitudinais. c, d, e: cortes transversais. O núcleo (n) é esférico e posiciona-se excêntrico ao flagelo (f). O complexo centriolar (p, d) e a fossa nuclear (seta) são fortemente excêntricos. O centríolo proximal (p) é oblíquo em relação ao centríolo distal (d). O canal citoplasmático está presente (*). A peça intermediária (pi) é assimétrica, e abriga as mitocôndrias oblongas (m) e vesículas (v). Legendas: d: centríolo distal, p: centríolo proximal.

O núcleo é esférico, com diâmetro aproximado de 1,6 μm (Fig. 24A). A cromatina é flocada e condensada em espessos conjuntos de fibras de alta elétron-densidade, entremeada por algumas áreas elétron-lúcidas (Fig. 24A-E). O contorno nuclear possui uma única depressão côncava e ramificada, a fossa nuclear, em forma de arco, localizado medialmente ao núcleo. A fossa nuclear abriga totalmente o centríolo proximal e acima de 2/3 do centríolo distal (Fig. 24A, D). O centríolo proximal dispõe-se anteriormente ao centríolo distal e apresentam-se em ângulo reto, um em relação ao outro (Fig. 24C). A peça intermediária está localizada na base do núcleo, e é ligeiramente assimétrica e abriga as mitocôndrias e as vesículas (Fig. 24A-B). Uma bainha citoplasmática está presente ao final da peça intermediária, medindo aproximadamente 2,7 μm de comprimento (Fig. 24A, I). Um conjunto de membranas concêntricas está presente no canal citoplasmático (Fig. 24G). As mitocôndrias tem formato alongado ou em “c” e estão distribuídas longitudinalmente a partir da base do núcleo até o final da peça intermediária, excetuando-se a porção da bainha citoplasmática (Fig. 24A-B, F-H), e radialmente ao redor do canal citoplasmático (Fig. 24F-H). O sistema vesicular é composto por uma ou mais vesículas grandes, distribuídas na segunda metade da peça intermediária, excetuando-se a porção da bainha (Fig. 24F, I). O canal citoplasmático apresenta anéis membranosos concêntricos no sentido longitudinal (Fig. 24G). O flagelo possui o arranjo clássico do axonema (9+2) (Fig. 24I) e apresenta projeção unilateral da membrana flagelar, também conhecida como “aletas”.

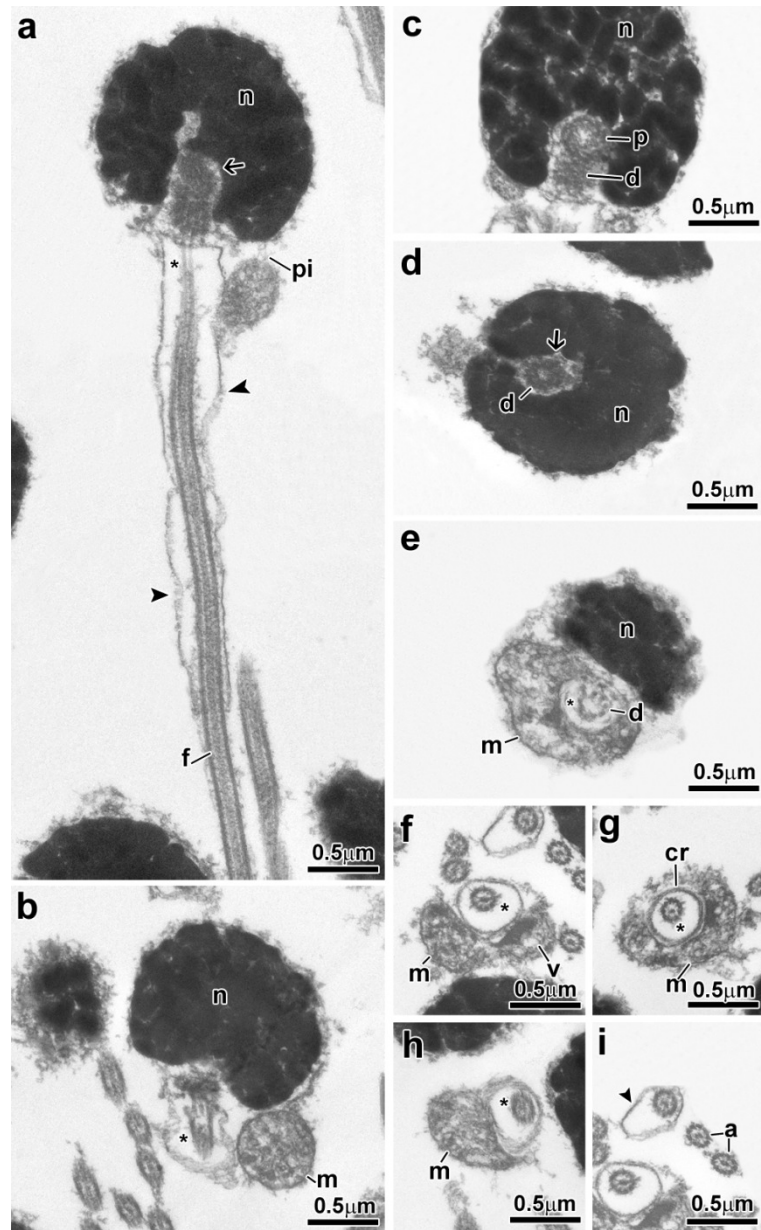


Figura 24. Espermatozoide de *Brachypetersius altus*. A – C: Cortes longitudinais do espermatozoide. Note a presença de áreas elétron-lúcidas no núcleo (n), a fossa nuclear única e ramificada (seta), a posição do centríolo proximal (p) em relação ao distal (d), a peça intermediária (pi) e a bainha citoplasmática (cabeça de seta). D - I: Cortes transversais a partir do núcleo até o final da peça intermediária (pi). Note o formato alongado das mitocôndrias (m), as vesículas (v), o canal citoplasmático (*) e a presença da bainha citoplasmática (cabeça de seta). G: Corte da peça intermediária destacando a presença de membranas concêntricas (mc) em torno do flagelo (f). I: Detalhe do axonema (a) com arranjo clássico dos microtúbulos (9+2).

Brycinus imberi

O núcleo é esférico, com diâmetro aproximado de 1,5 μm (Fig. 25A). A cromatina é moderadamente condensada em conjuntos de fibrilas de baixa elétrondensidade, entremeada por áreas de maior elétrondensidade, com aspecto geral que remete à “esponja de aço” (Fig. 25A-F). O contorno nuclear possui uma única depressão côncava e ramificada, a fossa nuclear, em forma de arco, localizado medialmente ao núcleo (Fig. 25C-D). A fossa nuclear abriga totalmente o centríolo proximal e acima de 2/3 do centríolo distal (Fig. 25A-D). O centríolo proximal dispõe-se anteriormente ao centríolo distal e apresentam-se em ângulo reto, um em relação ao outro (Fig. 25D). A peça intermediária está localizada na base do núcleo, e é ligeiramente assimétrica e abriga as mitocôndrias e as vesículas (Fig. 25A). Uma bainha citoplasmática está presente ao final da peça intermediária, medindo aproximadamente 0,37 μm de comprimento (Fig. 25B-J). Um conjunto de membranas concêntricas está presente no canal citoplasmático (Fig. 25I). As mitocôndrias tem formato esférico e estão distribuídas longitudinalmente a partir da base do núcleo até o final da peça intermediária, excetuando-se a porção da bainha citoplasmática (Fig. 25A, G-I), e radialmente ao redor do canal citoplasmático. O sistema vesicular é composto por uma pequena quantidade de vesículas grandes, distribuídas na segunda metade da peça intermediária, excetuando-se a porção da bainha (Fig. 25G). O flagelo possui o arranjo clássico do axonema (9+2) (Fig. 25K) e apresenta projeção unilateral da membrana flagelar, também conhecida como “aletas”.

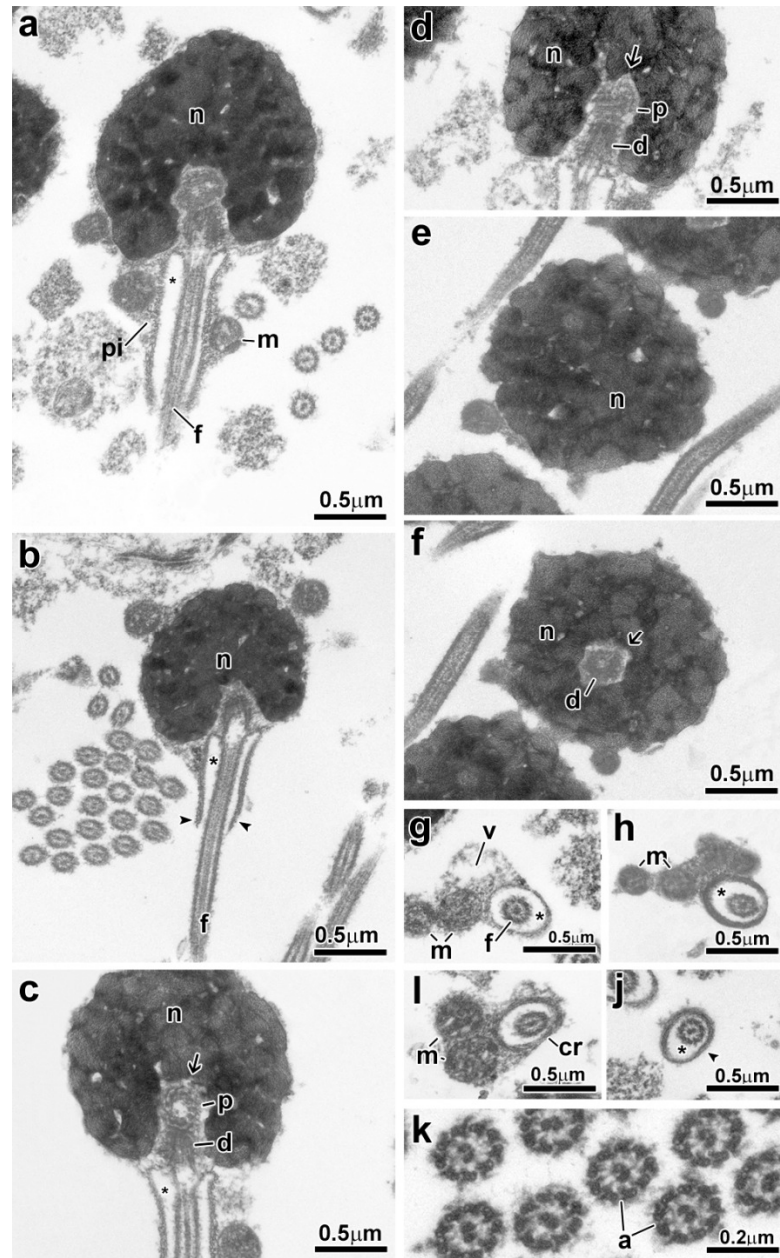


Figura 25. Espermatozoide de *Brycinus imberi*. A – D: Cortes longitudinais do espermatozoide. Note a presença de áreas elétron-lúcidas no núcleo (n), a fossa nuclear única e ramificada (seta), a posição do centríolo proximal (p) em relação ao distal (d), a peça intermediária (pi), o canal citoplasmático (*) e a bainha citoplasmática (cabeça de seta). E - J: Cortes transversais a partir do núcleo até o final da peça intermediária (pi). Note o formato esférico das mitocôndrias (m), as vesículas (v), o canal citoplasmático (*) e a presença da bainha citoplasmática (cabeça de seta). K: Detalhe do axonema (a) com arranjo clássico dos microtúbulos (9+2).

Brycinus lateralis

O núcleo é esférico, com diâmetro aproximado de 1,5 μm (Fig. 26A-E). A cromatina é moderadamente condensada em conjuntos de fibrilas de baixa elétrondensidade, entremeada por áreas de maior elétrondensidade, com aspecto geral que remete à “esponja de aço” (Fig. 26A-E). O contorno nuclear possui uma única depressão côncava e ramificada, a fossa nuclear, em forma de arco, localizado medialmente ao núcleo (Fig. 26C). A fossa nuclear abriga totalmente o centríolo proximal e acima de 2/3 do centríolo distal (Fig. 26C). O centríolo proximal dispõe-se anteriormente ao centríolo distal e apresentam-se em ângulo reto, um em relação ao outro (Fig. 26C). A peça intermediária está localizada na base do núcleo, e é ligeiramente assimétrica e abriga as mitocôndrias e as vesículas (Fig. 26A-C). Uma bainha citoplasmática está presente ao final da peça intermediária, medindo aproximadamente 2,82 μm de comprimento (Fig. 26A, J). As mitocôndrias tem formato esférico e estão distribuídas longitudinalmente a partir da base do núcleo até o final da peça intermediária, excetuando-se a porção da bainha citoplasmática (Fig. 26A-B), e radialmente ao redor do canal citoplasmático (Fig. 26F-I). O sistema vesicular é composto por poucas vesículas de grande diâmetro, distribuídas na segunda metade da peça intermediária, excetuando-se a porção da bainha (Fig. 26C, H). O flagelo possui o arranjo clássico do axonema (9+2) (Fig. 26J) e apresenta projeção unilateral da membrana flagelar, também conhecida como “aletas”.

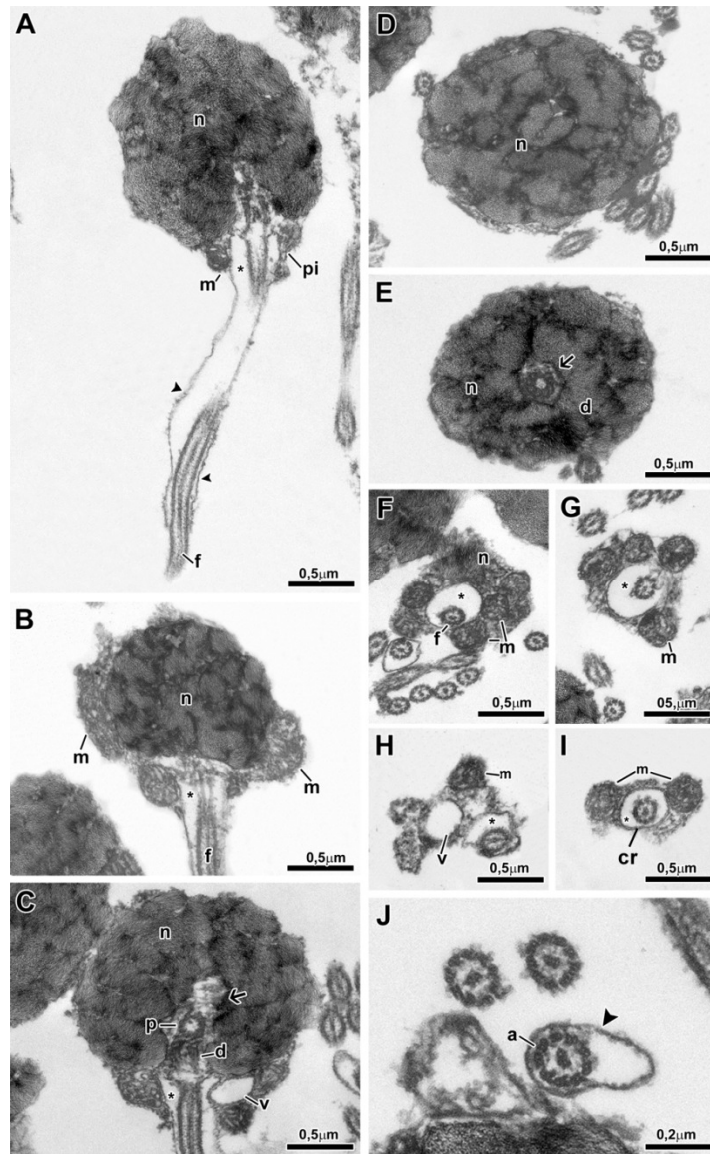


Figura 26. Espermatozoide de *Brycinus lateralis*. A – C: Cortes longitudinais do espermatozoide. Note a presença de áreas elétron-lúcidas no núcleo (n), a fossa nuclear única e ramificada (seta), a posição do centríolo proximal (p) em relação ao distal (d), a peça intermediária (pi) e a bainha citoplasmática (cabeça de seta). D - I: Cortes transversais a partir do núcleo até o final da peça intermediária (pi). Note o formato esférico das mitocôndrias (m), as vesículas (v), o canal citoplasmático (*) e a presença da bainha citoplasmática (cabeça de seta). J: Detalhe do axonema (a) com arranjo clássico dos microtúbulos (9+2), e da bainha citoplasmática (cabeça de seta).

Bryconalestes longipinnis

O núcleo é esférico, com diâmetro aproximado de 1,3 μm (Fig. 27A-D). A cromatina é flocada e condensada em espessos conjuntos de fibras de alta elétrondensidade, entremeadas por algumas áreas elétron-lúcidas (Fig. 27A-D). O contorno nuclear possui uma única depressão côncava e ramificada, a fossa nuclear, em forma de arco, localizado medialmente ao núcleo (Fig. 27C). A fossa nuclear abriga totalmente o centríolo proximal e acima de 2/3 do centríolo distal (Fig. 27C). O centríolo proximal dispõe-se anteriormente ao centríolo distal e apresentam-se em ângulo reto, um em relação ao outro (Fig. 27C). A peça intermediária está localizada na base do núcleo, e é ligeiramente assimétrica e abriga as mitocôndrias e as vesículas (Fig. 27A-C, E-F). Uma bainha citoplasmática está presente ao final da peça intermediária, medindo aproximadamente 0,58 μm de comprimento (Fig. 27A, G). As mitocôndrias tem formato esférico e estão distribuídas a partir da base do núcleo até o final da peça intermediária, excetuando-se a porção da bainha citoplasmática (Fig. 27A-B, E-F). O sistema vesicular é composto por uma pequena quantidade de vesículas grandes, distribuídas por toda a peça intermediária, excetuando-se a porção da bainha (Fig. 27A-B, E-F). O canal citoplasmático apresenta anéis membranosos concêntricos no sentido longitudinal. O flagelo possui o arranjo clássico do axonema (9+2) e apresenta projeção unilateral da membrana flagelar, também conhecida como “aletas” (Fig. 27H).

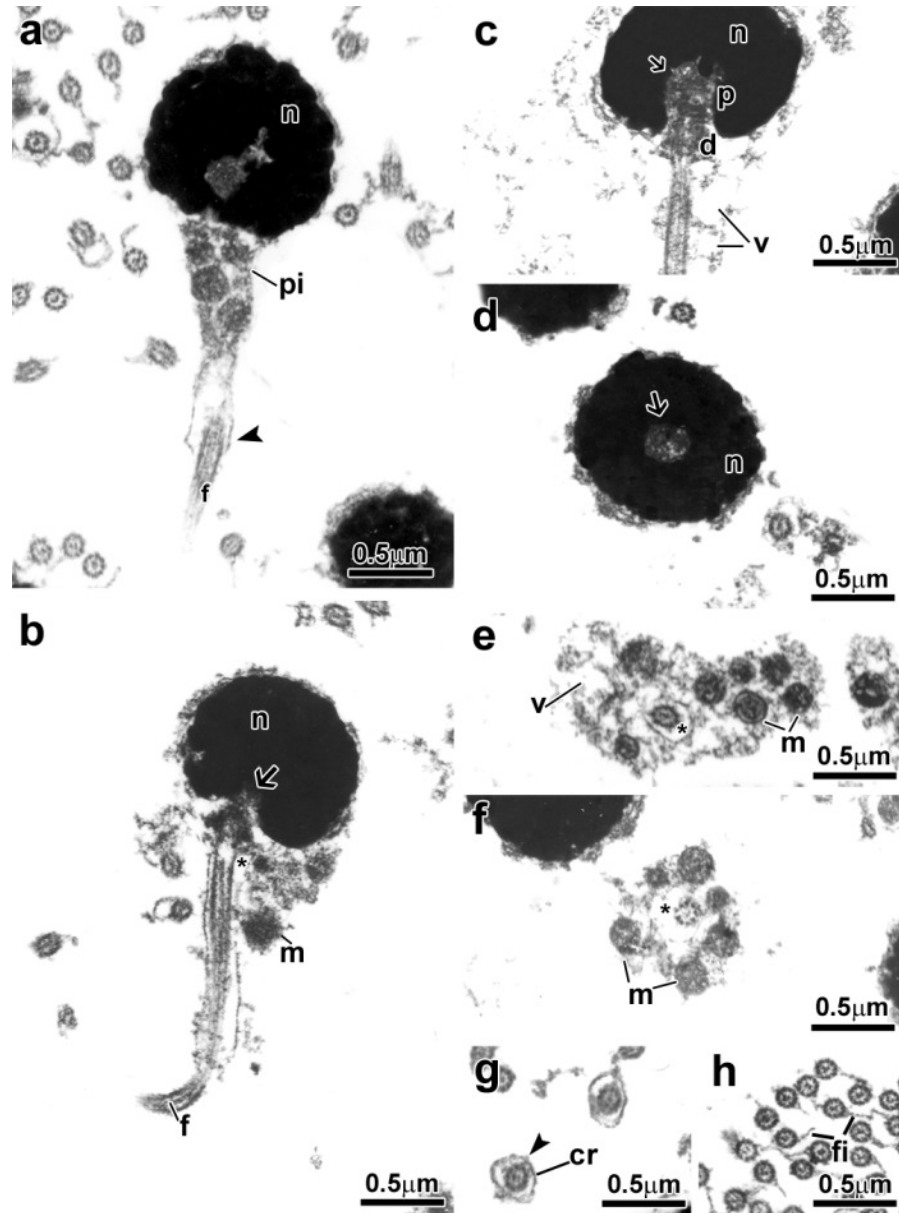


Figura 27. Espermatozoide de *Bryconalestes longipinnis*. A – C: Cortes longitudinais do espermatozoide. Note a presença de áreas elétron-lúcidas no núcleo (n), a fossa nuclear única e ramificada (seta), a posição do centríolo proximal (p) em relação ao distal (d), a peça intermediária (pi) e a bainha citoplasmática (cabeça de seta). D - H: Cortes transversais a partir do núcleo até o final da peça intermediária (pi). Note o formato esférico das mitocôndrias (m), as vesículas (v), o canal citoplasmático (*) e a presença da bainha citoplasmática (cabeça de seta). G: Corte da peça intermediária destacando a presença da bainha citoplasmática (cabeça de seta) ao redor do flagelo. H: Detalhe do flagelo exibindo projeções alares (pa) de membrana aparentemente de um único lado.

Micralestes acutidens

O núcleo é esférico e posiciona-se fortemente excêntrico em relação ao flagelo, com diâmetro aproximado de 1.6 μm e está preenchido por cromatina granular altamente condensada (Fig. 28A-B). A rotação nuclear é incompleta com cerca de 20 graus (Fig. 28A). O contorno nuclear possui uma única depressão, a fossa nuclear (Fig. 28A). O centríolo proximal está totalmente inserido na fossa nuclear, e o centríolo distal está totalmente fora dela (Figs. 28A-B). O centríolo proximal é lateral e perpendicular em relação ao centríolo distal (Figs. 28A-B). O flagelo é fortemente excêntrico em relação ao núcleo (Fig. 28A). A peça intermediária e abriga as mitocôndrias e algumas vesículas (Figs. 28C-D). As mitocôndrias são aparentemente esféricas, distribuídas por toda a peça intermediária (Figs. 28C-D). As vesículas são aparentemente esféricas (Figs. 28C-D). Ao longo do comprimento do canal citoplasmático, são observados alguns anéis membranosos concêntricos (Fig. 28D). A membrana da peça intermediária tem o aspecto de “favo-de-mel” no sentido do comprimento (Figs. 28A, *Ainset*). O flagelo possui o arranjo clássico do axonema (9+2) e não apresenta projeções laterais de membrana (não mostrado).

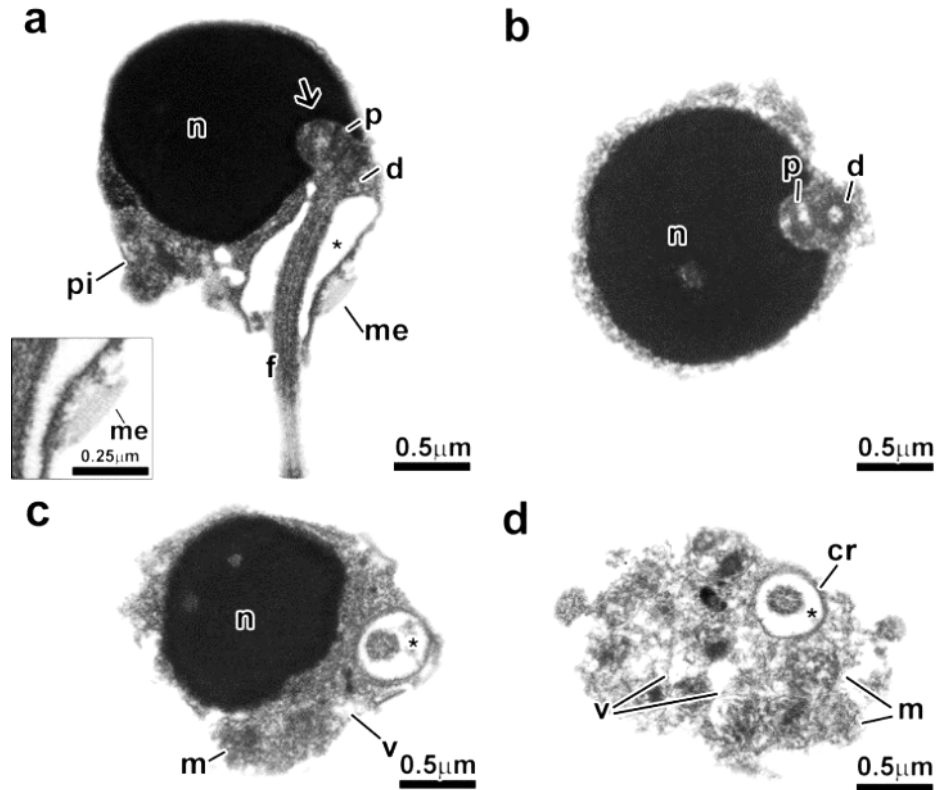


Figura 28. *Micralestes acutidens*. A: corte longitudinal. B, C, D: cortes transversais. O núcleo (n) é esférico e posiciona-se fortemente excêntrico em relação ao flagelo (f). O complexo centriolar (p, d) e a fossa nuclear (seta) é fortemente excêntrico. O centríolo proximal (p) é lateral e perpendicular em relação ao centríolo distal (d). O canal citoplasmático está presente (asterisco). A peça intermediária (pi) é fortemente assimétrica, e abriga as mitocôndrias esféricas (m) e as vesículas (v). A membrana da peça intermediária (me) tem um aspecto de “favo-de-mel” em no sentido do comprimento (A, A-*inset*). Legendas: cr: anéis membranosos concêntricos.

Rhabdalestes rhodesiensis

O núcleo é esférico com diâmetro aproximado de 1.6 μm (Fig. 29A). A cromatina é granular e altamente compactada e destituída de áreas elétron-lucidas (Fig. 29A). O contorno nuclear possui uma única depressão côncava, a fossa nuclear, em forma de arco, localizada excentricamente ao núcleo, e abriga totalmente o centríolo proximal e acima de 2/3 do centríolo distal (Fig. 29A). O centríolo proximal dispõe-se anteriormente ao centríolo distal e apresentam-se ligeiramente oblíquos, um em relação ao outro (Fig. 29A). A peça intermediária localiza-se na base do núcleo, é ligeiramente assimétrica e abriga o canal citoplasmático, as mitocôndrias e as vesículas (Fig. 29A). O canal citoplasmático está localizado entre a membrana da peça intermediária e a flagelar, apresentando-se longo (Fig. 29A). As mitocôndrias são esféricas e estão distribuídas por toda a peça intermediária (Fig. 29B-C). O sistema de endomembranas é composto por algumas vesículas e túbulos de diâmetro variável, distribuídas por toda a peça intermediária (Fig. 29B-D). A membrana da peça intermediária tem o aspecto de “favo-de-mel” no sentido do comprimento (Fig. 29D). O flagelo possui o arranjo clássico do axonema (9+2) (não mostrado).

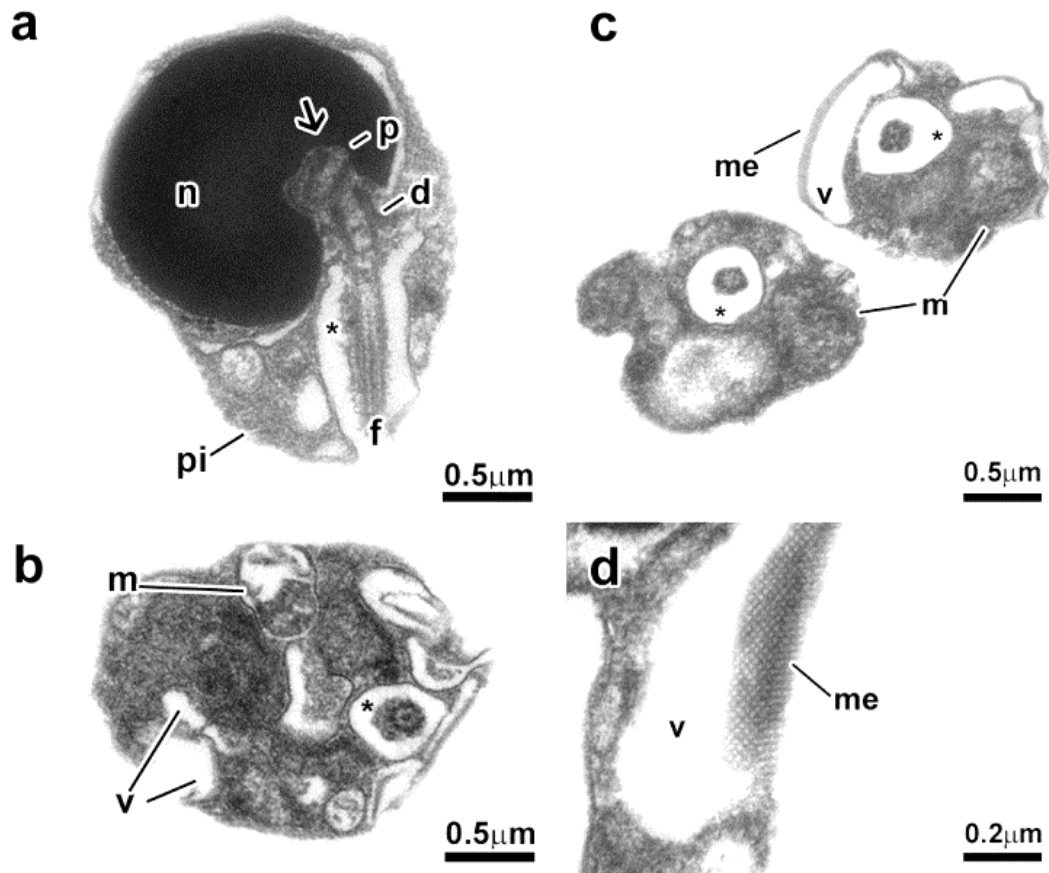


Figura 29. *Rhabdalestes rhodesiensis*. A, D: cortes longitudinais. B, C: cortes transversais. O núcleo (n) é esférico e posiciona-se fortemente excêntrico em relação ao flagelo (f). O complexo centriolar (p, d) e a fossa nuclear são fortemente excêntricos (seta). O centríolo proximal (p) é anterior e em ângulo oblíquo em relação ao centríolo distal (d). O canal citoplasmático está presente (asterisco). A peça intermediária (pi) é fortemente assimétrica e abriga as mitocôndrias esféricas (m) e as vesículas (v). A membrana da peça intermediária (me) apresenta um aspecto de “favo-de-mel” no sentido do comprimento (C, D).

Família Chalceidae

Chalceus epakros

O núcleo é esférico e está localizado medialmente ao eixo flagelar, com diâmetro aproximado de 1,1µm (Figs. 30A, B). O núcleo é preenchido por cromatina com aspecto fibrillar, interespaçada por áreas elétron-lúcidas, interconectada a áreas de cromatina mais condensada (Fig. 30A). A rotação nuclear é completa. Os centríolos proximal e distal estão localizados no interior da fossa nuclear (Fig. 30A), sendo o centríolo proximal anterior ao centríolo distal (Fig. 30A). O centríolo proximal dispõe-se em ângulo oblíquo em relação ao centríolo distal (Fig. 30A). O flagelo é ligeiramente excêntrico em relação ao núcleo. A peça intermediária é assimétrica e abriga as mitocôndrias, e aparentemente não há vesículas (Figs. 30A, B). A bainha citoplasmática está presente ao final da peça intermediária e mede aproximadamente 0,8 µm em comprimento (Fig. 30A). Uma única mitocôndria em forma de “c” está distribuída circundando o canal citoplasmático (Figs. 30B, C). Ao longo do canal citoplasmático, estão localizados alguns anéis membranosos concêntricos (Fig. 30C). O flagelo apresenta o arranjo clássico do axonema (9+2) e possui aletas (Fig. 30D).

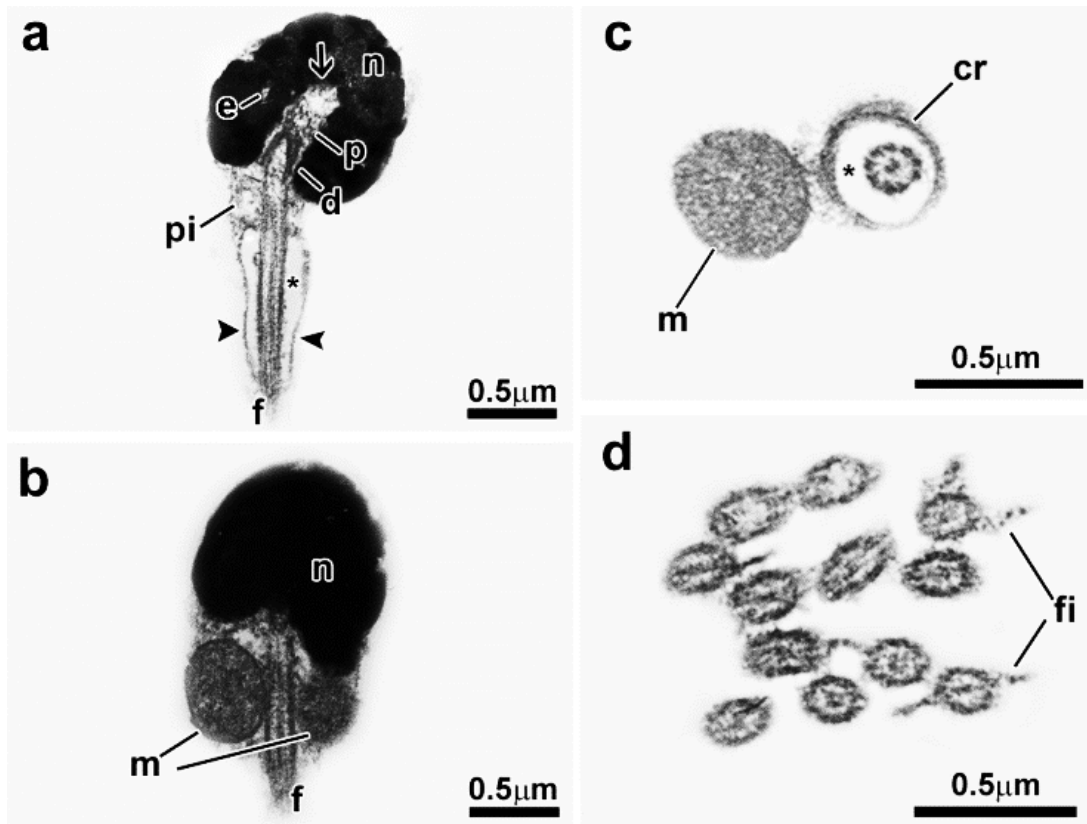


Figura 30. Espermatozoide de *Chalceus epakros*. A, B: cortes longitudinais. C, D: cortes transversais a partir do topo do núcleo. O núcleo (n) é esférico e medial ao flagelo (f). O complexo centriolar (p, d) e a fossa nuclear (seta) são mediais. O centríolo proximal (p) dispõe-se em ângulo oblíquo em relação ao distal (d). O canal citoplasmático está presente (asterisco). A peça intermediária (pi) é assimétrica, e abriga uma única mitocôndria em forma de “c” (m), vesículas (v) e a bainha citoplasmática (cabeça de seta). O flagelo possui aletas (fi). Legendas: cr: anéis membranosos concêntricos, e: áreas elétron-lúcidas.

Família Crenuchidae

Subfamília Characidiinae

Characidium sp.

O núcleo é esférico, com diâmetro aproximado de 2 μm (Fig. 31A-B). A cromatina é granular e altamente compactada e aparentemente destituída de áreas elétron-lúcidas (Fig. 31A-B). O contorno nuclear possui uma única depressão côncava, a fossa nuclear, em forma de arco, localizada medialmente ao núcleo, e abriga totalmente o centríolo proximal e o distal (Fig. 31B). O centríolo proximal dispõe-se anteriormente ao centríolo distal e apresentam-se ligeiramente oblíquos a perpendiculares um em relação ao outro (Fig. 31B). A peça intermediária localiza-se na base do núcleo, é ligeiramente assimétrica e abriga o canal citoplasmático, uma única mitocôndria esférica e uma vesícula grande (Fig. 31A). O canal citoplasmático está localizado entre a membrana da peça intermediária e a flagelar, apresentando-se curto e estreito (Figs. 31A, C-D). Apenas uma única mitocôndria com formato arredondado está distribuída em apenas uma região da peça intermediária (Figs. 31A, C). O sistema de endomembranas é composto por uma única vesícula grande que circunda o canal citoplasmático (Fig. 31D). O flagelo possui vesículas (Figs. 31E-F) e apresenta o arranjo clássico do axonema (9+2) (Fig. 31G).

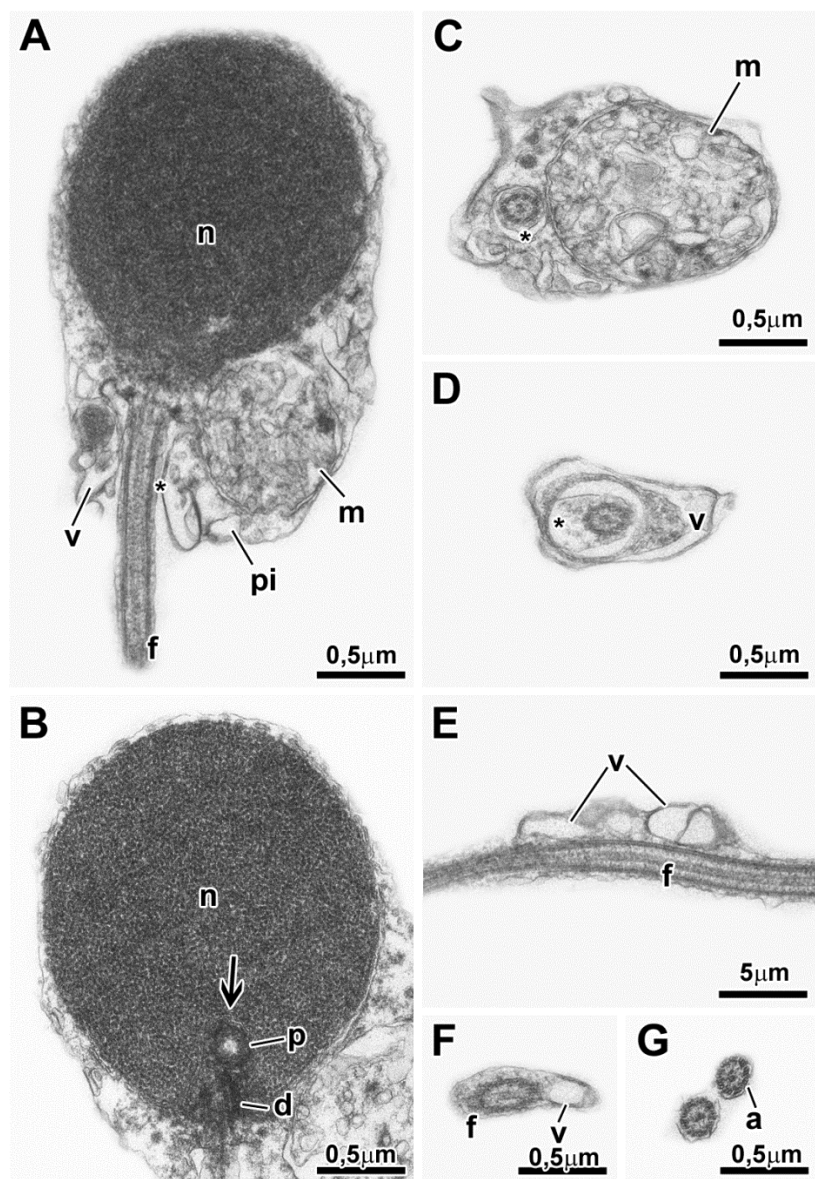


Figura 31. Espermatozoide de *Characidium* sp. A – B: Cortes longitudinais do espermatozoide. Note a ausência de áreas elétron-lúcidas no núcleo (n), a fossa nuclear única (seta), a posição do centríolo proximal (p) em relação ao distal (d), a peça intermediária (pi) contendo uma única mitocôndria (m) esférica e uma grande vesícula (v), e o flagelo (f). C - G: Cortes transversais a partir do início da peça intermediária até o flagelo (f). Note a única mitocôndria (m) esférica, uma grande vesícula (v) que circunda o canal citoplasmático (*). E: Corte longitudinal do flagelo exibindo a presença de vesículas. F: Corte transversal do flagelo exibindo uma vesícula. G: Corte transversal do axonema exibindo o arranjo do axonema (9+2).

Subfamília Crenuchinae

Crenuchus spilurus

O núcleo é esférico, com diâmetro aproximado de 2,3 μm (Fig. 32A). A cromatina é granular e altamente compactada e aparentemente sem áreas elétron-lúcidas (Fig. 32A). O contorno nuclear possui uma dupla depressão côncava, a fossa nuclear, em forma de arco, localizada medialmente ao núcleo e lateralmente uma em relação à outra, e abriga aproximadamente 1/3 de ambos os centríolos proximal e o distal (Fig. 32A). O centríolo proximal apresenta-se antero-lateral ao centríolo distal e apresentam-se fortemente oblíquos um em relação ao outro (Fig. 32B). A peça intermediária localiza-se na base do núcleo, é ligeiramente assimétrica e abriga o canal citoplasmático, as mitocôndrias e as vesículas (Figs. 32A, F). O canal citoplasmático está localizado entre a membrana da peça intermediária e a flagelar. As mitocôndrias têm formato oblongo e estão distribuídas principalmente na primeira metade da peça intermediária, logo abaixo do núcleo (Figs. 32A, C-F). O sistema de endomembranas é composto por vesículas (Figs. 32A, C-F) e túbulos grandes que se interconectam, distribuídos a partir da periferia de toda a peça intermediária e concentrando-se principalmente na segunda metade da peça intermediária entremeados pelas mitocôndrias (Figs. 32C-D). O flagelo apresenta vesículas (Fig. 32G) e possui o arranjo clássico do axonema (9+2) (Fig. 32H).

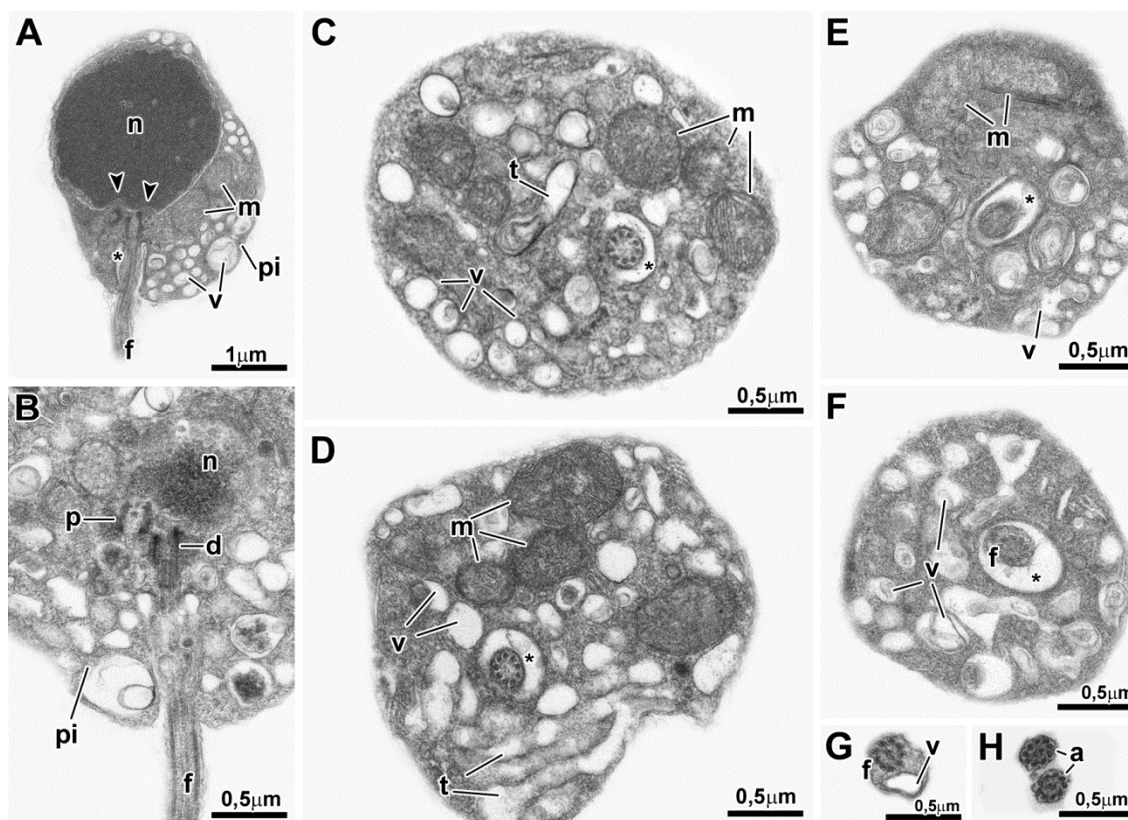


Figura 32. Espermatozoide de *Crenuchus spilurus*. A – B: Cortes longitudinais do espermatozoide. Note a ausência de áreas elétron-lúcidas no núcleo (n), a fossa nuclear dupla (seta), a posição do centríolo proximal (p) em relação ao distal (d), a peça intermediária (pi) contendo as mitocôndrias (m) oblongas e as vesículas (v), e o flagelo (f). C - H: Cortes transversais a partir do início da peça intermediária (pi) até o flagelo (f). Note o formato oblongo das mitocôndrias (m), as vesículas (v), e os túbulos que se interconectam (t) e o canal citoplasmático (*). G: Corte transversal do flagelo exibindo a presença de vesículas. H: Corte transversal do flagelo exibindo o arranjo do axonema (9+2).

Família Ctenoluciidae

Boulengerella cuvieri

O núcleo é esférico, com diâmetro aproximado de 1,7 μm (Fig. 33A-C, E). A cromatina é flocada e condensada em espessos conjuntos de fibras inter espaçados por áreas elétron-lúcidas e interconectadas por ‘cordões’ de fibras de menor elétron-densidade (Fig. 33A-F). O contorno nuclear possui uma única depressão côncava, a fossa nuclear, em forma de arco, localizada medialmente ao núcleo, e abriga totalmente o centríolo proximal e distal. O centríolo proximal dispõe-se anteriormente ao centríolo distal e apresentam-se em ângulo reto, um em relação ao outro (Fig. 33A, C-D). A peça intermediária localiza-se na base do núcleo, é ligeiramente assimétrica e abriga o canal citoplasmático, as mitocôndrias e as vesículas (Fig. 33A-B, G-I). O canal citoplasmático está localizado entre a membrana da peça intermediária e a flagelar, apresentando-se curto e estreito (Fig. 33B, H-J). No canal citoplasmático estão presentes algumas membranas concêntricas (Fig. 33K). As mitocôndrias tem formato alongado e aparentemente são ramificadas, e estão distribuídas concentricamente na peça intermediária ao redor do canal citoplasmático (Fig. 33B, G-I). O sistema de endomembranas é composto por algumas vesículas de grande diâmetro, distribuídas na porção final da peça intermediária (Fig. 33G, J). O flagelo é envolto por um sistema de vesículas de formato tubular distribuídas no sentido longitudinal (Fig. 33A, L). O flagelo possui o arranjo clássico do axonema (9+2) (Fig. 33M).

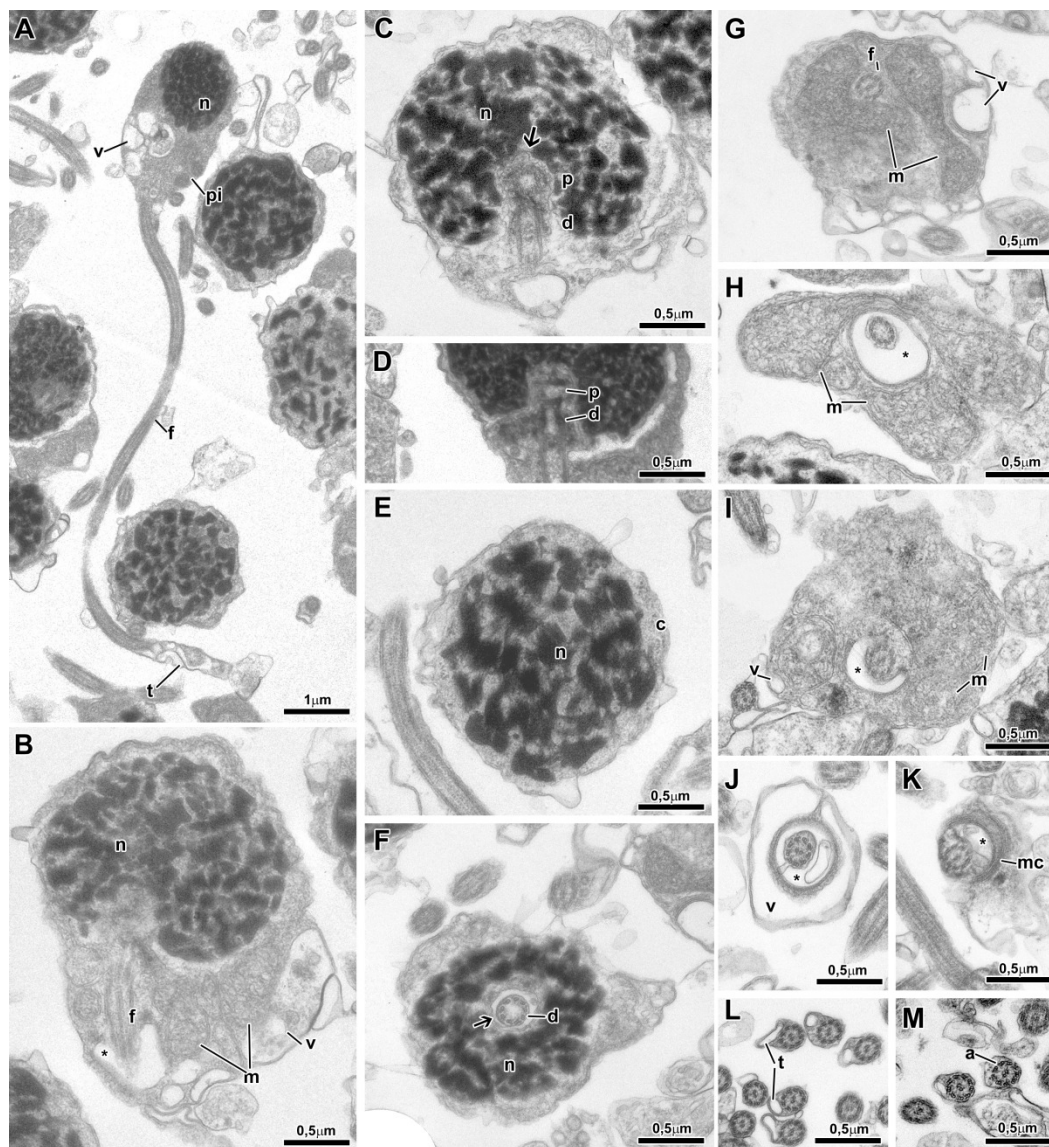


Figura 33. Espermatozoide de *Boulengerella cuvieri*. A – D: Cortes longitudinais do espermatozoide. Note a presença de áreas elétron-lúcidas no núcleo (n), a fossa nuclear única (seta), a posição do centríolo proximal (p) em relação ao distal (d), a peça intermediária (pi) contendo as mitocôndrias (m) e as vesículas (v), e a presença de túbulos (t) na porção final do flagelo (f). E - K: Cortes transversais a partir do núcleo até o final da peça intermediária (pi). Note o formato alongado e aparentemente ramificado das mitocôndrias (m), as vesículas (v), o canal citoplasmático (asterisco). K: Corte da peça intermediária destacando a presença de membranas concêntricas (mc) em torno do flagelo (f). L: Corte da porção final do flagelo exibindo os túbulos (t) alongados em corte transversal. M: Detalhe do axonema (a) com arranjo clássico dos microtúbulos (9+2).

Ctenolucius hujeta

O núcleo é esférico, com diâmetro aproximado de 1,5 μm (Fig. 34A-C). A cromatina é flocada e condensada em espessos conjuntos de fibras inter espaçados por algumas áreas elétron-lúcidas (Fig. 34A-C). O contorno nuclear possui uma única depressão côncava, a fossa nuclear, em forma de arco, localizada medialmente ao núcleo, e abriga totalmente o centríolo proximal e distal (Fig. 34B-D). O centríolo proximal dispõe-se anteriormente ao centríolo distal e apresentam-se em ângulo reto, um em relação ao outro (Fig. 34A-C). A peça intermediária localiza-se na base do núcleo, é ligeiramente assimétrica e abriga o canal citoplasmático, as mitocôndrias e as vesículas (Fig. 34A-B, E, G). O canal citoplasmático está localizado entre a membrana da peça intermediária e a flagelar, apresentando-se relativamente longo e estreito (Fig. 34A, F). No canal citoplasmático aparentemente estão presentes algumas membranas concêntricas (Fig. 34F). As mitocôndrias tem formato alongado e aparentemente são ramificadas, e estão distribuídas concentricamente na peça intermediária ao redor do canal citoplasmático (Fig. 34E, G). O sistema de endomembranas é composto por algumas vesículas aparentemente esféricas, distribuídas na porção final da peça intermediária (Fig. 34A-B). O flagelo possui o arranjo clássico do axonema (9+2) (não mostrado).

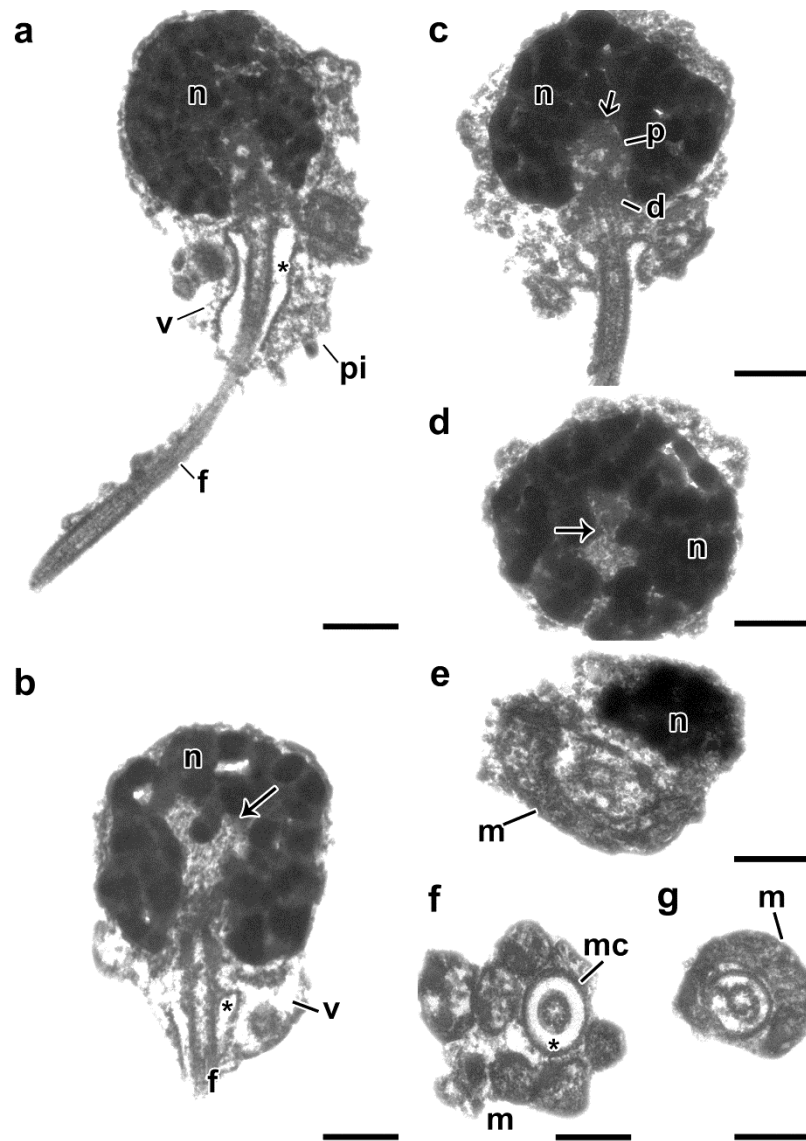


Figura 34. Espermatozoide de *Ctenolucius hujeta*. A – C: Cortes longitudinais do espermatozoide. Note a presença de áreas elétron-lúcidas no núcleo (n), a fossa nuclear única (seta), a posição do centríolo proximal (p) em relação ao distal (d), a peça intermediária (pi) contendo as mitocôndrias (m) e as vesículas (v), e o flagelo (f). D - G: Cortes transversais a partir do núcleo até o final da peça intermediária (pi). Note o formato alongado e aparentemente ramificado das mitocôndrias (m), as vesículas (v), o canal citoplasmático (*). F: Corte da peça intermediária destacando a presença de membranas concêntricas (mc) em torno canal citoplasmático (*). Barras: 0,5 μ m.

Família Distichodontidae

Distichodus affinis

O núcleo é cônico, com largura da base aproximada de 1,4 μm e comprimento de 1,6 μm (Fig. 35A). A cromatina é flocada e condensada em espessos conjuntos de fibras de alta densidade (Fig. 35A-D). O contorno nuclear não possui uma fossa nuclear. No complexo centriolar ambos os centríolos apresentam-se um tanto distantes entre si (Fig. 35B). Ocorre que os dois centríolos diferenciam-se em corpúsculo basal e apenas um origina o flagelo. Por convenção, o centríolo que organiza o axonema do flagelo será considerado como o centríolo distal para efeito de comparações (Fig. 35B). O centríolo proximal dispõe-se lateralmente ao centríolo distal e apresentam-se em ângulo ligeiramente oblíquo, quase paralelos entre si (Fig. 35B). A peça intermediária localiza-se na base do núcleo, é ligeiramente assimétrica e abriga as mitocôndrias e o sistema vesicular (Fig. 35A-B). As mitocôndrias tem formato alongado e aparentemente são ramificadas, e estão distribuídas na base do núcleo e nas bordas da peça intermediária (Fig. 35B). O sistema de endomembranas é composto por um conjunto irregular de túbulos e vesículas de pequeno diâmetro, distribuídas na porção final da peça intermediária (Fig. 35E). O flagelo possui o arranjo clássico do axonema (9+2) (não mostrado).

Distichodus decemmaculatus

O núcleo é cônico, com largura da base aproximada de 1,4 μm e comprimento de 1,9 μm (Fig. 35F-H). A cromatina é flocada e condensada em espessos conjuntos de fibras de alta densidade (Fig. 35F-H). O contorno nuclear não possui uma fossa nuclear. No complexo centriolar ambos os centríolos apresentam-se um tanto distantes entre si (Fig. 35F). Ocorre que os dois centríolos diferenciam-se em corpúsculo basal e apenas um origina o flagelo. Por convenção, o centríolo que organiza o axonema do flagelo será considerado como o centríolo distal para efeito de comparações (Fig. 35F). O centríolo proximal dispõe-se lateralmente ao centríolo distal e apresentam-se em ângulo ligeiramente oblíquo, quase paralelos entre si. A peça intermediária localiza-se na base do núcleo, é ligeiramente assimétrica e abriga as mitocôndrias e o sistema vesicular (Fig. 35G). As mitocôndrias tem formato alongado e aparentemente são ramificadas, e estão distribuídas na base do núcleo e nas bordas da peça intermediária (Fig. 35H). O sistema de endomembranas é composto por um conjunto irregular de túbulos e vesículas de pequeno diâmetro, distribuídas na porção final da peça intermediária (Fig. 35J). O flagelo possui o arranjo clássico do axonema (9+2) (não mostrado).

Distichodus fasciolatus

O núcleo é cônico, com largura da base aproximada de 1,4 μm e comprimento de 1,8 μm (Fig. 35K). A cromatina é flocada e condensada em espessos conjuntos de fibras de alta densidade (Fig. 35K-M). O contorno nuclear não possui uma fossa nuclear. No complexo centriolar ambos os centríolos apresentam-se um tanto distantes entre si (Fig. 35M). Ocorre que os dois centríolos diferenciam-se em corpúsculo basal e apenas um origina o flagelo. Por convenção, o centríolo que organiza o axonema do flagelo será considerado como o centríolo distal para efeito de comparações (Fig. 35M). O centríolo proximal dispõe-se lateralmente ao centríolo distal e apresentam-se em ângulo ligeiramente oblíquo, quase paralelos entre si. A peça intermediária localiza-se na base do núcleo, é ligeiramente assimétrica e abriga as mitocôndrias e o sistema vesicular (Fig. 35 K-L). As mitocôndrias tem formato alongado e aparentemente são ramificadas, e estão distribuídas na base do núcleo e nas bordas da peça intermediária (Fig. 35L, N). O sistema de endomembranas é composto por um conjunto irregular de túbulos e vesículas de pequeno diâmetro, distribuídas na porção final da peça intermediária (Fig. 35O). O flagelo possui o arranjo clássico do axonema (9+2) (não mostrado).

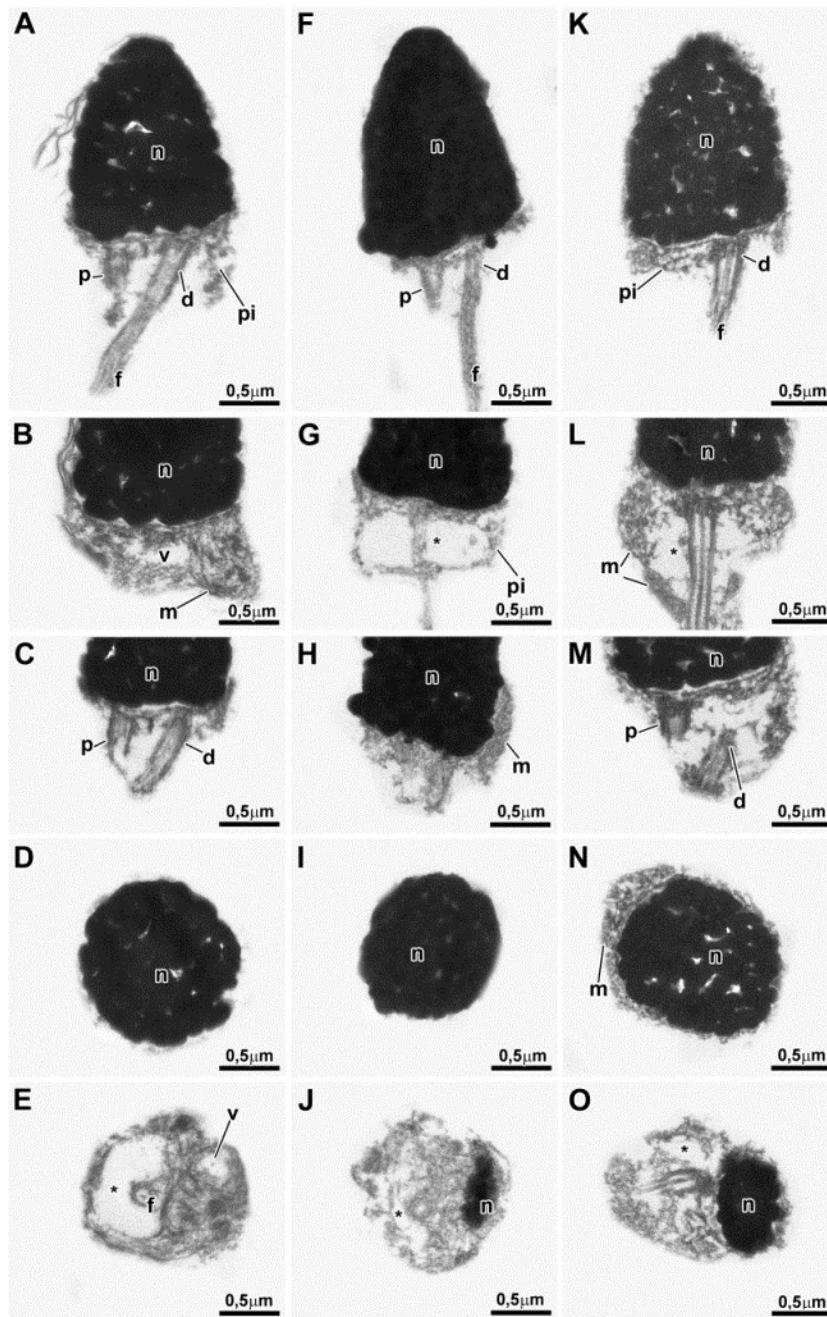


Figura 35. Espermatozoide de *Distichodus affinis* (A-E), *Distichodus decemmaculatus* (F-J) e *Distichodus fasciolatus* (K-O). O núcleo (n) de todas as espécies tem formato cônico, é excêntrico ao flagelo (f). A fossa nuclear está ausente. O complexo centriolar (p, d) dispõem-se lateralmente e quase paralelos um em relação ao outro. O canal citoplasmático está presente (asterisco). A peça intermediária (pi) é curta, e abriga as mitocôndrias alongadas (m) e as vesículas (v). d: centríolo distal, f: flagelo, m: mitocôndria, n: núcleo, p: centríolo proximal, v: vesícula, asterisco: canal citoplasmático.

Ichthyoborus ornatus

O núcleo é cônico, com largura da base aproximada de 1,2 μm e comprimento de 1,6 μm (Fig. 36A). A cromatina é flocada e condensada em espessos conjuntos de fibras de alta densidade (Fig. 36A-B). O contorno nuclear não possui uma fossa nuclear. No complexo centriolar ambos os centríolos apresentam-se um tanto distantes entre si (Fig. 36A). Ocorre que os dois centríolos diferenciam-se em corpúsculo basal e apenas um origina o flagelo. Por convenção, o centríolo que organiza o axonema do flagelo será considerado como o centríolo distal para efeito de comparações (Fig. 36A). O centríolo proximal dispõe-se lateralmente ao centríolo distal e apresentam-se em ângulo ligeiramente oblíquo, quase paralelos entre si. A peça intermediária localiza-se na base do núcleo, é ligeiramente assimétrica e abriga as mitocôndrias e o sistema vesicular (Fig. 36A-B). As mitocôndrias tem formato alongado e aparentemente são ramificadas, e estão distribuídas na base do núcleo e nas bordas da peça intermediária (Fig. 36B-C). O sistema de endomembranas é composto por um conjunto irregular de túbulos e vesículas de pequeno diâmetro, distribuídas na porção final da peça intermediária (Fig. 36B-C). O flagelo possui o arranjo clássico do axonema (9+2) (não mostrado).

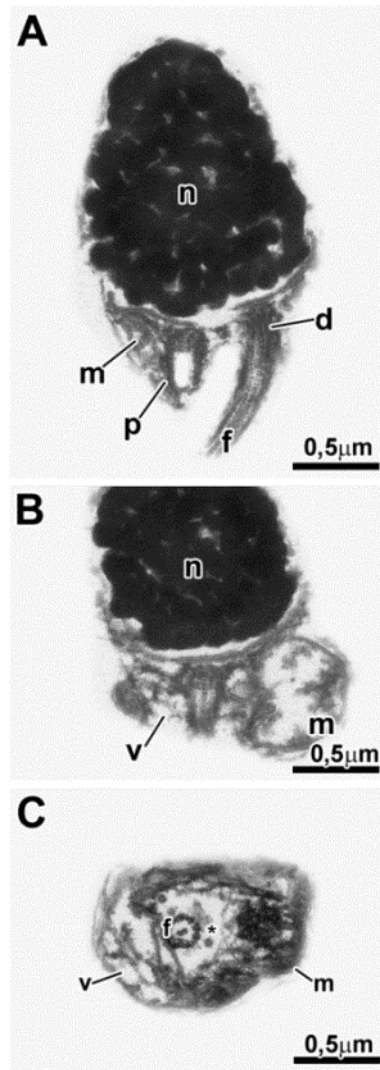


Figura 36. Espermatozoide de *Ichthyborys ornatus*. O núcleo (n) tem formato cônico, é excêntrico ao flagelo (f). A fossa nuclear está ausente. O complexo centriolar (p, d) dispõem-se lateralmente e quase paralelos um em relação ao outro. O canal citoplasmático está presente (asterisco). A peça intermediária (pi) é curta, e abriga as mitocôndrias alongadas (m) e as vesículas (v). d: centríolo distal, f: flagelo, m: mitocôndria, n: núcleo, p: centríolo proximal, v: vesícula, asterisco: canal citoplasmático.

Nannocharax sp.

O núcleo é cônico, com largura da base aproximada de 1,13 μm e comprimento de 1,5 μm (Fig. 37A-B). A cromatina é flocada e condensada em espessos conjuntos de fibras de alta densidade (Fig. 37A-D). O contorno nuclear não possui uma fossa nuclear. No complexo centriolar ambos os centríolos apresentam-se um tanto distantes entre si (Fig. 37B, E). Ocorre que os dois centríolos diferenciam-se em corpúsculo basal e apenas um origina o flagelo. Por convenção, o centríolo que organiza o axonema do flagelo será considerado como o centríolo distal para efeito de comparações. O centríolo proximal dispõe-se lateralmente ao centríolo distal e apresentam-se em ângulo ligeiramente oblíquo, quase paralelos entre si. A peça intermediária localiza-se na base do núcleo, é ligeiramente assimétrica e abriga as mitocôndrias e o sistema vesicular (Fig. 37A-C). As mitocôndrias tem formato alongado e aparentemente são ramificadas, e estão distribuídas na base do núcleo e nas bordas da peça intermediária (Fig. 37A, C, G). O sistema de endomembranas é composto por um conjunto regular de túbulos de pequeno diâmetro, em formato de ‘peneira’, distribuídas na porção final da peça intermediária (Fig. 37A-C, F). O flagelo possui o arranjo clássico do axonema (9+2) (Fig. 37H).

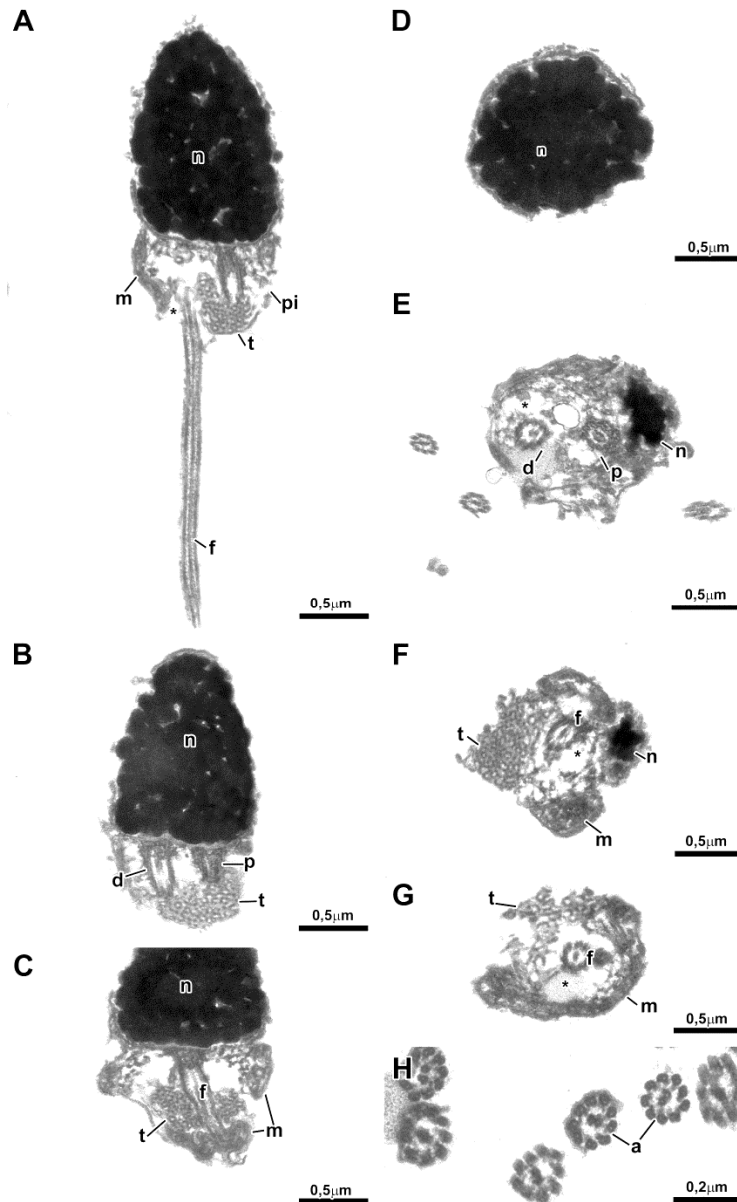


Figura 37. Espermatozoide de *Nannocharax* sp. A – C: Cortes longitudinais do espermatozoide. Note a presença de áreas elétrón-lúcidas no núcleo (n), a fossa nuclear única e ramificada (seta), a posição do centríolo proximal (p) em relação ao distal (d), a peça intermediária (pi) e o sistema de endomembranas em forma de túbulos regularmente distribuídos (t). D - G: Cortes transversais a partir do núcleo até o final da peça intermediária (pi). Note o formato alongado e aparentemente ramificado das mitocôndrias (m), o sistema de túbulos (t) e o canal citoplasmático (*). H: Detalhe do axonema (a) com arranjo clássico dos microtúbulos (9+2).

Neolebias trilineatus

O núcleo é cônico, com largura da base aproximada de 1,1 μm e comprimento de 1,7 μm (Fig. 38A). A cromatina é flocada e condensada em espessos conjuntos de fibras de alta densidade (Fig. 38A-C). O contorno nuclear não possui uma fossa nuclear. No complexo centriolar ambos os centríolos apresentam-se um tanto distantes entre si (Fig. 38B). Ocorre que os dois centríolos diferenciam-se em corpúsculo basal e apenas um origina o flagelo. Por convenção, o centríolo que organiza o axonema do flagelo será considerado como o centríolo distal para efeito de comparações (Fig. 38B). O centríolo proximal dispõe-se lateralmente ao centríolo distal e apresentam-se em ângulo ligeiramente oblíquo, quase paralelos entre si. A peça intermediária localiza-se na base do núcleo, é ligeiramente assimétrica e abriga as mitocôndrias e o sistema vesicular (Fig. 38A). As mitocôndrias tem formato alongado e aparentemente são ramificadas, e estão distribuídas na base do núcleo e nas bordas da peça intermediária (Figs. 38A, D). O sistema de endomembranas é composto por um conjunto irregular de túbulos e vesículas de pequeno diâmetro, distribuídas na porção final da peça intermediária (Fig. 38D). O flagelo possui o arranjo clássico do axonema (9+2) (não mostrado).

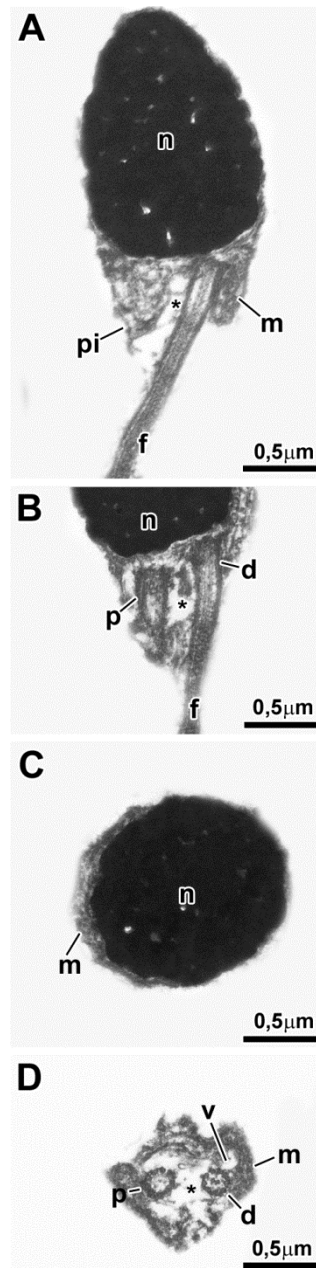


Figura 38. Espermatozoide de *Neolebias trilineatus*. O núcleo (n) tem formato cônico, é excêntrico ao flagelo (f). A fossa nuclear está ausente. O complexo centriolar (p, d) dispõem-se lateralmente e quase paralelos um em relação ao outro. O canal citoplasmático está presente (asterisco). A peça intermediária (pi) é curta, e abriga as mitocôndrias alongadas (m) e as vesículas (v). d: centríolo distal, f: flagelo, m: mitocôndria, n: núcleo, p: centríolo proximal, v: vesícula, asterisco: canal citoplasmático.

Phago boulengeri

O núcleo é cônico, com largura da base aproximada de 1,3 µm e comprimento de 1,6 µm (Fig. 39A). A cromatina é flocada e condensada em espessos conjuntos de fibras de alta densidade (Fig. 39A-C). O contorno nuclear não possui uma fossa nuclear. No complexo centriolar ambos os centríolos apresentam-se um tanto distantes entre si. Ocorre que os dois centríolos diferenciam-se em corpúsculo basal e apenas um origina o flagelo. Por convenção, o centríolo que organiza o axonema do flagelo será considerado como o centríolo distal para efeito de comparações (Fig. 39B). O centríolo proximal dispõe-se lateralmente ao centríolo distal e apresentam-se em ângulo ligeiramente oblíquo, quase paralelos entre si. A peça intermediária localiza-se na base do núcleo, é ligeiramente assimétrica e abriga as mitocôndrias e o sistema vesicular (Fig. 39A). As mitocôndrias tem formato alongado e aparentemente são ramificadas, e estão distribuídas na base do núcleo e nas bordas da peça intermediária (Fig. 39A-B, D). O sistema de endomembranas é composto por um conjunto irregular de túbulos e vesículas de pequeno diâmetro, distribuídas na porção final da peça intermediária (Fig. 39D). O flagelo possui o arranjo clássico do axonema (9+2) (não mostrado).

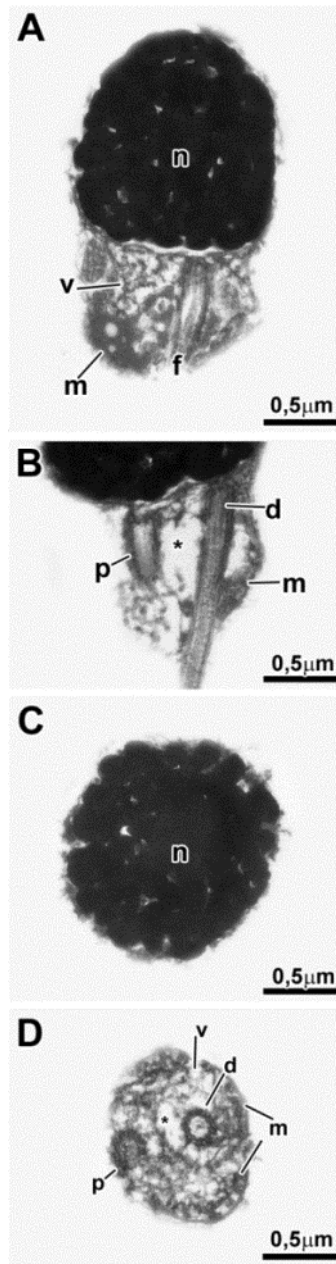


Figura 39. Espermatozoide de *Phago boulengeri*. O núcleo (n) tem formato cônico, é excêntrico ao flagelo (f). A fossa nuclear está ausente. O complexo centriolar (p, d) dispõem-se lateralmente e quase paralelos um em relação ao outro. O canal citoplasmático está presente (asterisco). A peça intermediária (pi) é curta, e abriga as mitocôndrias alongadas (m) e as vesículas (v). d: centríolo distal, f: flagelo, m: mitocôndria, n: núcleo, p: centríolo proximal, v: vesícula, asterisco: canal citoplasmático.

Xenocharax spilurus

O núcleo é esférico e ligeiramente excêntrico em relação ao eixo flagelar, com diâmetro aproximado de 1,5 μm (Fig. 40A). A cromatina é flocada e condensada em espessos conjuntos de fibras de alta densidade (Fig. 40A-C). O contorno nuclear não possui uma fossa nuclear. No complexo centriolar ambos os centríolos apresentam-se um tanto distantes entre si (Fig. 40A). Ocorre que os dois centríolos diferenciam-se em corpúsculo basal e apenas um origina o flagelo. Por convenção, o centríolo que organiza o axonema do flagelo será considerado como o centríolo distal para efeito de comparações (Figs. 40A, E). O centríolo proximal dispõe-se lateralmente ao centríolo distal e apresentam-se em ângulo ligeiramente oblíquo, quase paralelos entre si (Fig. 40A - E). A peça intermediária localiza-se na base do núcleo, é ligeiramente assimétrica e abriga as mitocôndrias e o sistema vesicular (Fig. 40A-B). As mitocôndrias tem formato alongado e aparentemente são ramificadas, e estão distribuídas na base do núcleo e nas bordas da peça intermediária (Fig. 40B-C). O sistema de endomembranas é composto por um conjunto irregular de túbulos e vesículas de pequeno diâmetro, distribuídas na porção final da peça intermediária (Fig. 40D). O flagelo possui o arranjo clássico do axonema (9+2) (não mostrado).

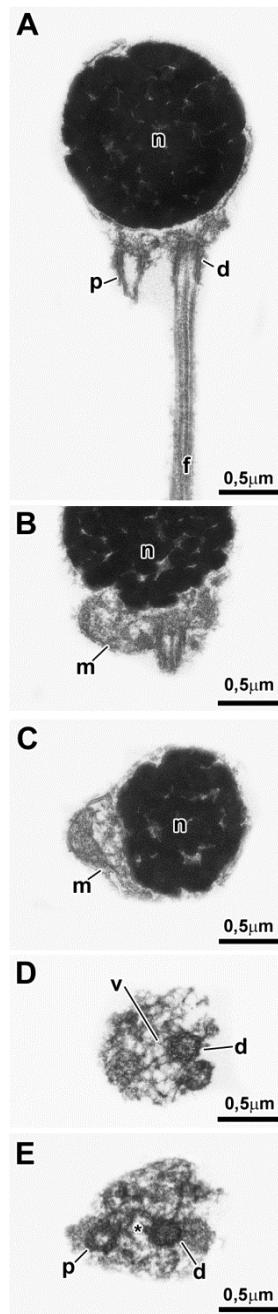


Figura 40. Espermatozoide de *Xenocharax spilurus*. O núcleo (n) tem formato esférico, é excêntrico ao flagelo (f). A fossa nuclear está ausente. O complexo centriolar (p, d) dispõem-se lateralmente e quase paralelos um em relação ao outro. O canal citoplasmático está presente (asterisco). A peça intermediária (pi) é curta, e abriga as mitocôndrias alongadas (m) e as vesículas (v). d: centríolo distal, f: flagelo, m: mitocôndria, n: núcleo, p: centríolo proximal, v: vesícula, asterisco: canal citoplasmático.

Família Hepsetidae

Hepsetus odoe

O núcleo é esférico, com diâmetro aproximado de 1,5 μm , e disposto lateralmente ao eixo flagelar (Fig. 41A). A cromatina é granular e altamente compactada e aparentemente sem áreas elétron-lúcidas (Fig. 41A, C). O contorno nuclear possui uma única depressão côncava, a fossa nuclear, em forma de arco, localizada lateralmente ao núcleo. Ambos os centríolos proximal e distal não estão inseridos na fossa nuclear (Fig. 41A). O centríolo proximal apresenta-se antero-lateral ao centríolo distal e apresentam-se oblíquos um em relação ao outro (Fig. 41A- B). A peça intermediária localiza-se na base do núcleo, é fortemente assimétrica e abriga o canal citoplasmático, as mitocôndrias e as vesículas (Fig. 41A-F). O canal citoplasmático está localizado entre a membrana da peça intermediária e a flagelar. As mitocôndrias têm formato alongado e estão distribuídas na região central da peça intermediária (Figs. 41A, E). O sistema de endomembranas é composto por vesículas (Fig. 41A, B, D-E) e túbulos grandes que se interconectam (Figs. 41B-C), distribuídos a partir da periferia de toda a peça intermediária e concentrando-se principalmente na segunda metade da peça intermediária entremeados pelas mitocôndrias. O flagelo possui o arranjo clássico do axonema (9+2) (não mostrado).

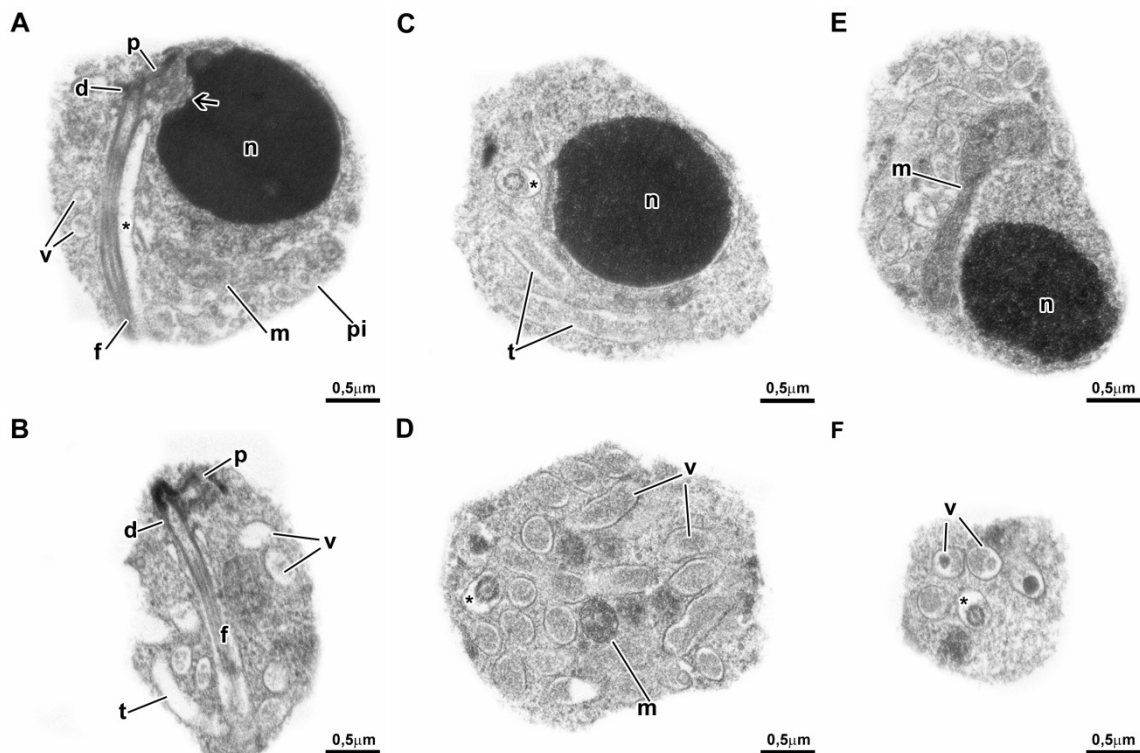


Figura 41. Espermatozoide de *Hepsetus odoe*. O núcleo (n) tem formato esférico, é lateral ao flagelo (f). A fossa nuclear é única. O complexo centriolar (p, d) dispõem-se lateralmente ao núcleo, e antero-lateralmente e oblíquos um em relação ao outro. O canal citoplasmático está presente (asterisco). A peça intermediária (pi) é curta, e abriga as mitocôndrias alongadas (m) e os túbulos (t) e vesículas (v). d: centríolo distal, f: flagelo, m: mitocôndria, n: núcleo, p: centríolo proximal, t: túbulo, v: vesícula, asterisco: canal citoplasmático, seta: fossa nuclear.

Família Lebiasinidae

Subfamília Pyrrhulininae

Copeina sp.

O núcleo é esférico, com diâmetro aproximado de 1,6 μm e apresenta-se fortemente excêntrico ao eixo flagelar (Fig. 42A). A cromatina é granular e altamente compactada e aparentemente com algumas áreas elétron-lucidas (Fig. 42A- C). O contorno nuclear possui uma única depressão côncava, a fossa nuclear, em forma de arco, e posicionada fortemente excêntrica ao núcleo (Fig. 42B). Apenas o centríolo proximal está inserido na fossa nuclear (Fig. 42B-C). O centríolo proximal apresenta-se antero-lateral ao centríolo distal e apresentam-se oblíquos um em relação ao outro (Fig. 42B-C). A peça intermediária localiza-se na base do núcleo, é ligeiramente assimétrica e abriga o canal citoplasmático, as mitocôndrias e as vesículas (Fig. 42A-C). O canal citoplasmático está localizado entre a membrana da peça intermediária e a flagelar. Não há informação sobre a forma das mitocôndrias e vesículas devido ao estado de preservação do material.

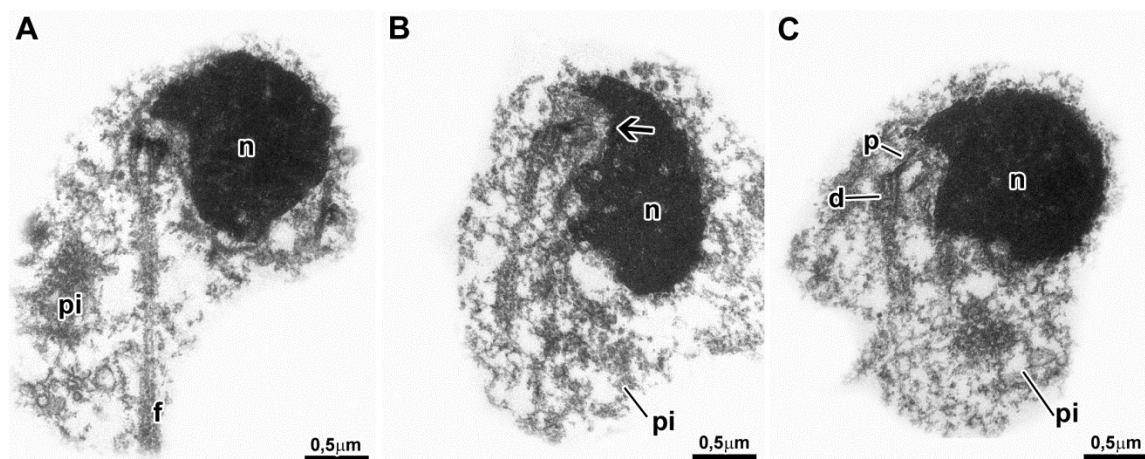


Figura 42. Espermatozoide de *Copeina* sp. O núcleo (n) tem formato esférico, é lateral ao flagelo (f). A fossa nuclear é única. O complexo centriolar (p, d) dispõem-se lateralmente ao núcleo, e antero-lateralmente e oblíquos um em relação ao outro. O canal citoplasmático está presente (asterisco). A peça intermediária (pi) é curta. Devido à condição de preservação do material não é possível obter informações sobre as mitocôndrias e o sistema de endomembranas. d: centríolo distal, f: flagelo, n: núcleo, p: centríolo proximal, asterisco: canal citoplasmático, seta: fossa nuclear.

Copella nattereri

O núcleo é esférico, com diâmetro aproximado de 2,0 µm e apresenta-se fortemente excêntrico ao eixo flagelar (Fig. 43A). A cromatina é granular e altamente compactada e aparentemente com áreas elétron-lucidas (Fig. 43A- C). O contorno nuclear possui uma única depressão côncava, a fossa nuclear, em forma de arco, e posicionada fortemente excêntrica ao núcleo. Apenas o centríolo proximal está inserido na fossa nuclear (Fig. 43A). O centríolo proximal apresenta-se antero-lateral ao centríolo distal e apresentam-se oblíquos um em relação ao outro (Fig. 43A). A peça intermediária localiza-se na base do núcleo, é ligeiramente assimétrica e abriga o canal citoplasmático, as mitocôndrias e as vesículas (Fig. 43A- B). O canal citoplasmático está localizado entre a membrana da peça intermediária e a flagelar. As mitocôndrias têm formato esférico e estão distribuídas por toda a peça intermediária (Fig. 43A- B, D). O sistema de endomembranas é composto por vesículas grandes que se interconectam, distribuídos a partir da periferia de toda a peça intermediária e concentrando-se principalmente na segunda metade da peça intermediária entremeados pelas mitocôndrias (Fig. 43A-D). O flagelo possui o arranjo clássico do axonema (9+2) (não mostrado).

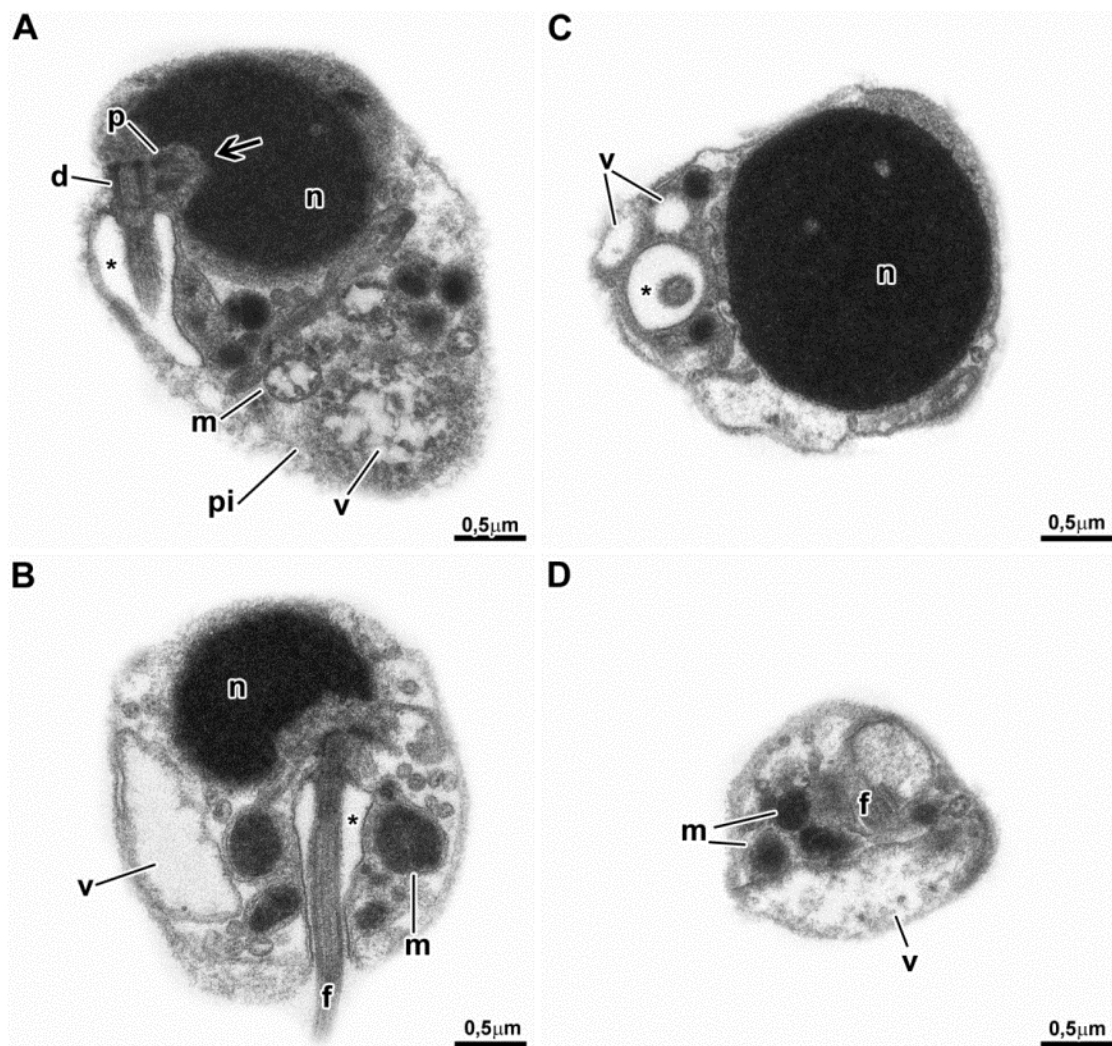


Figura 43. Espermatozoide de *Copella nattereri*. O núcleo (n) tem formato esférico, é lateral ao flagelo (f). A fossa nuclear é única. O complexo centriolar (p, d) dispõem-se lateralmente ao núcleo, e antero-lateralmente e oblíquos um em relação ao outro. O canal citoplasmático está presente (asterisco). A peça intermediária (pi) é curta, e abriga as mitocôndrias esféricas (m) e as vesículas (v). d: centríolo distal, f: flagelo, m: mitocôndria, n: núcleo, p: centríolo proximal, v: vesícula, asterisco: canal citoplasmático, seta: fossa nuclear.

Nannostomus beckfordi

O núcleo é esférico e lateral ao eixo flagelar, com diâmetro aproximado de 2,3 μm (Fig. 44A). A cromatina é granular e altamente compactada (Fig. 44A) com algumas áreas elétron-lúcidas. O contorno nuclear possui uma única depressão côncava, a fossa nuclear, localizada lateralmente ao núcleo, que abriga totalmente apenas o centríolo proximal, sendo o distal completamente fora (Fig. 44B). O centríolo proximal dispõe-se antero-lateral ao centríolo distal e apresentam-se em ângulo oblíquo, um em relação ao outro (Fig. 44B). A peça intermediária localiza-se na base do núcleo, é fortemente assimétrica e abriga o canal citoplasmático, as mitocôndrias e as vesículas (Fig. 44A). O canal citoplasmático está localizado entre a membrana da peça intermediária e a flagelar, apresentando-se muito curto (Fig. 44A- B). As mitocôndrias tem formato alongado e estão distribuídas concentricamente na peça intermediária ao redor do canal citoplasmático (Fig. 44C). O sistema de endomembranas é composto por vesículas dispersas na periferia da peça intermediária, e por um conjunto de vesículas interconectadas, com aspecto rendilhado, distribuídas em uma dada região da peça intermediária (Fig. 44A, D). O flagelo possui o arranjo clássico do axonema (9+2) (não mostrado).

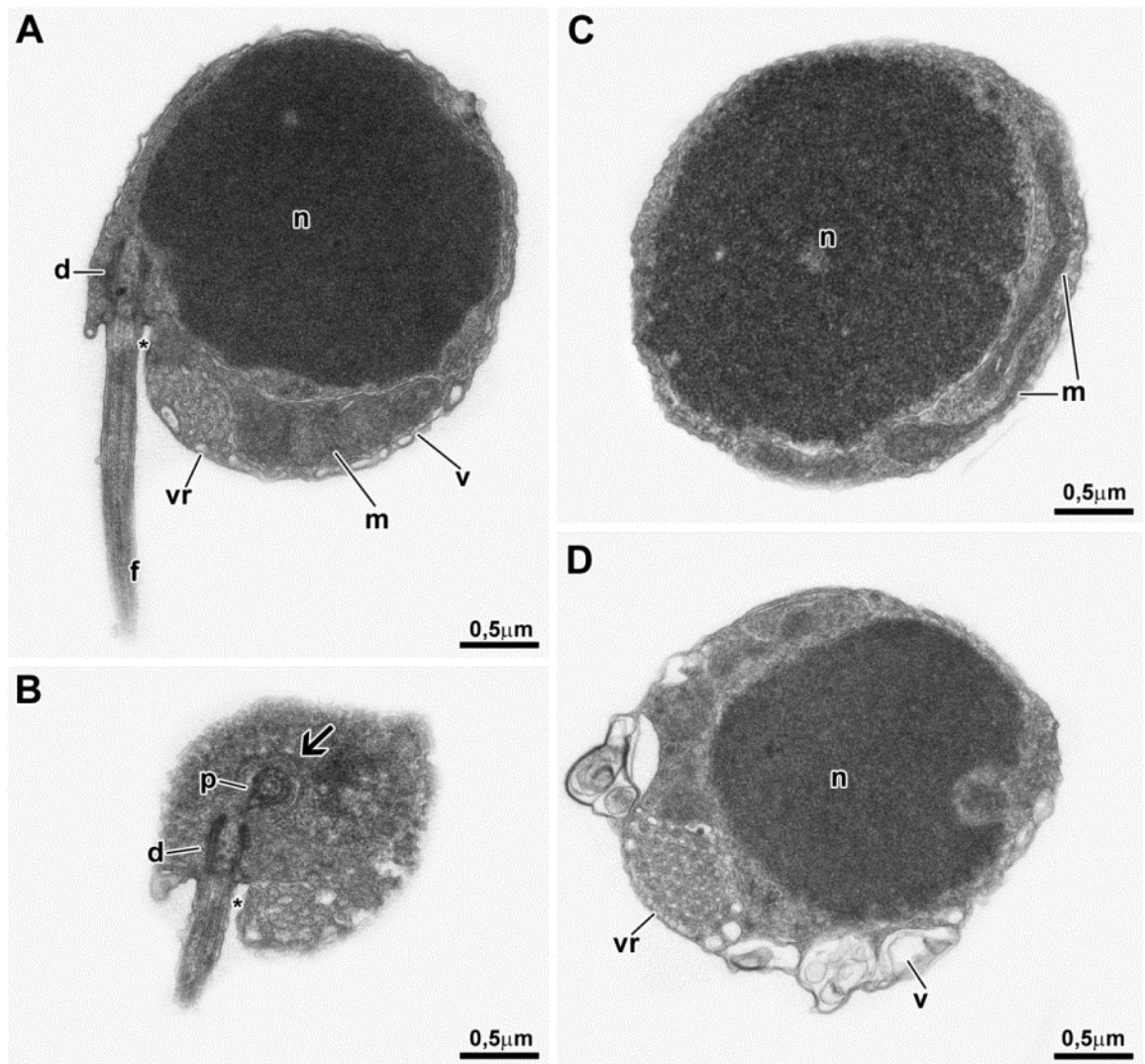


Figura 44. Espermatozoide de *Nannostomus beckfordi*. O núcleo (n) tem formato esférico, é lateral ao flagelo (f). A fossa nuclear é única. O complexo centriolar (p, d) dispõem-se lateralmente ao núcleo, e antero-lateralmente e oblíquos um em relação ao outro. O canal citoplasmático está presente (asterisco). A peça intermediária (pi) é curta, e abriga as mitocôndrias alongadas (m) e as vesículas (v), e o sistema de vesículas reticulares (vr). d: centríolo distal, f: flagelo, m: mitocôndria, n: núcleo, p: centríolo proximal, v: vesícula, asterisco: canal citoplasmático, seta: fossa nuclear.

Nannostomus nitidus

O núcleo é esférico e lateral ao eixo flagelar com diâmetro aproximado de 2,3 μm (Fig. 45A). A cromatina é granular e altamente compactada (Fig. 45A) com algumas áreas elétron-lúcidas. O contorno nuclear possui uma única depressão côncava, a fossa nuclear, localizada lateralmente ao núcleo (Fig. 45A). Ambos o centríolos proximal e distal estão fora da fossa nuclear. O centríolo proximal dispõe-se anteriormente ao centríolo distal e apresentam-se em ângulo oblíquo, um em relação ao outro (Fig. 45A- B). A peça intermediária localiza-se na base do núcleo, é fortemente assimétrica e abriga o canal citoplasmático, as mitocôndrias e as vesículas (Fig. 45A). O canal citoplasmático está localizado entre a membrana da peça intermediária e a flagelar, apresentando-se muito curto (Fig. 45A- C). As mitocôndrias tem formato alongado e estão distribuídas concentricamente na peça intermediária ao redor do canal citoplasmático (Fig. 45D). O sistema de endomembranas é composto por vesículas dispersas na periferia da peça intermediária (Fig. 45A- C). O flagelo possui o arranjo clássico do axonema (9+2) (não mostrado).

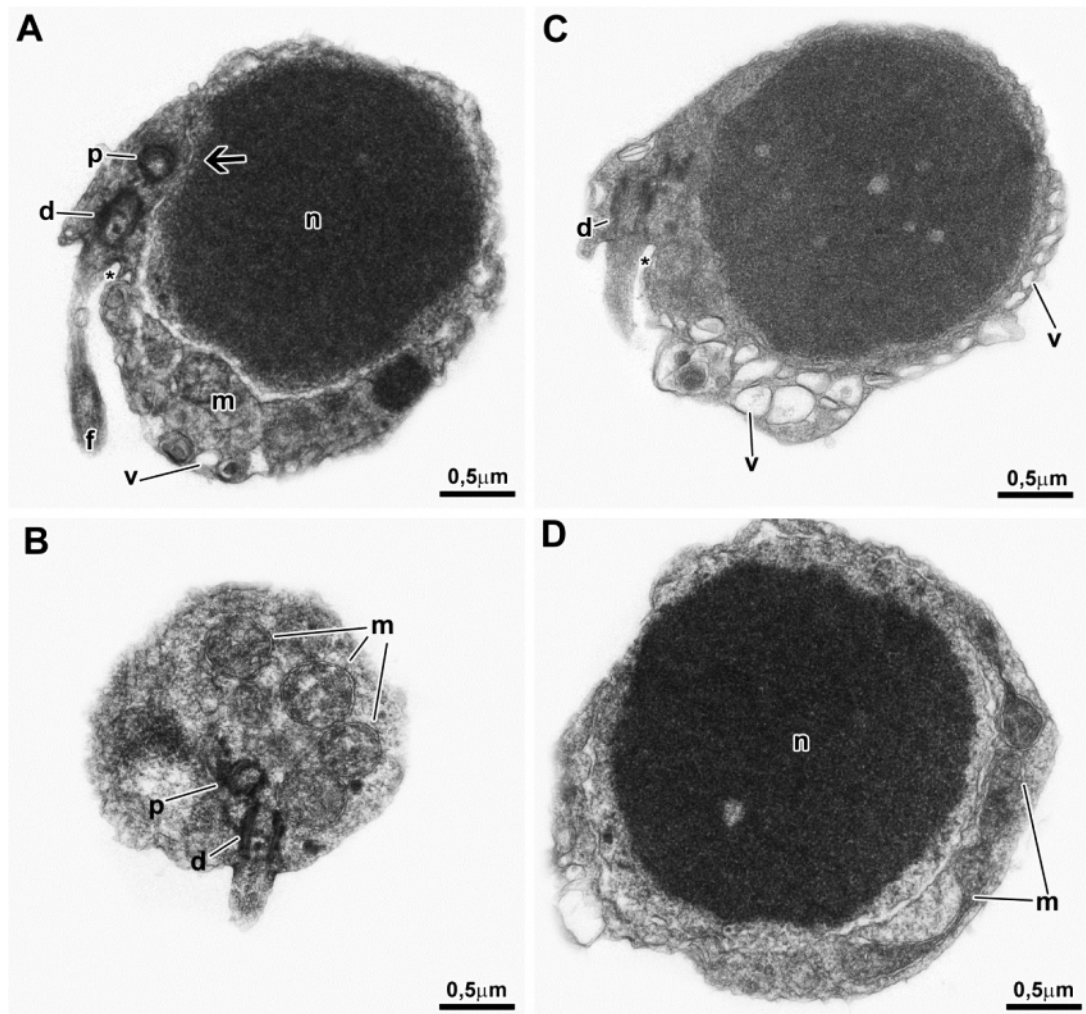


Figura 45. Espermatozoide de *Nannostomus nitidus*. O núcleo (n) tem formato esférico, é lateral ao flagelo (f). A fossa nuclear é única. O complexo centriolar (p, d) dispõem-se lateralmente ao núcleo, e antero-lateralmente e oblíquos um em relação ao outro. O canal citoplasmático está presente (asterisco). A peça intermediária (pi) é curta, e abriga as mitocôndrias alongadas (m) e as vesículas (v). d: centríolo distal, f: flagelo, m: mitocôndria, n: núcleo, p: centríolo proximal, v: vesícula, asterisco: canal citoplasmático, seta: fossa nuclear.

Nannostomus eques

O núcleo é esférico e lateral ao eixo flagelar com diâmetro aproximado de 1,8 μm (Fig. 46A- B). A cromatina é granular e altamente compactada (Fig. 46A- C). O contorno nuclear possui uma única depressão côncava, a fossa nuclear, localizada lateralmente ao núcleo (Fig. 46A). Ambos o centríolos proximal e distal estão fora da fossa nuclear. O centríolo proximal dispõe-se anteriormente ao centríolo distal e apresentam-se em ângulo oblíquo, um em relação ao outro (Fig. 46B). A peça intermediária localiza-se na base do núcleo, é fortemente assimétrica e abriga o canal citoplasmático, as mitocôndrias e as vesículas (Fig. 46A). O canal citoplasmático está localizado entre a membrana da peça intermediária e a flagelar, apresentando-se muito curto (Fig. 46A). As mitocôndrias tem formato alongado e estão distribuídas concentricamente na peça intermediária ao redor do canal citoplasmático (Fig. 46A- D). O sistema de endomembranas é composto por vesículas dispersas na periferia da peça intermediária (Fig. 46B, D). O flagelo possui o arranjo clássico do axonema (9+2) (não mostrado).

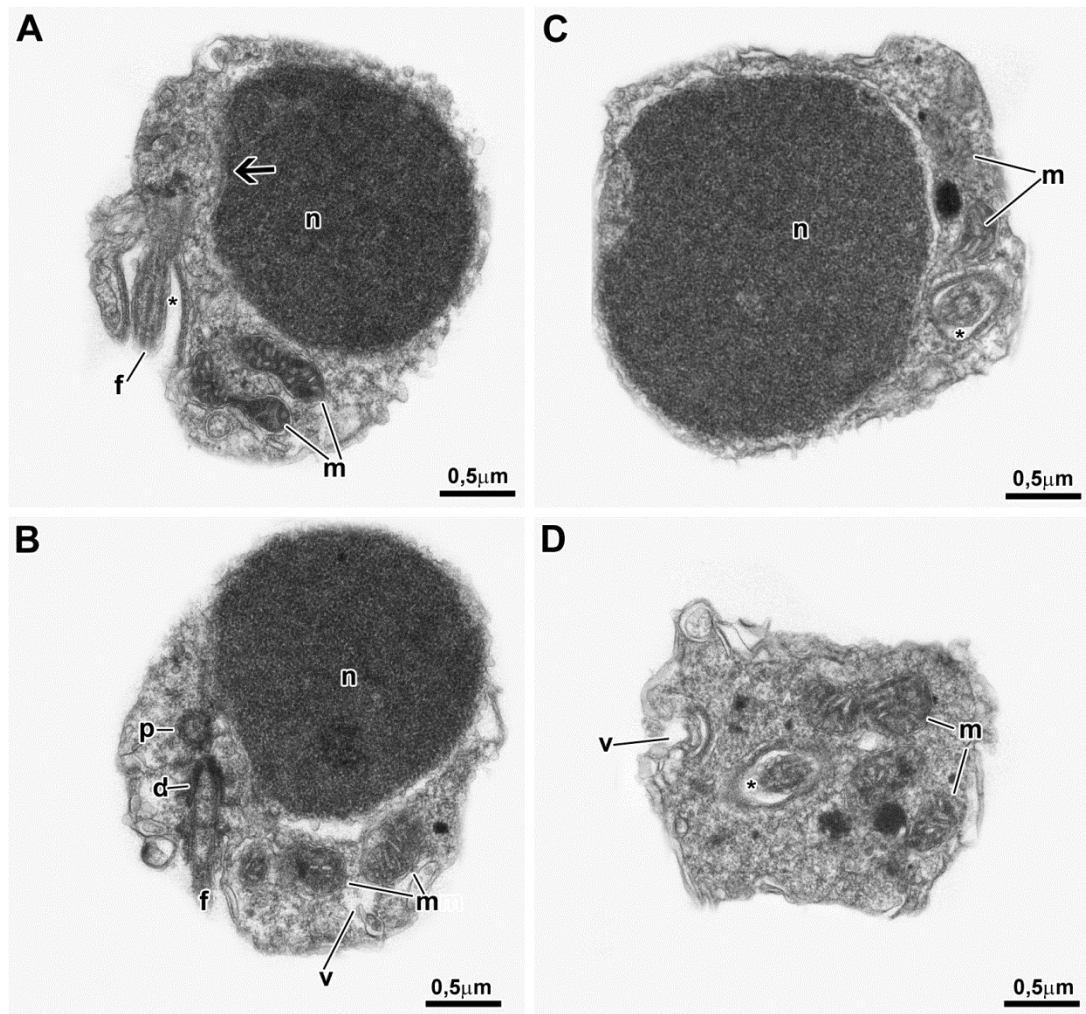


Figura 46. Espermatozoide de *Nannostomus eques*. O núcleo (n) tem formato esférico, é lateral ao flagelo (f). A fossa nuclear é única. O complexo centriolar (p, d) dispõem-se lateralmente ao núcleo, e antero-lateralmente e oblíquos um em relação ao outro. O canal citoplasmático está presente (asterisco). A peça intermediária (pi) é curta, e abriga as mitocôndrias alongadas (m) e as vesículas (v). d: centríolo distal, f: flagelo, m: mitocôndria, n: núcleo, p: centríolo proximal, v: vesícula, asterisco: canal citoplasmático, seta: fossa nuclear.

Subfamília Lebiasininae

Lebiasina aff. *festae*, *L. bimaculata*, *L. erythrinoides*, *L. melanoguttata*, *L. aff. uruyensis*1, *L. aff. uruyensis*2, *Piabucina boruca*, *P. elongata* e *P. panamensis*

O núcleo dos espermatozoides de todas as espécies é lateral ao eixo flagelar e possui a forma de ‘gota’ sendo ligeiramente alongado em direção ao flagelo (Figs. 47a, d, g, 48a, d, g, 49a, d, g). O comprimento do núcleo foi mensurado pelo eixo longitudinal x eixo transversal sendo em *Lebiasina* aff. *festae* 1,7 x 1,4 µm, *L. bimaculata* 1,9 x 1,1 µm, *L. erythrinoides* 1,7 x 1,1 µm, *L. melanoguttata* 2,0 x 1,4 µm, *L. aff. uruyensis*1 2,2 x 1,5 µm, *L. aff. uruyensis*2 1,9 x 1,3 µm, *Piabucina boruca* 1,8 x 1,3 µm, *P. elongata* 2,1 x 1,3 µm, e in *P. panamensis* 1,8 x 1,3 µm. No contorno do núcleo, a fossa nuclear é dupla e rasa. O complexo centriolar possui uma posição superolateral próximo ao topo do núcleo (Figs. 47a, d, g, 48a, d, g, 49a, d, g). A porção final anterior do centríolo proximal está parcialmente inserida na primeira depressão da fossa nuclear, e o centríolo distal está totalmente fora (Figs. 47a-inset, d-inset, g-inset, 48a, d, g, 49a, d, g). O centríolo proximal é anterior em relação ao distal (Figs. 47a-inset, d-inset, g-inset, 48a, d, g, 49a, d, g). A orientação do centríolo proximal é ligeiramente oblíqua em relação ao distal (Figs. 47a-inset, d-inset, g-inset, 48a, d, g, 49a, d, g). No complexo centriolar duas raízes estriadas irradiam-se a partir dos lados opostos do centríolo distal (Figs. 47b, e, h, 48b, e, h, 49b, e, h). A peça intermediária é fortemente assimétrica e abriga o canal citoplasmático, o sistema de endomembranas e poucas mitocôndrias oblongas (Figs. 47a, c, d, f, g, i, 48a, c, d, f, g, i, 49a, c, d, f, g, i). Consequentemente a peça intermediária é formada por uma porção maior que abriga o sistema de endomembranas e as mitocôndrias concentrada na base do núcleo, e uma porção estreita de citoplasma sem organelas (Figs. 47a, c, d, f, g, i, 48a, c, d, f, g, i, 49a, c, d, f, g, i). O sistema de endomembranas é composto por poucas vesículas aparentemente esféricas de pequeno diâmetro (Figs. 47c, f, i, 48c, f, i, 49c, f, i). O flagelo contém o arranjo clássico do axonema (9+2) e não apresenta projeções laterais de membrana ou aletas (Figs. 47a, d, g, 48a, d, g, 49a, d, g).

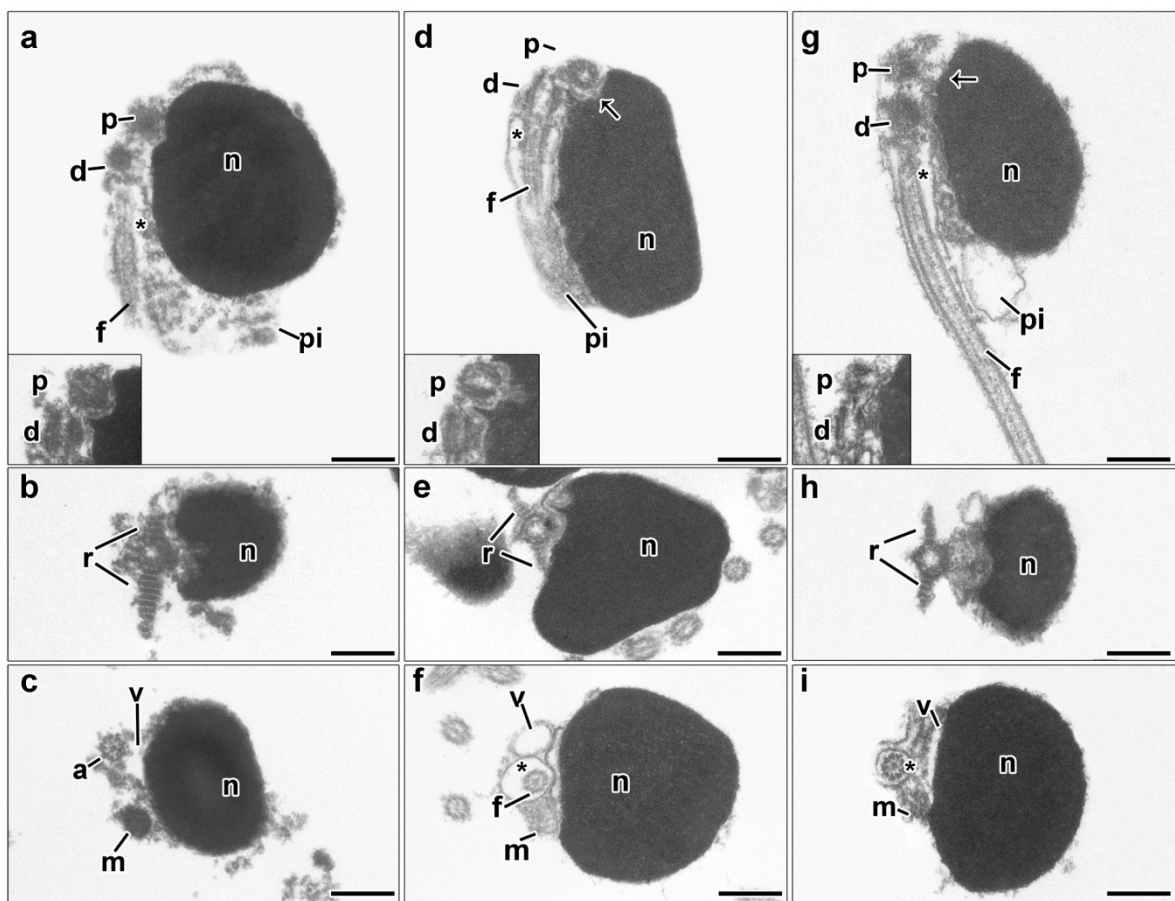


Figura 47. Espermatozoide de *Lebiasina* aff. *festae* (A, B, C), *L. bimaculata* (D, E, F), *L. erythrinoides* (G, H, I). O núcleo (n) de todas as espécies tem forma de ‘gota’, é lateral ao flagelo (f) e ligeiramente alongado em direção ao flagelo. O complexo centriolar (p, d) e a fossa nuclear (seta) é superolateral. Note a presença das raízes estriadas (r) nos dois lados opostos do centríolo distal (d). O centríolo proximal (p) é ligeiramente oblíquo em relação ao distal (d) (a-inset, d-inset, g-inset). O canal citoplasmático está presente (asterisco). A peça intermediária (pi) é curta e assimétrica, e abriga as mitocôndrias oblongas (m) e as vesículas (v). a: axonema, d: centríolo distal, f: flagelo, m: mitocôndria, n: núcleo, p: centríolo proximal, r: raiz estriada, v: vesícula, asterisco: canal citoplasmático, seta: fossa nuclear. Barra: 0,5 μ m.

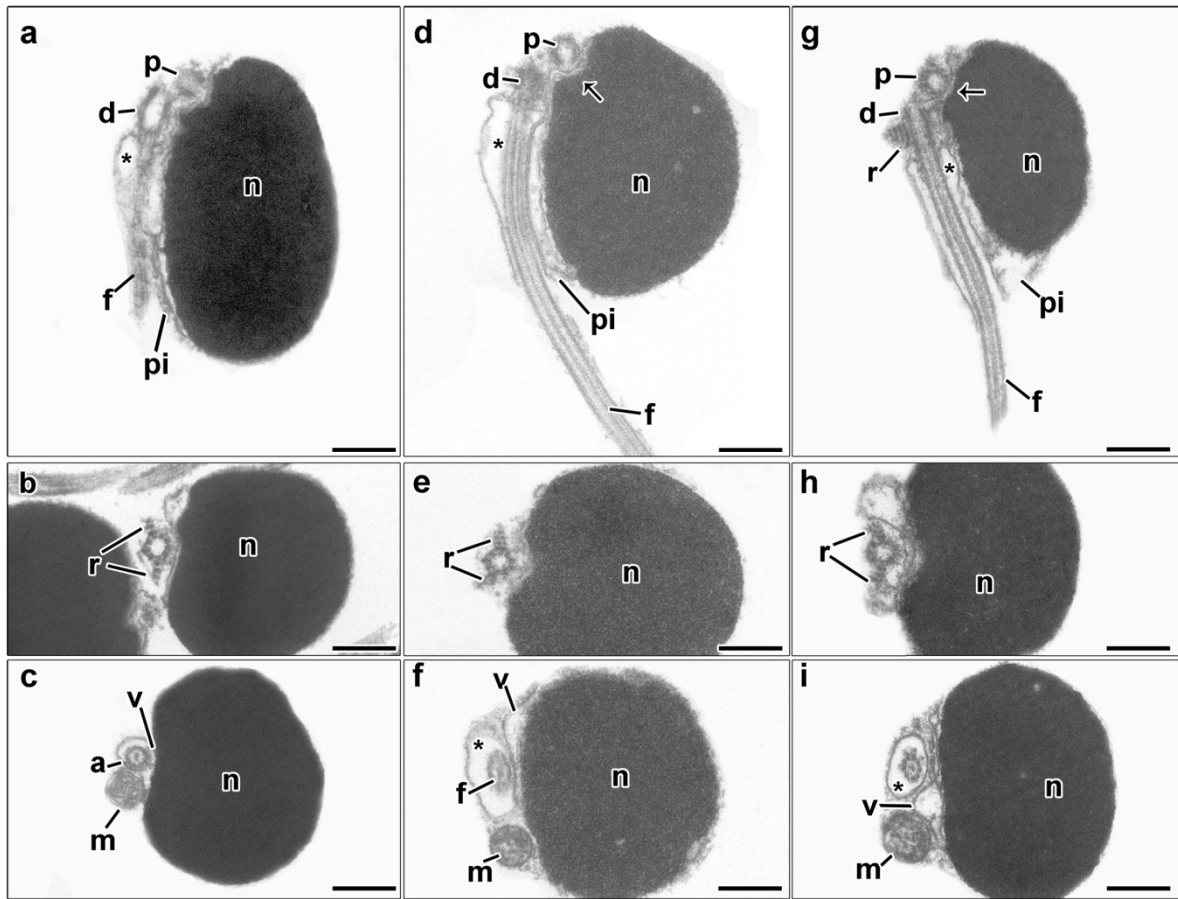


Figura 48. Espermatozoide de *Lebiasina melanoguttata* (A, B, C), *L. aff. uruyensis1* (D, E, F), *L. aff. uruyensis2* (G, H, I). O núcleo (n) de todas as espécies tem forma de ‘gota’, é lateral ao flagelo (f) e ligeiramente alongado em direção ao flagelo. O complexo centriolar (p, d) e a fossa nuclear (seta) é superolateral. Note a presença das raízes estriadas (r) nos dois lados opostos do centríolo distal (d). O centríolo proximal (p) é ligeiramente oblíquo em relação ao distal (d). O canal citoplasmático está presente (asterisco). A peça intermediária (pi) é curta e assimétrica, e abriga as mitocôndrias oblongas (m) e as vesículas (v). a: axonema, d: centríolo distal, f: flagelo, m: mitocôndria, n: núcleo, p: centríolo proximal, r: raiz estriada, v: vesícula, asterisco: canal citoplasmático, seta: fossa nuclear. Barra: 0,5 μ m.

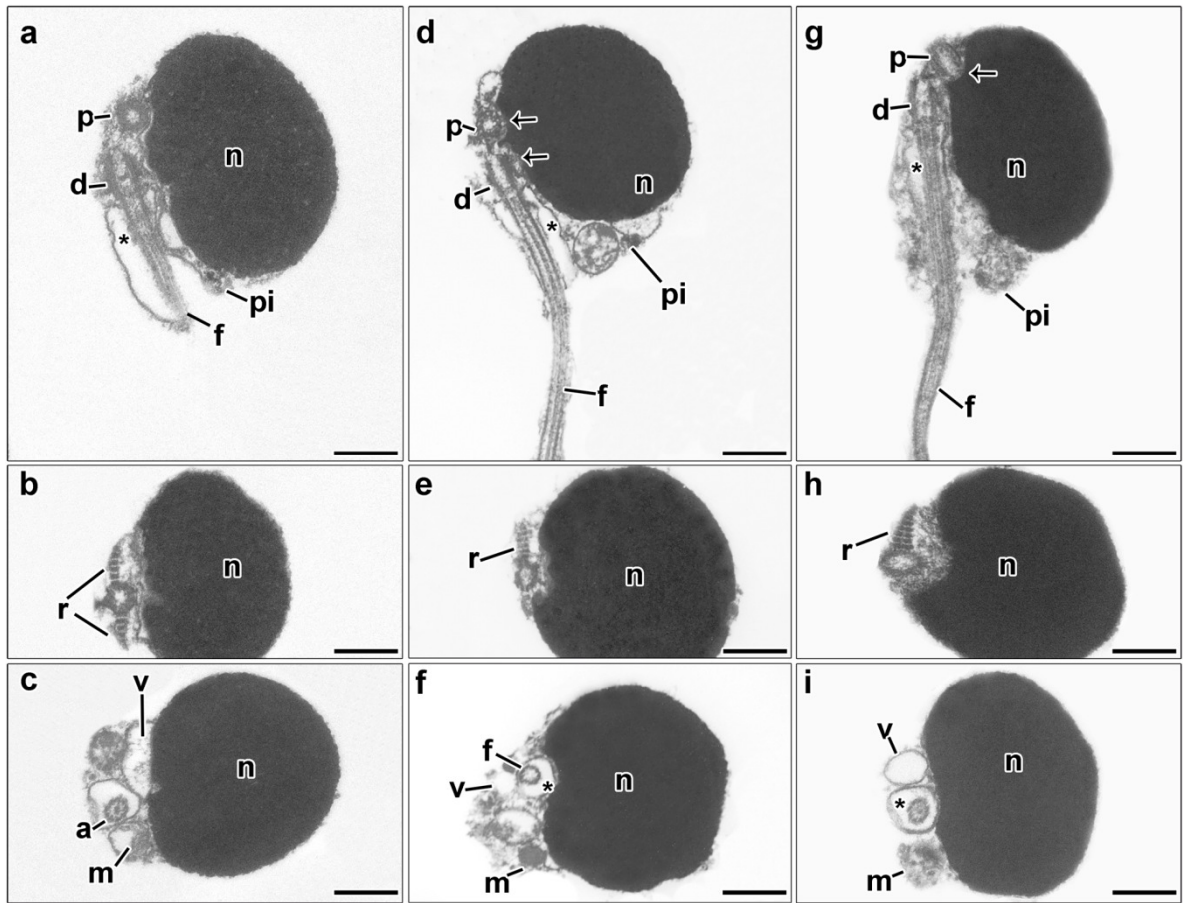


Figura 49. Espermatozoide de *Piabucina boruca* (A, B, C), *P. elongata* (D, E, F), *P. panamensis* (G, H, I). O núcleo (n) de todas as espécies tem forma de ‘gota’, é lateral ao flagelo (f) e ligeiramente alongado em direção ao flagelo. O complexo centriolar (p, d) e a fossa nuclear (seta) é superolateral. Note a presença das raízes estriadas (r) nos dois lados opostos do centríolo distal (d). O centríolo proximal (p) é ligeiramente oblíquo em relação ao distal (d). O canal citoplasmático está presente (asterisco). A peça intermediária (pi) é curta e assimétrica, e abriga as mitocôndrias oblongas (m) e as vesículas (v). a: axonema, d: centríolo distal, f: flagelo, m: mitocôndria, n: núcleo, p: centríolo proximal, r: raiz estriada, v: vesícula, asterisco: canal citoplasmático, seta: fossa nuclear. Barra: 0,5 μ m.

2. Lista de caracteres morfológicos

A seguir são descritos 61 caracteres, sendo 03 provenientes do modo de reprodução e morfologia do testículo (caracteres 0 a 2), 11 da espermiogênese e espermátides (caracteres 3 ao 13) e 47 da forma final do espermatozoide (caracteres 14 ao 60). Entre parênteses são citados os primeiros estudos nos quais aparecem as descrições dos caracteres e/ou seus respectivos estados de caráter.

Modo de reprodução e morfologia testicular

0. Modo de reprodução por inseminação (Mirande, 2009 – caracter 353):

(0) ausente

(1) presente

1. Estrutura testicular com condição Tripartite (Baicere-Silva, 2013 – caracter 1):

(0) ausente

(1) presente

2. Disposição dos espermatozoides no compartimento luminal do testículo:

(0) aleatória

(1) espermatozeugmata (Ferreira *et al.*, 2011 – caracter 35)

Espermiogênese e espermátides

3. Local de finalização da espermiogênese (Baicere-Silva, 2013 – caracter 3):

(0) no cisto - cística

(1) no lúmen - parcialmente cística

4. Posição inicial do flagelo em relação ao núcleo:

(0) lateral

(1) excêntrico a medial

5. Posição do centríolo proximal em relação ao centríolo distal (núcleo inicial excêntrico a medial):

(0) anterior, medial e perpendicular

(1) antero-lateral e oblíquo com ângulo agudo ($< 90^\circ$)

(2) lateral e paralelo

*não se aplica ao estado (0) do carácter 4

6. Posição do centríolo proximal em relação ao centríolo distal (núcleo inicial lateral):

(0) anterior, medial e perpendicular

(1) antero-lateral e oblíquo com ângulo obtuso ($>90^\circ$)

(2) antero-lateral e oblíquo com ângulo agudo ($< 90^\circ$)

(3) anterior, ligeiramente deslocado e oblíquo

(4) antero-lateral e perpendicular

*não se aplica ao estado (1) do carácter 4

7. Movimentação do núcleo em direção/sobre ao complexo centriolar (apenas para flagelo inicial lateral ao núcleo):

(0) presente

(1) ausente

*não se aplica ao estado (1) do carácter 4

8. Rotação do núcleo em direção ao flagelo:

(0) ausente

(1) presente

9. Rotação nuclear sobre o complexo centriolar (aplicável para núcleo inicial lateral):

(0) presente

(1) ausente

*não se aplica ao estado (1) do carácter 4

10. Tipo de rotação nuclear sobre o complexo centriolar (aplicável para núcleo inicial lateral):

(0) total

(1) parcial

*não se aplica ao estado (1) do caracter 4

11. Alongamento do núcleo:

(0) ausente

(1) presente em direção ao eixo flagelar

12. Fossa nuclear (Ferreira *et al.*, 2011 – caracter 18):

(0) ausente

(1) presente

13. Centríolo distal diferenciado em corpúsculo basal:

(0) ausente

(1) presente

Espermatozoide

14. Forma do núcleo inicialmente lateral ao corte longitudinal:

(0) esférico

(1) gota

(2) oval

(3) arqueado

*não se aplica ao estado (1) do caracter 4

15. Forma do núcleo inicialmente excêntrico a medial ao corte longitudinal:

(0) cônico

(1) esférico

*não se aplica ao estado (0) do caracter 4

16. Posição do núcleo em relação ao eixo flagelar (flagelo inicial lateral ao núcleo):

(0) medial

(1) excêntrico

(2) fortemente excêntrico

(3) lateral

*não se aplica ao estado (1) do carácter 4

17. Posição do núcleo em relação ao eixo flagelar (flagelo inicial excêntrico a medial ao núcleo):

(0) excêntrico

(1) lateral

*não se aplica ao estado (0) do carácter 4

18. Distribuição da cromatina no núcleo:

(0) grandes conjuntos fibrosos de cromatina próximos uns dos outros

(1) grandes conjuntos fibrosos de cromatina interespaçados por áreas elétron-lúcidas

(2) cromatina com aspecto fibrilar, do tipo "esponja de aço"

(3) finamente granular e homogênea

(4) conjuntos fibrosos esparsos distribuídos aleatoriamente

19. Áreas elétron-lúcidas no núcleo:

(0) presente

(1) ausente

20. Compartimentos membranosos (lamellae anulata) distribuídos pelo citoplasma ao redor do núcleo:

(0) ausente

(1) presente

21. Arranjo da fossa nuclear:

(0) única cavidade

(1) dupla cavidade

22. Forma da fossa nuclear com uma única cavidade:

- (0) arco raso
- (1) arco ramificado
- (2) arco profundo não ramificado
- *não se aplica ao estado (1) do caracter 21

23. Posição do complexo centriolar em relação ao núcleo inicial lateral:

- (0) excêntrico
- (1) medial
- (2) fortemente excêntrico
- (3) lateral
- (4) superolateral
- (5) anteromedial
- *não se aplica ao estado (1) do caracter 4

24. Posição do complexo centriolar em relação ao núcleo inicial excêntrico a medial:

- (0) excêntrico
- (1) fortemente excêntrico
- (2) lateral
- *não se aplica ao estado (0) do caracter 4

25. Posição relativa entre os centríolos proximal e distal (núcleo inicial excêntrico a medial):

- (0) centríolo proximal lateral e paralelo ao distal
- (1) centríolo proximal anterior, medial e perpendicular ao distal
- (2) centríolo proximal anterior, lateral e ângulo agudo ao distal
- *não se aplica ao estado (0) do caracter 4

26. Posição relativa entre os centríolos proximal e distal (núcleo inicial lateral):

- (0) centríolo proximal anterior, medial e perpendicular ao distal
- (1) centríolo proximal anterior, medial e oblíquo ao distal
- (2) centríolo proximal anterior, lateral e angulo agudo ao distal

- (3) centríolo proximal anterior, lateral e perpendicular ao distal
 - (4) centríolo proximal anterior, lateral e angulo obtuso ao distal
 - (5) centríolo proximal anterior, medio-lateral e perpendicular ao distal
- *não se aplica ao estado (1) do caracter 4

27. Inserção do complexo centriolar na fossa nuclear única:

- (0) ambos os centríolos fora da fossa
- (1) apenas o centríolo proximal está inserido na fossa nuclear
- (2) centríolo proximal e distal estão inseridos na fossa nuclear
- (3) centríolo proximal e distal parcialmente inseridos

*não se aplica ao estado (1) do caracter 21

28. Inserção do centríolo distal na fossa nuclear única:

- (0) parcial, aproximadamente 2/3 ou mais
- (1) total

*não se aplica ao estado (1) do caracter 21; e aos estados (0), (1) do caracter 27

29. Inserção do complexo centriolar na fossa nuclear dupla:

- (0) apenas o centríolo proximal está inserido na fossa nuclear
- (1) centríolo proximal e distal inseridos

*não se aplica ao estado (0) do caracter 21

30. Inserção do centríolo proximal na fossa nuclear dupla:

- (0) parcial
- (1) total

*não se aplica ao estado (0) do caracter 21

31. Inserção da porção inicial do flagelo na fossa nuclear:

- (0) ausente
- (1) presente

32. Filamentos de ancoragem do tipo "raízes estriadas":

(0) ausente

(1) presente

33. Irradiação das "raízes estriadas":

(0) a partir do complexo centriolar

(1) a partir do centríolo distal

*não se aplica ao estado (0) do carácter 32

34. Fibrilas de ancoragem não estriadas que irradiam em direção ao núcleo:

(0) ausente

(1) presente

35. Canal citoplasmático:

(0) presente

(1) ausente

36. Anel concêntrico membranoso presente no canal citoplasmático:

(0) ausente

(1) presente

*não se aplica ao estado (1) do carácter 35

37. Peça intermediária:

(0) presente

(1) ausente

38. Simetria da peça intermediária em relação ao comprimento (sentido longitudinal)

(Ferreira *et al.*, 2011 – carácter 27):

(0) simétrica

(1) assimétrica

*não se aplica ao estado (1) do carácter 37

39. Túbulos membranosos na peça intermediária:

(0) ausente

(1) presente

*não se aplica ao estado (1) do carácter 37

40. Quantidade e forma das mitocôndrias:

(0) várias alongadas e/ou ramificadas

(1) várias oblongas

(2) várias esféricas

(3) única arredondada

(4) única em forma de “c”

(5) única ramificada

41. Mitocôndrias distribuídas próximas ao núcleo:

(0) periféricas ao redor de todo o núcleo

(1) apenas na base do núcleo

(2) a partir da região medial

(3) na extremidade do núcleo, envolvendo-o

42. Localização das mitocôndrias na região anterior da peça intermediária ao corte transversal (Baicere-Silva, 2013 – carácter 43):

(0) apenas em um dos lados

(1) preferencialmente em um dos lados

(2) nos dois lados

(3) ausente

*não se aplica ao estado (1) do carácter 37

43. Localização das mitocôndrias na região intermediária da peça intermediária ao corte transversal (Baicere-Silva, 2013 – carácter 44):

(0) apenas em um dos lados

(1) preferencialmente em um dos lados

(2) nos dois lados

(3) ausente

*não se aplica ao estado (1) do carácter 37

44. Localização das mitocôndrias na região posterior da peça intermediária ao corte transversal (Baicere-Silva, 2013 – carácter 45):

(0) apenas em um dos lados

(1) preferencialmente em um dos lados

(2) nos dois lados

(3) ausente

*não se aplica ao estado (1) do carácter 37

45. Bainha citoplasmática (Ferreira *et al.*, 2011 – carácter 28):

(0) ausente

(1) presente

46. Arranjo do sistema de endomembranas:

(0) túbulos dispostos regularmente, com aspecto de "peneira"

(1) vesículas grandes

(2) vesículas pequenas

(3) túbulo-vesicular

(4) padrão alveolar (Baicere-Silva, 2013- carácter 65, estado 0)

(5) vesículas grandes e pequenas

(6) corrente de rolo em camadas concêntricas (Baicere-Silva, 2013 - carácter 65, estado 3)

(7) rendilhado (Baicere-Silva, 2013- carácter 65, estado 1)

47. Sistema túbulo-vesicular conectado à membrana citoplasmática:

(0) ausente

(1) presente

48. Simetria da região proximal da peça intermediária com relação à distribuição das organelas em relação ao flagelo no corte transversal (Baicere-Silva, 2013 – caracter 26):

(0) simétrica

(1) assimétrica

(2) fortemente assimétrica

*não se aplica ao estado (1) do caracter 37

49. Simetria da região intermediária da peça com relação à distribuição das organelas em relação ao flagelo no corte transversal (Baicere-Silva, 2013 - caracter 27):

(0) simétrica

(1) assimétrica

(2) fortemente assimétrica

*não se aplica ao estado (1) do caracter 37

50. Simetria da região terminal da peça intermediária com relação à distribuição das organelas em relação ao flagelo no corte transversal (Baicere-Silva, 2013 – caracter 28):

(0) simétrica

(1) assimétrica

(2) fortemente assimétrica

*não se aplica ao estado (1) do caracter 37

51. Vesículas membranosas na região perinuclear:

(0) ausente

(1) presente

52. Vesículas membranosas na região anterior da peça intermediária (exceto bainha citoplasmática):

(0) ausente

(1) presente

*não se aplica ao estado (1) do caracter 37

53. Vesículas membranosas na região intermediária da peça intermediária (exceto bainha citoplasmática):

(0) ausente

(1) presente

*não se aplica ao estado (1) do carácter 37

54. Vesículas membranosas na região posterior da peça:

(0) ausente

(1) presente

*não se aplica ao estado (1) do carácter 37

55. Citoplasma na porção do flagelo contido no interior do canal citoplasmático:

(0) ausente

(1) presente

56. Vesículas ao longo da estrutura flagelar:

(0) ausente

(1) presente

57. Distribuição das vesículas ao longo da estrutura flagelar:

(0) porção inicial do flagelo

(1) 2/3 ou mais, ou seja, porção inicial e medial do flagelo

(2) porção final do flagelo

(3) por todo o flagelo

*não se aplica ao estado (0) do carácter 56

58. Aspecto da membrana flagelar ao corte transversal:

(0) circular

(1) aletas

(2) crenado

59. Forma da projeção alada (aletas) da membrana flagelar:

(0) unilateral

(1) bilateral

*não se aplica ao estado (0) e (2) do carácter 58

60. Corpos elétron-densos associados externamente a cada dupla de microtúbulos periféricos no axonema:

(0) ausente

(1) presente

3. Análise Filogenética

3.1 Análise molecular

A matriz de dados moleculares possui 151 táxons, sendo 24 provenientes deste estudo e 127 originários da matriz de dados de Calcagnotto e colaboradores (2005) (Anexo III). As sequências parciais correspondentes aos cinco genes foram utilizadas de forma concatenada e um total de 3497 caracteres foi empregado na análise de Parcimônia, sendo 1686 constantes, 249 variáveis e não informativos e 1562 caracteres informativos para a análise de parcimônia. A análise filogenética resultou em 144 árvores igualmente parcimoniosas com comprimento de 15489 passos. A árvore de consenso estrito é apresentada na Fig. 50 (com os respectivos valores de suporte).

A topologia obteve a subordem Citharinoidei como monofilética (composta pelas famílias Citharinidae e Distichodontidae) e basal para a ordem Characiformes (clado 2 – Fig. 50), com altos valores de suporte (BT 90%, e BR 9). Dentro de Citharinoidei, a família Distichodontidae é considerada monofilética, com valores de suporte de Bootstrap 63 e Bremer 9 (Fig. 51). *Xenocharax spilurus* é obtido como mais basal dentro de Distichodontidae. O clado 3 (Fig. 50) é constituído pela subordem Characoidei, no qual a família Crenuchidae é obtida como irmã do clado que reúne as demais famílias de Characiformes. A família Crenuchidae é monofilética (Fig. 52 – clado 196) e constituída pelas subfamílias Characidiinae e Crenuchinae, ambas também monofiléticas e com alto valor de suporte para a Crenuchinae (BT 85 e BR 9), porém com suporte relativamente baixo para Characidiinae (BT 57 e BR 9). Dentro de Characoidei, quatro grandes clados são

obtidos: (1) O clado 5, formado pelas famílias (Chalceidae (Triportheidae+Acestrorhynchidae)) + (Iguanodectidae (Bryconidae + Characidae)) (Fig. 53); (2) O clado 12, que abriga três das quatro famílias que fariam parte de Erythrinoidea (segundo Buckup, 1998), sendo (Erythrinidae (Ctenoluciidae + Lebiasinidae)) (Fig. 54). Neste clado, as três famílias são obtidas como monofiléticas. Em Erythrinidae, *Hoplias* é obtido como grupo-irmão de (*Hoplerythrinus* + *Erythrinus*), em Lebiasinidae *Pyrhulina* é grupo-irmão de (*Copella* + *Nannostomus*); (3) O clado 14 (Fig. 55) é composto pelas famílias (Serrasalminidae (Cynodontidae (Parodontidae + Hemiodontidae) + (Anostomidae (Prochilodontidae + Chilodontidae))))), todas monofiléticas; (4) O clado 20 (Fig. 56) recupera a família Alestidae como parafilética, incluindo Hepsetidae como grupo-irmão de *Arnoldichthys spilopterus*. O clado 176 é composto por Alestidae (parafilética) e possui um alto valor de suporte de Bremer (9) e Bootstrap (99) excluindo-se *Arnoldichthys*.

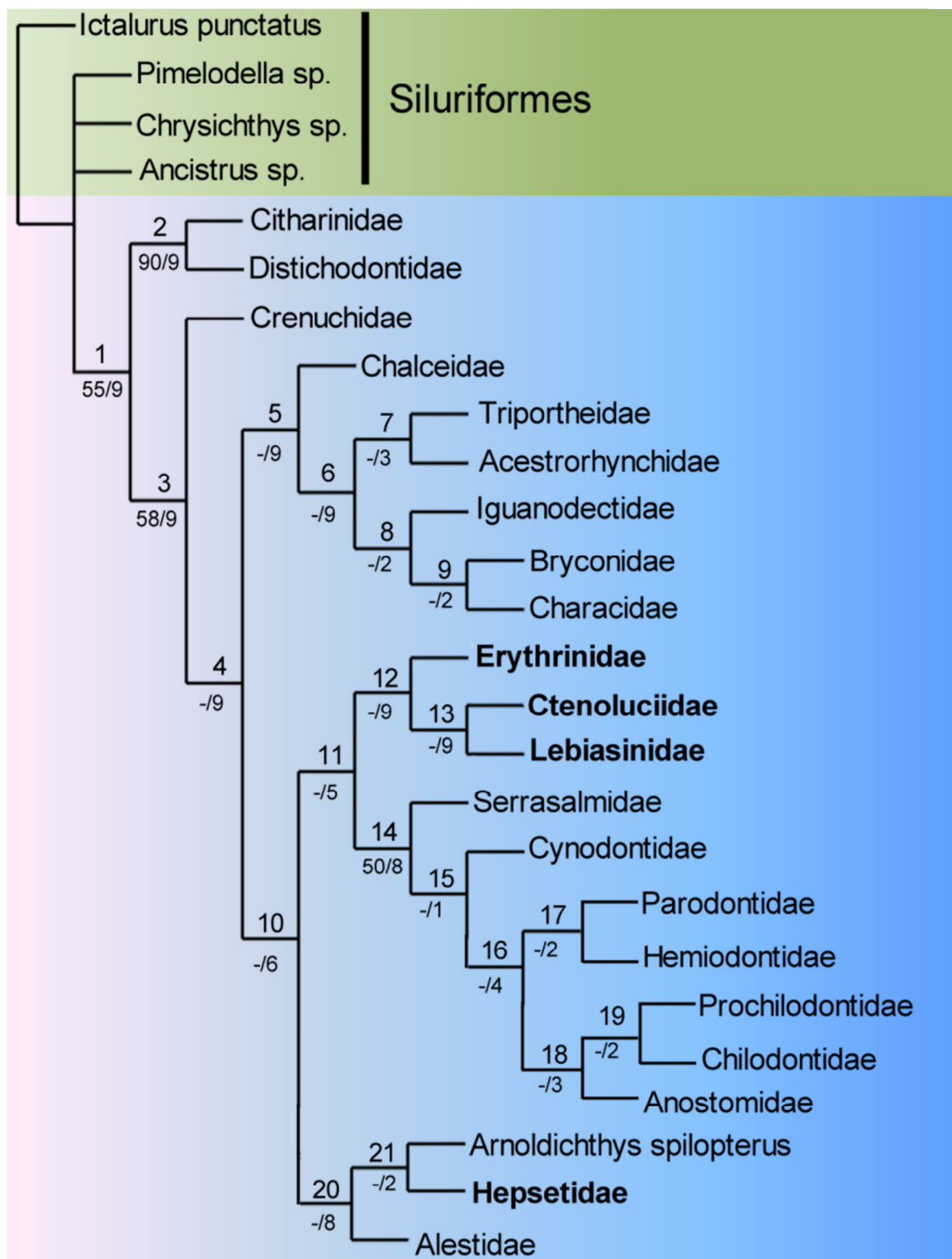


Figura 50. Árvore de consenso estrito obtida pelo método de Máxima Parcimônia utilizando exclusivamente os dados moleculares. Os números acima dos nós identificam os clados, os números abaixo representam os valores de suporte de Bootstrap ($\geq 50\%$) e Bremer, respectivamente. Os traços (-) denotam valores de Bootstrap $< 50\%$.

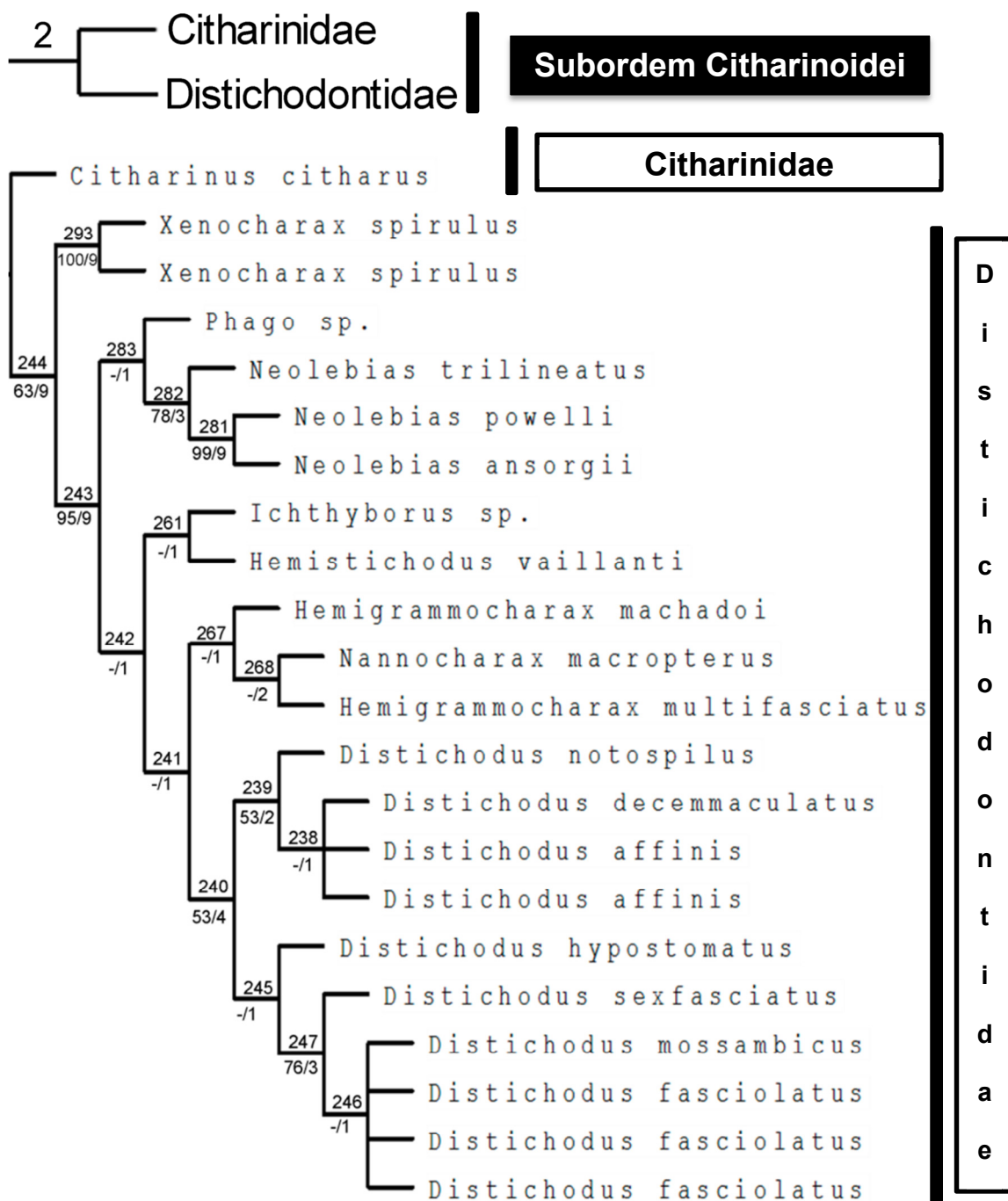


Figura 51. Árvore parcial de consenso estrito obtida com dados moleculares. Clado número 2 expandido exibindo as relações menos inclusivas de Citharinidae e Distichodontidae. Os números acima dos nós identificam os clados, os números abaixo representam os valores de suporte de Bootstrap ($\geq 50\%$) e Bremer, respectivamente. Os traços (-) denotam valores de Bootstrap $< 50\%$.

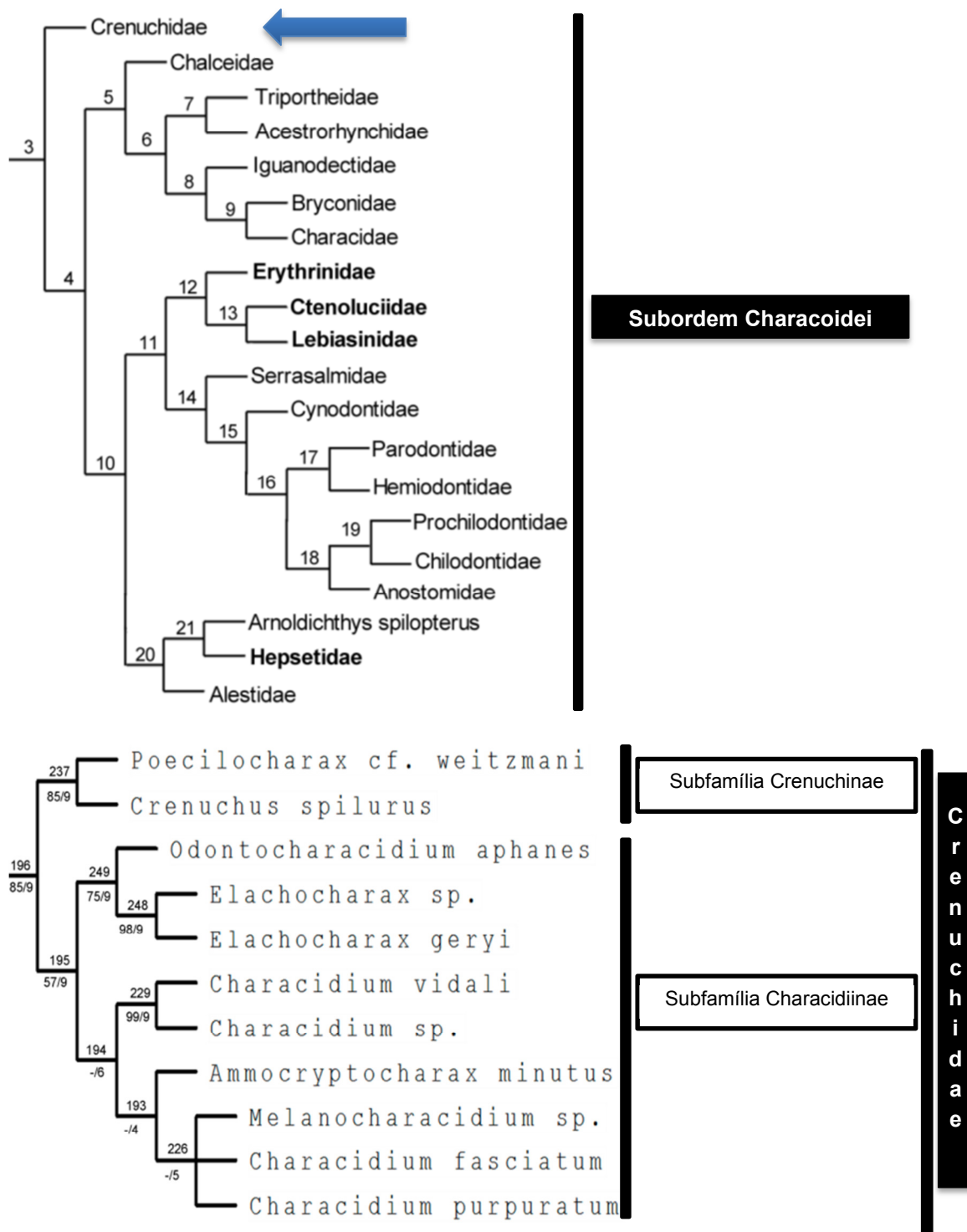


Figura 52. Árvore parcial de consenso estrito obtida com dados moleculares. Clado número 3 expandido exibindo as relações de Crenuchidae. Os números acima dos nós identificam os clados, os números abaixo representam os valores de suporte de Bootstrap ($\geq 50\%$) e Bremer, respectivamente. Os traços (-) denotam valores de Bootstrap $< 50\%$.

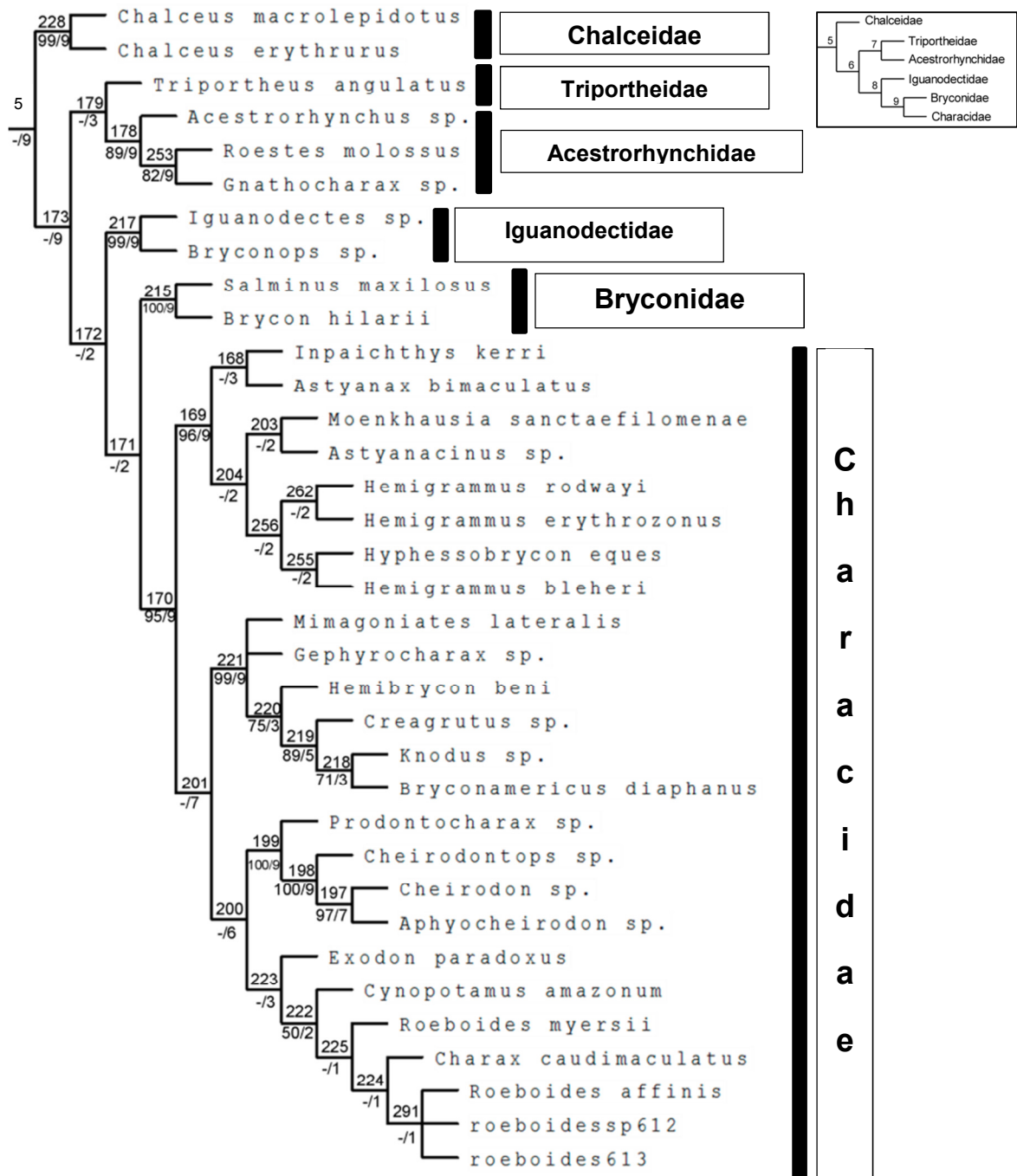


Figura 53. Árvore parcial de consenso estrito obtida com dados moleculares. Clado número 5 expandido exibindo as relações de Chalceidae, Triportheidae, Acestrorhynchidae, Iguanodectidae, Bryconidae e Characidae. Os números acima dos nós identificam os clados, os números abaixo representam os valores de suporte de Bootstrap ($\geq 50\%$) e Bremer, respectivamente. Os traços (-) denotam valores de Bootstrap $< 50\%$.

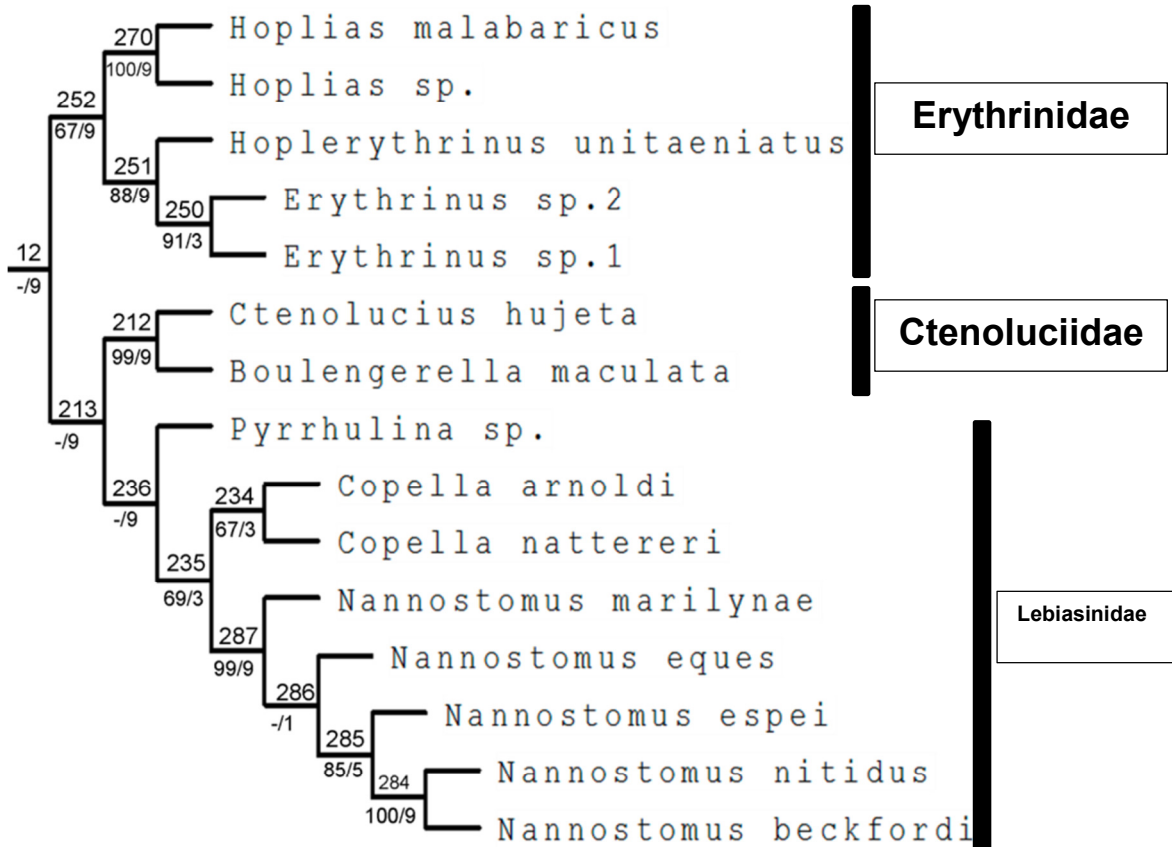
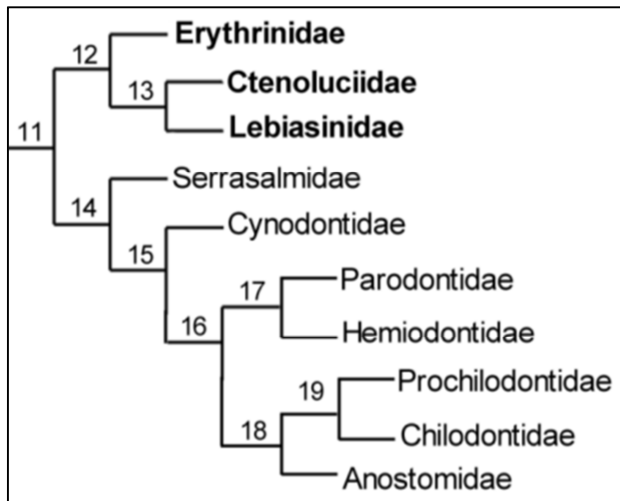


Figura 54. Árvore parcial de consenso estrito obtida com dados moleculares. Clado número 12 expandido exibindo as relações de Erythrinidae, Ctenoluciidae e Lebiasinidae. Os números acima dos nós representam os clados, os números abaixo identificam os valores de suporte de Bootstrap ($\geq 50\%$) e Bremer, respectivamente. Os traços (-) denotam valores de Bootstrap $< 50\%$.

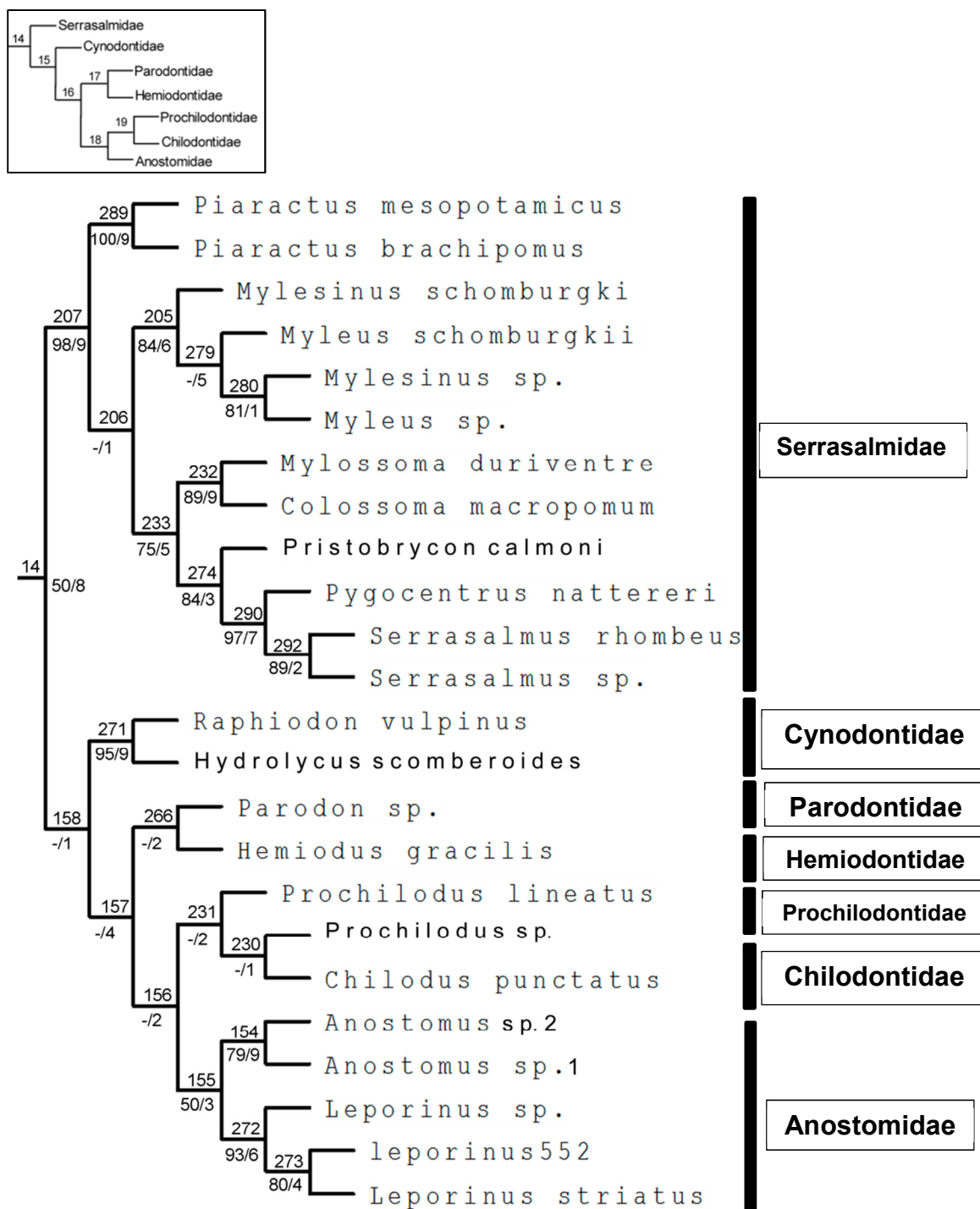


Figura 55. Árvore parcial de consenso estrito obtida com dados moleculares. Clado número 14 expandido exibindo as relações de Serrasalmidae, Cynodontidae, Parodontidae, Hemiodontidae, Prochilodontidae, Chilodontidae e Anostomidae. Os números acima dos nós identificam os clados, os números abaixo representam os valores de suporte de Bootstrap ($\geq 50\%$) e Bremer, respectivamente. Os traços (-) denotam valores de Bootstrap $< 50\%$.

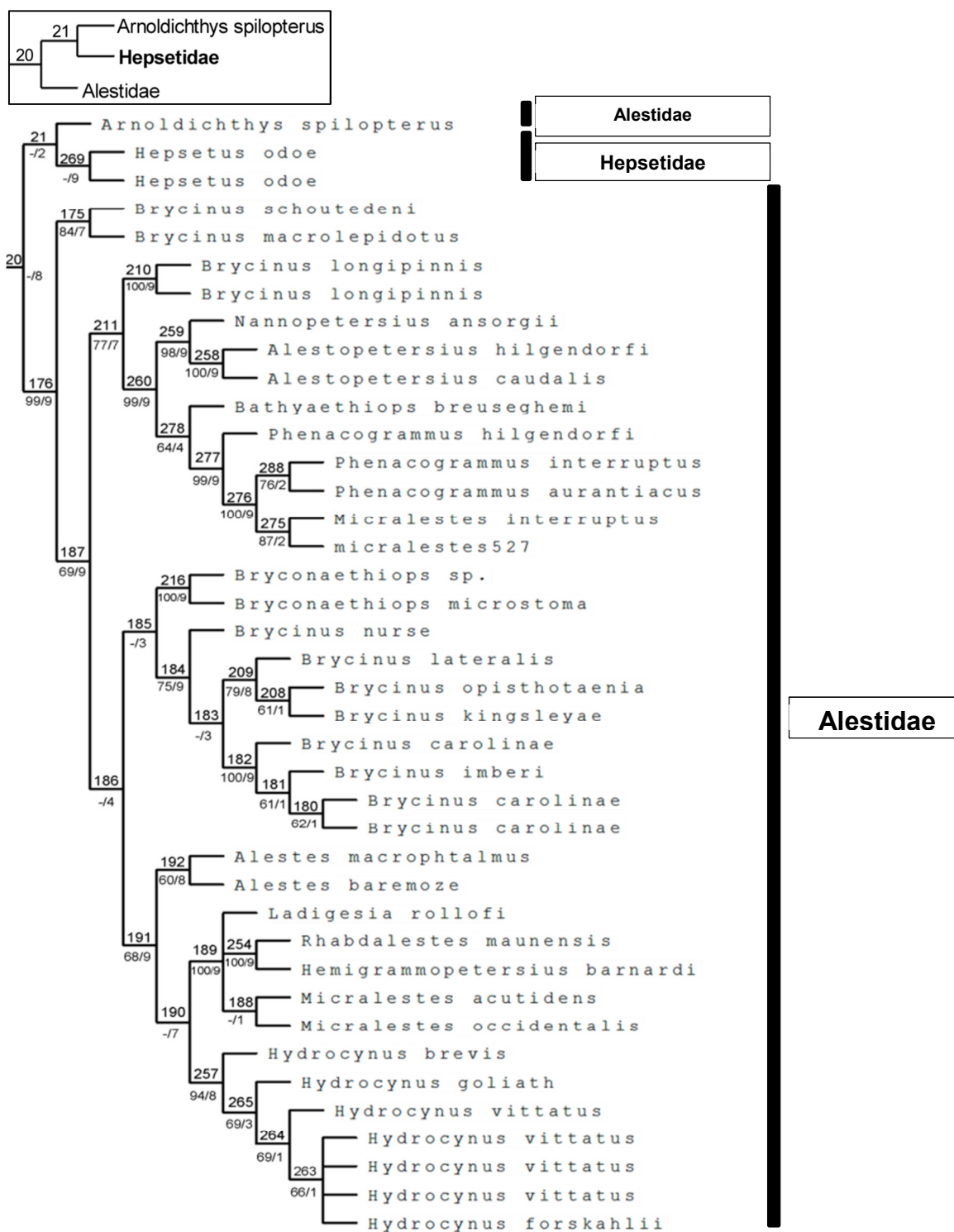


Figura 56. Árvore parcial de consenso estrito obtida com dados moleculares. Clado número 20 expandido exibindo as relações de Alestidae e Hepsetidae. Os números acima dos nós identificam os clados, os números abaixo representam os valores de suporte de Bootstrap ($\geq 50\%$) e Bremer, respectivamente. Os traços (-) denotam valores de Bootstrap $< 50\%$.

3.2 Análise morfológica e caracteres morfológicos

A morfologia fina do processo de espermiogênese e da forma final dos espermatozoides foi descrita para as quatro famílias de Erythrinioidea (Erythrinidae, Ctenoluciidae, Lebiasinidae e Hepsetidae), e para outras quatro famílias que compõem a ordem Characiformes (Alestidae, Chalceidae, Crenuchidae, Distichodontidae). Adicionalmente, foram utilizados dados de doze famílias da literatura para ampliar o universo de Characiformes nas análises filogenéticas (Acestrotrichidae, Anostomidae, Bryconidae, Characidae, Citharinidae, Curimatidae, Cynodontidae, Iguanodectidae, Parodontidae, Prochilodontidae, Serrasalminidae, Triportheidae – Tabela 1). Foi analisado o total de 78 táxons para o grupo interno e 01 táxon para o grupo externo (*Pimelodella* sp. – Siluriformes). Os dados morfológicos foram utilizados de duas formas distintas para as análises filogenéticas: na primeira, unicamente os caracteres morfológicos foram utilizados na construção de uma matriz de dados e foi obtida uma primeira hipótese filogenética; na segunda, os caracteres morfológicos foram concatenados em uma matriz de evidência total juntamente com os caracteres moleculares, para testar a influência dos dados morfológicos na topologia final. A matriz de dados morfológicos (Apêndice I) foi construída a partir de 61 caracteres, sendo 03 do modo de reprodução e estrutura testicular, 11 da espermiogênese e espermátides, e 47 da forma final do espermatozoide. A análise filogenética resultou em duas árvores igualmente parcimoniosas com 275 passos. A árvore de consenso estrito é apresentada na Fig. 57. Adicionalmente, os diferentes “tipos” de espermiogênese foram plotados na árvore de evidência total para avaliarmos a distribuição dos padrões em Characiformes, e observamos que os “tipos”, tal como descritos inicialmente não representam sinapomorfias (Fig. 59). A avaliação da distribuição dos caracteres e seus respectivos estados na matriz de dados morfológicos indica que alguns caracteres são mais conservados e outros mais variáveis, podendo ser selecionados de acordo com o nível de relações de interesse (Tabela 5).

Tabela 5. Lista de caracteres com relação à variabilidade e respectivas indicações de uso no estudo das relações filogenéticas de Characiformes.

Caracter	Variação		Indicação de uso no estudo das relações de parentesco	
	Pouco variável	Muito Variável	Intrafamiliar	Suprafamiliar
Espermiogênese				
Posição inicial do flagelo em relação ao núcleo	X			X
Espermatozoide				
Localização das mitocôndrias na região anterior da peça intermediária ao corte transversal	X			X
Aspecto da membrana flagelar ao corte transversal	X			X
Forma e Distribuição das estruturas túbulo-vesiculares		X	X	
Simetria da peça intermediária		X	X	

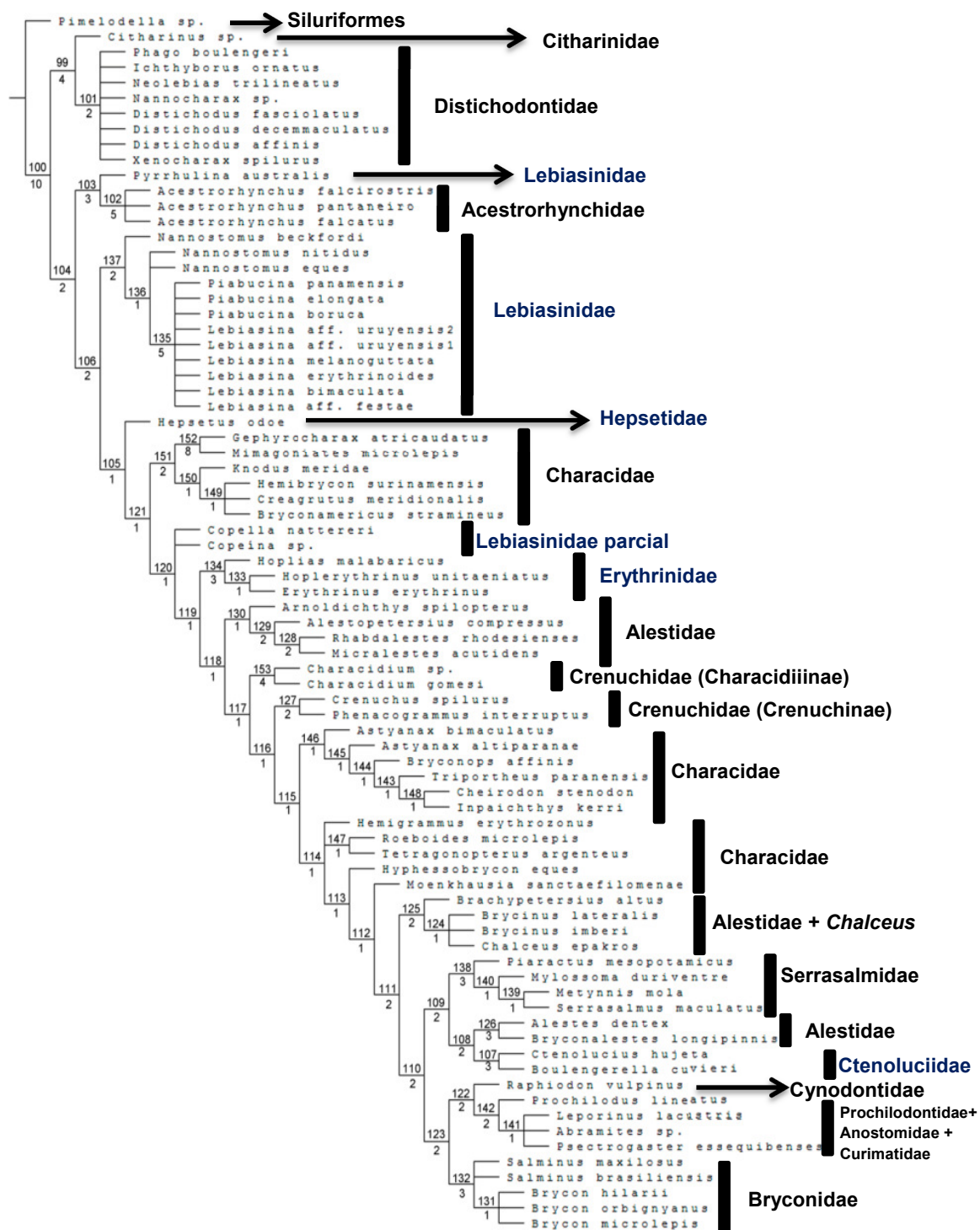


Figura 57. Árvore de consenso estrito obtida pelo método de Máxima Parcimônia utilizando exclusivamente os dados morfológicos. Os números acima dos nós representam os clados, os números abaixo representam os valores de suporte de Bremer.

Lista de Sinapomorfias comuns a todas as árvores:

Nó 99:

Char. 15: $1 > 0$

Char. 18: $3 > 0$

Char. 40: $0 > 5$

Char. 46: $4 > 0$

Char. 52: $1 > 0$

Nó 101:

Char. 13: $0 > 1$

Char. 42: $0 > 1$

Nó 102:

Char. 6: $1 > 0$

Char. 26: $4 > 3$

Char. 32: $0 > 1$

Char. 46: $4 > 5$

Char. 60: $0 > 1$

Nó 103:

Char. 20: $0 > 1$

Char. 37: $0 > 1$

Char. 41: $1 > 0$

Nó 104 :

Char. 4: $1 > 0$

Char. 43: $1 > 0$

Nó 105:

Char. 46: $4 > 3$

Nó 106:

Char. 12: $0 > 1$

Char. 48: $1 > 2$

Char. 49: $1 > 2$

Nó 107:

Char. 18: $0 > 1$

Char. 42: $1 > 2$

Char. 43: $1 > 2$

Char. 45: $1 > 0$

Char. 48: $1 > 0$

Char. 56: $0 > 1$

Char. 58: $1 > 0$

Nó 108:

Char. 49: $1 > 0$

Char. 50: $1 > 0$

Nó 109:

Char. 28: $1 > 0$

Char. 57: $3 > 2$

Nó 110:

Char. 43: $0 > 1$

Char. 44: $0 > 1$

Char. 50: $2 > 1$

Nó 111:

Char. 4: $1 > 0$

Char. 18: $3 > 0$

Char. 21: 1 > 0

Char. 36: 0 > 1

Nó 112:

Char. 40: 1 > 0

3.3 Análise de evidência total

A análise de evidência total foi realizada a partir de 3558 caracteres, sendo 3497 moleculares e 61 morfológicos. Um total de 151 táxons foi analisado. Os dados morfológicos não estão disponíveis para todos os 151 táxons utilizados na análise com dados moleculares apenas, sendo 65 táxons que efetivamente constam caracteres morfológicos descritos. Os demais táxons, 86, foram codificados como dados faltantes (-). A análise de evidência total resultou em 1480 árvores igualmente parcimoniosas com 15815 passos. A árvore de consenso estrito é apresentada na Fig. 58.

A topologia obtida é praticamente a mesma encontrada na análise apenas com dados moleculares. As famílias Citharinidae e Distichodontidae são obtidas como basais em Characiformes (clado 2 – Fig. 58). A família Erythrinidae é grupo-irmão de (Ctenoluciidae + Lebiasinidae) (clado 5), e todas as três famílias são monofiléticas. O clado 6 apresenta uma politomia entre as famílias Cynodontidae, Serrasalminidae (Prochilodontidae parafilético, Parodontidae, Hemiodontidae, Chilodontidae, Anostomidae). O clado 8 é formado por (Chalceidae (Bryconidae (Iguanodectidae + Acestrorhynchidae) + (Triportheidae + Characidae))). O clado 13 recupera Alestidae parafilético incluindo Hepsetidae como grupo-irmão de *Arnoldichthys*.

**Lista das principais sinapomorfias morfológicas comuns a todas as árvores na análise
de evidência total**

Nó 2: Subordem Characoidei (Citharinidae + Distichodontidae)

Char. 3512: 1 --> 0

Char. 3515: 3 --> 0

Char. 3537: 0 --> 5

Char. 3549: 1 --> 0

Nó 5: Família Ctenoluciidae

Char. 3515: 3 --> 1

Char. 3519: 0 --> 1

Char. 3533: 0 --> 1

Char. 3545: 1 --> 0

Char. 3546: 1 --> 0

Char. 3547: 2 --> 0

Nó 5: Lebiasinidae

Char. 3506: 0 --> 1

Char. 3513: 0 --> 3

Char. 3548: 0 --> 1

Nó 5: Família Erythrinidae

Char. 3507: 0 --> 1

Char. 3513: 0 --> 2

Char. 3532: 0 --> 1

Char. 3535: 0 --> 1

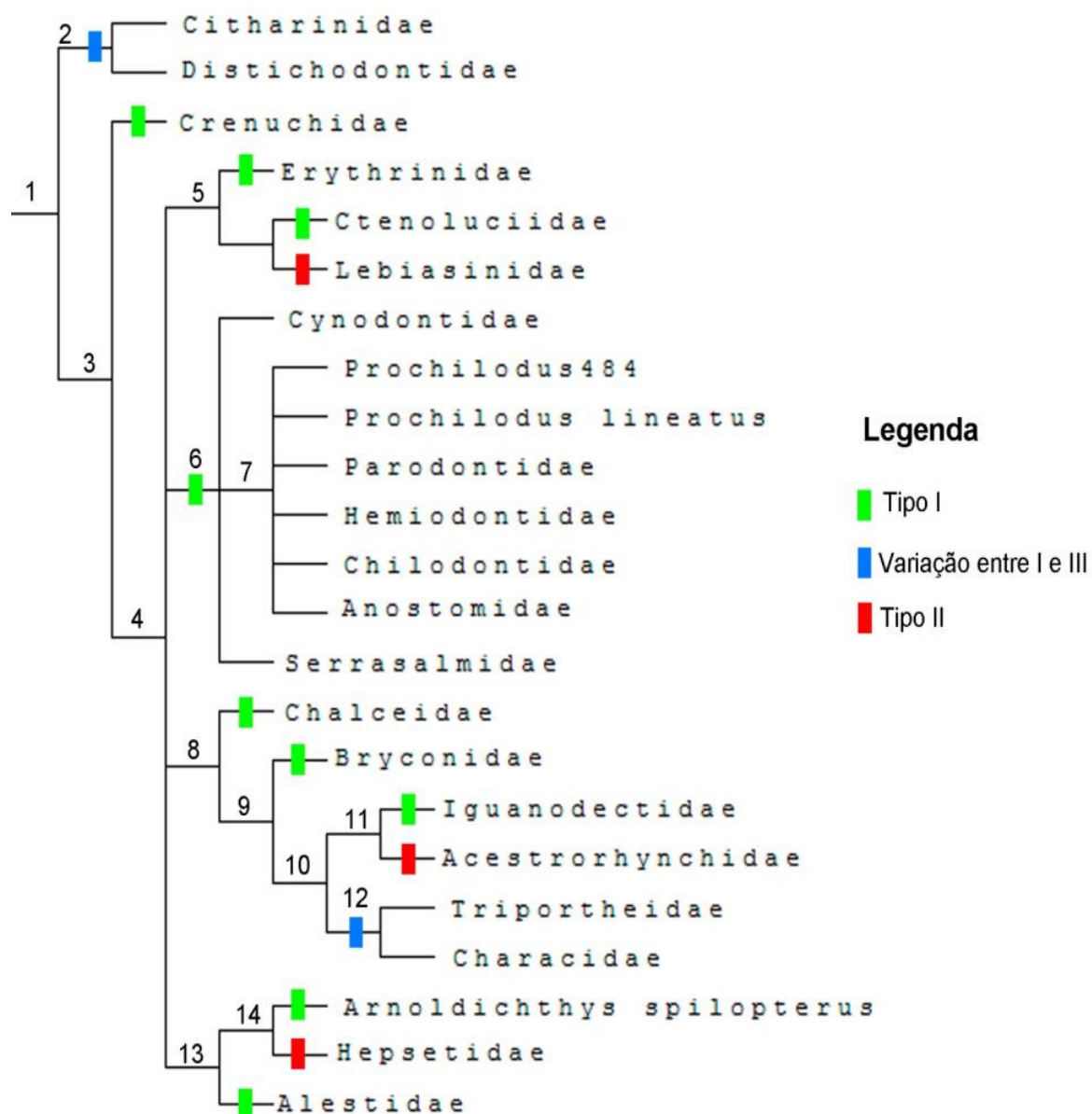


Figura 59. Distribuição do processo de espermiogênese como classificado em “tipos”. A árvore utilizada é a de consenso estrito proveniente da análise de evidência total.

DISCUSSÃO

1. Dados morfológicos

1.1 Espermiogênese

Foram observados dois padrões distintos de espermiogênese entre os táxons analisados. Os padrões descritos tem por base, principalmente, a posição inicial do flagelo em relação ao núcleo nas espermátides iniciais. O primeiro padrão refere-se ao flagelo inicialmente excêntrico a medial em relação ao núcleo e, no segundo padrão, o flagelo está lateral ao núcleo. A compreensão dos primeiros eventos envolvidos na formação do espermatozoide tem sido amplamente discutida como crucial no entendimento de homologias entre espermatozoides com formas finais idênticas, mas que podem ter originado de diferentes eventos durante a espermiogênese (Baicere-Silva *et al.*, 2011a). A importância da compreensão da espermiogênese reflete-se, sobretudo, nas hipóteses de homologia, evitando interpretações equivocadas sobre a evolução dos espermatozoides em diferentes espécies de peixes (Baicere-Silva *et al.*, 2011a; Santana *et al.*, 2013a). A correta interpretação deste tipo de dado morfológico permite uma análise acurada mesmo quando se trata de uma análise comparativa entre táxons diferentes. Após a criteriosa análise dos eventos envolvidos na espermiogênese como, além da posição inicial do flagelo em relação ao núcleo, a movimentação do núcleo sobre o complexo centriolar ou em direção ao flagelo, alongamento do núcleo e rotação nuclear, torna-se necessária a construção de uma matriz de dados. A descrição dos caracteres oriundos da espermiogênese deve refletir as diferenças e as semelhanças observadas entre os táxons e os padrões observados, de maneira a não comparar formas semelhantes oriundas de processos diferentes, mas apenas aqueles idênticos para o primeiro momento da espermiogênese.

Inicialmente, Mattei (1970) propôs a existência de dois padrões distintos de espermiogênese para os peixes, nomeados como tipo I e II, e posteriormente Quagio-Grassiotto e Oliveira (2008) descreveram um terceiro padrão, o tipo III. A aplicabilidade da descrição da espermiogênese classificada em tipos (I, II, III) em peixes teleósteos tem sido apresentada por vários autores (Burns *et al.*, 2009 para revisão). Na ordem Characiformes, o processo de espermiogênese apresenta variações dentro de diferentes grupos como, por exemplo, a família Characidae (Baicere-Silva, 2013). Essas variações podem ser assinaladas como sendo específicas, pelo menos, ao grupo de caracídeos inseminadores

dentro de Characidae. A grande variabilidade durante a espermiogênese dos Characiformes levou Baicere-Silva (2013) a descrever os eventos separadamente, e não acoplados aos “tipos” anteriormente descritos. Tal decisão também foi adotada na descrição dos táxons abordados neste estudo, levando em consideração a variabilidade dos processos observados. Além disso, foi levado em consideração o fato de que nenhuma hipótese testou se os “tipos” de fato representam sinapomorfias ou apenas convergências/paralelismos dentre os peixes Characiformes. Neste estudo, foi possível constatar, na análise filogenética molecular e morfológica, separadamente, e de evidência total (Fig. 59) que os “tipos” de espermiogênese não são filogeneticamente informativos ao nível das relações suprafamiliares, e surgiram mais de uma vez dentro da história evolutiva dos Characiformes. O resultado ora apresentado para a distribuição dos tipos de espermiogênese não implica que estes não possam ser considerados nas descrições da espermiogênese e da forma dos espermatozoides. O padrão de espermiogênese tem se mostrado amplamente conservado dentro das famílias e subfamílias de Characiformes (por exemplo, Stevardiinae – Baicere-Silva *et al.*, 2011; Lebiasininae – Santana *et al.*, 2013b; Ctenoluciidae e Erythrinidae - este estudo), o que tornam válidas todas as descrições dos dados espermáticos como tipos. Outra consideração importante é o conhecimento prévio sobre o monofiletismo do grupo em estudo, pois grupos reconhecidamente não monofiléticos apresentam padrões (ou mesmo tipos) distintos de espermiogênese e espermatozoides. Como um primeiro exemplo, cita-se o caso do gênero *Moenkhausia* (Santana *et al.*, 2013a) o qual apresenta espécies com, pelo menos, dois tipos de espermiogênese (o tipo I, e uma variação do tipo III). Esta variação no processo de espermiogênese não é observada dentro dos gêneros reconhecidamente monofiléticos (revisão em Burns *et al.*, 2009). Um segundo exemplo é a família Characidae, a qual apresenta uma variação dos tipos de espermiogênese (entre I e III) nas subfamílias que a compõe (Baicere- Silva, 2013). Dada a complexidade taxonômica da família Characidae, não é possível inferir se as variações no processo de espermiogênese são decorrentes do seu não monofiletismo ou da sua história evolutiva.

No caso das análises filogenéticas mais abrangentes envolvendo várias famílias, como a apresentada neste estudo, a descrição dos caracteres deve ser considerada independentemente das descrições clássicas dos tipos, levando em conta os processos

observados em sua unidade. Sendo assim, para que seja validada a descrição dos caracteres espermáticos deve-se levar em consideração (i) o monofiletismo do grupo, (ii) a abrangência do grupo em estudo e (iii) a história evolutiva dos Characiformes.

Dentro das famílias que compõem a superfamília Erythrinae, a espermiogênese apresenta o flagelo com posição inicial lateral em relação ao núcleo, mas diverge com relação à presença de rotação nuclear, observada em Ctenoluciidae e Erythrinidae, mas ausente em Lebiasinidae e Hepsetidae. Em Ctenoluciidae, a rotação nuclear é completa, na qual o núcleo posiciona-se perpendicular ao flagelo, e em Erythrinidae a rotação nuclear é incompleta, portanto, apenas parte do núcleo está sobre o eixo flagelar. Em Lebiasinidae, ocorre o alongamento do núcleo em direção ao eixo flagelar apenas nas espécies da subfamília Lebiasininae, sendo considerada uma condição apomórfica e, portanto, uma sinapomorfia para o grupo (Santana *et al.*, 2013b). A topologia encontrada no consenso estrito da árvore morfológica, apesar de bem resolvida, apresenta algumas incongruências com hipóteses prévias de monofiletismo de alguns grupos e mesmo em comparação com o resultado encontrado através da análise molecular e de evidência total. Por outro lado, a posição basal de (Citharinidae+Distichodontidae) em Characiformes é obtida, as famílias Erythrinidae e Serrasalminidae são monofiléticas, e *Salminus* como grupo-irmão de *Brycon*. Uma das relações encontradas na análise morfológica é a posição de *Pyrrhulina* como grupo-irmão de *Acestrorhynchus*. Em *Acestrorhynchus*, o flagelo é inicialmente lateral ao núcleo e nenhuma movimentação ocorre, seja por deslocamento ou rotação. O mesmo processo ocorre em *Pyrrhulina* (Lebiasinidae – Pyrrhulininae). Na análise apenas com dados morfológicos, essas duas características da espermiogênese poderiam ser consideradas como sinapomorfias para o clado que agrupa os dois táxons. No entanto, a análise molecular e de evidência total não recuperam esse grupo como monofilético, e sugerem, portanto, que os processos de espermiogênese surgiram independentemente, ou seja, sem uma origem comum para ambos os táxons.

1.2 Espermatozoides

Uma vez apresentadas e discutidas as premissas utilizadas para a determinação de homologies envolvendo a formação dos espermatozoides, a seguir são discutidas suas

formas finais nas famílias que compõem Erythrinioidea e nas demais estreitamente relacionadas.

A família Erythrinidae é obtida como monofilética em todas as análises realizadas, com valor de suporte de Bremer 9 e Bootstrap 67 para molecular e Bremer 10 na evidência total, e Bremer 3 para a análise morfológica. Os espermatozoides de Erythrinidae apresentam o canal citoplasmático nas espermátides iniciais, porém o canal está ausente nos espermatozoides. Esta é considerada uma sinapomorfia para as espécies da família. O fechamento do canal citoplasmático ocorre também em *Triportheus paranensis* (Characidae), sendo considerada uma característica com origem independente em ambos os táxons. Apesar dos espermatozoides de *Hepsetus odoe*, *Acestrorhynchus* e *Pyrrhulina australis* possuírem o núcleo lateral, eles parecem ter surgido de forma independente para esses táxons, visto que não formam um grupo monofilético em nenhuma das três análises realizadas. A família Ctenoluciidae apresenta uma forma de espermatozoide que não possui sinapomorfias comuns com os representantes das outras três famílias de Erythrinioidea. Os representantes de Lebiasinidae apresentam uma forma de espermatozoide caracterizada por um núcleo lateralizado.

1.3 Características das células espermáticas utilizadas como caracteres morfológicos em análises filogenéticas

Na tentativa de propor uma lista com caracteres mais ou menos variáveis dentro do universo dos Characiformes analisados, parece que, pelo menos, dois caracteres são bastante conservados ao nível suprafamiliar: 1. Localização das mitocôndrias na região anterior da peça intermediária ao corte transversal (carácter 42) e 2. Aspecto da membrana flagelar ao corte transversal (carácter 58). O carácter 42 é apontado como uma sinapomorfia para a família Distichodontidae (0>1) e para Ctenoluciidae (1>2). O carácter 58 é uma sinapomorfia para Ctenoluciidae (1>0) e Bryconidae (1>0). Por outro lado, alguns caracteres parecem ser mais variáveis e são muito informativos ao nível intrafamiliar e interespecífico, como exemplo a simetria da peça intermediária (caracteres 48, 49, 50). Especificamente o carácter 49 (Simetria da região intermediária da peça com relação a distribuição das organelas em relação ao flagelo no corte transversal) é uma sinapomorfia importante que separa alguns grupos dentro de Characidae (clado 144 – carácter 49:1>0,

clado 148 – caracter 49:0>2). Para os caracteres provenientes da espermiogênese, a Posição inicial do flagelo em relação ao núcleo (caracter 4), por exemplo, é altamente conservada e aparece como sinapomorfia para os clados mais inclusivos, como o clado 104 (1>0).

2. Relações filogenéticas de Erythrinioidea

A superfamília Erythrinioidea não é obtida como monofilética em nenhuma das três diferentes abordagens utilizadas no presente estudo. As famílias que a compõem estão distribuídas em dois clados distintos na análise molecular (Fig. 50): clado 12, (Erythrinidae (Ctenoluciidae + Lebiasinidae)) e clado 19, (Alestidae (*Arnoldichthys spilopterus* + Hepsetidae)). Desde a proposição inicial das oito superfamílias para a ordem Characiformes (Buckup, 1998), poucos trabalhos foram dedicados à elucidação da monofiletismo de cada uma delas e das relações suprafamiliares dentro da ordem. Vari (1995), antes mesmo da proposição das superfamílias por Buckup, já havia proposto uma relação próxima entre as famílias Erythrinidae, Ctenoluciidae, Lebiasinidae e Hepsetidae. No entanto, as relações internas encontradas por Vari (1995) são diferentes daquelas propostas por Buckup (1998), pois Ctenoluciidae aparece como grupo irmão de Erythrinidae, enquanto que na hipótese de Buckup a família Ctenoluciidae é proposta como grupo irmão da família africana Hepsetidae. Além disso, a posição da família Lebiasinidae não foi resolvida na hipótese de Buckup (1998), enquanto que na hipótese de Vari (1995) é mais próxima de (Hepsetidae (Erythrinidae + Ctenoluciidae)). Estudos posteriores, com base em caracteres moleculares que incluíram representantes de Erythrinioidea, não corroboram a ideia de monofiletismo da superfamília (Calcagnotto *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2011). Nos resultados ora apresentados, as famílias Erythrinidae, Ctenoluciidae e Lebiasinidae são obtidas como monofiléticas e Hepsetidae não seria monofilética incluindo como grupo-irmão *Arnoldichthys spilopterus*. A relação de parentesco posicionando Hepsetidae e Alestidae como grupo-irmão foi proposta por Oliveira e colaboradores (2011), com base em caracteres moleculares, porém Alestidae e Hepsetidae são obtidas como unidades monofiléticas distintas e *Arnoldichthys* não foi incluído nas análises destes autores. Nas propostas de Calcagnotto e colaboradores (2005) e Zanata e Vari (2005), utilizando-se dados moleculares e morfológicos respectivamente, o gênero *Arnoldichthys* posiciona-se como o táxon mais basal em Alestidae, porém com baixo valor de suporte no trabalho de

Calcagnotto e colaboradores (2005). Hepsetidae posiciona-se como grupo-irmão de (Ctenoluciidae + Lebiasinidae) no clado 95 no estudo de Calcagnotto e colaboradores (2005).

Os dados moleculares e morfológicos concordam em vários pontos em ambas as topologias obtidas separadamente neste estudo. A posição basal das famílias Citharinidae e Distichodontidae em Characiformes, como grupo-irmão de Characoidei, é uma das relações congruentes entre os dados moleculares (suporte de Bootstrap, BT, 55 e de Bremer, BR, 9) e dados morfológicos (BR 10). A análise de evidência total recupera a mesma relação de grupo-irmão entre Citharinidae e Distichodontidae e apresenta, além dos caracteres moleculares, 4 sinapomorfias morfológicas. Entre elas, está a forma cônica do núcleo e a presença de uma única mitocôndria ramificada na peça intermediária. Essa relação foi inicialmente proposta por Vari (1979) e corroborada posteriormente por Buckup (1991, 1993, 1998), Ortí e Meyer (1997), Calcagnotto e colaboradores (2005), Oliveira e colaboradores (2011). Apenas na hipótese de Oliveira e colaboradores (2011) as duas famílias não comporiam dois agrupamentos monofiléticos, mas um único agrupamento (Citharinidae-Distichodontidae).

Um dos objetivos do presente estudo foi testar o posicionamento filogenético da família Crenuchidae a partir da proposta de Calcagnotto e colaboradores (2005) na qual a família foi obtida como grupo-irmão de (Erythrinidae + (Alestidae (Hepsetidae (Ctenoluciidae+Lebiasinidae))))), em um clado basal aos demais Characiformes. A família Crenuchidae é obtida como monofilética nas análises com dados moleculares e de evidência total. O posicionamento da família dentro da ordem Characiformes, no entanto, não é o mesmo encontrado por Calcagnotto e colaboradores (2005), sendo a família mais basal para subordem Characoidei, ou seja, grupo-irmão das demais famílias de Characiformes. Na matriz de evidência total o suporte para a relação de Crenuchidae com os demais Characoidei foi relativamente maior (BT 66/ BR 10) do que apenas com dados moleculares (BT 58/ BR 9). Observou-se que a forma dos espermatozoides das duas subfamílias que compõem Crenuchidae não apresentam sinapomorfias, e, portanto, parece não haver evidência adicional a partir deste tipo de dado para corroborar o monofiletismo da família.

A hipótese de evidência total apresenta-se parcialmente resolvida ao nível mais inclusivo, ao contrário da hipótese apenas com dados moleculares. Tal divergência pode ser atribuída em parte pela grande ausência de dados morfológicos para a maioria dos táxons incluídos na análise de evidência total. Apesar disso, a maioria dos agrupamentos é recuperada em ambas as análises. Entre os agrupamentos recorrentes está (Erythrinidae (Ctenoluciidae+Lebiasinidae)), (Chalceidae (Bryconidae (Iguanodectidae+Acestrothynchidae)) + (Triportheidae+Characidae))); um clado mais inclusivo com (Serrasalminidae, Cynodontidae, Parodontidae, Hemiodontidae, Anostomidae, Prochilodontidae e Hemiodontidae); e (Alestidae (*Arnoldichthys spilopterus*+Hepsetidae)). Nesta análise de evidência total, o monofilismo das famílias Erythrinidae, Ctenoluciidae e Lebiasinidae é suportado por, além dos caracteres moleculares, sinapomorfias morfológicas. Para Erythrinidae são apresentadas 4 sinapomorfias, para Ctenoluciidae 6 sinapomorfias e para Lebiasinidae 3 sinapomorfias.

Os valores de suporte de Bootstrap e Bremer foram maiores na análise de evidência total para os clados (Chalceidae (Bryconidae (Iguanodectidae+Acestrothynchidae)) + (Triportheidae+Characidae))) e (Serrasalminidae, Cynodontidae, Parodontidae, Hemiodontidae, Anostomidae, Prochilodontidae e Hemiodontidae) do que apenas com dados moleculares. Os clados formados por (Erythrinidae (Ctenoluciidae+Lebiasinidae)) e (Alestidae (*Arnoldichthys spilopterus*+Hepsetidae)) não apresentaram valores significativos de Bootstrap nas duas análises e o suporte de Bremer apresenta um “passo” a mais na análise de evidência total para (Erythrinidae (Ctenoluciidae+Lebiasinidae)) e um “passo” a menos para (Alestidae (*Arnoldichthys spilopterus*+Hepsetidae)). A análise morfológica recupera uma relação muito semelhante em um clado mais inclusivo (110), abrangendo (Serrasalminidae (Alestidae parafilético+Ctenoluciidae)) + (Cynodontidae (Prochilodontidae (Anostomidae+Curimatidae))) + (Bryconidae))) um grupo de Characiformes de maior porte.

Na análise morfológica, a família Alestidae é parafilética e *Arnoldichthys spilopterus* é obtido como irmão de um grupo composto por (*Alestopetersius* (*Rhabdalestes* + *Micralestes*)). A espécie *A. spilopterus* tem sido um táxon enigmático com relação ao seu posicionamento filogenético em Characiformes. A proposta de relações filogenéticas apresentada por Zanata e Vari (2005) posiciona *A. spilopterus* como um componente de

Alestidae monofilético, em uma posição basal para a família juntamente com *Chalceus*. Os resultados obtidos por Calcagnotto *et al.* (2005) posicionam *Arnoldichthys* como grupo-irmão dos demais Alestidae, porém com um suporte relativamente baixo, e *Chalceus* faz parte do agrupamento Neotropical (grupo-irmão de Characidae). Recentemente, Arroyave e Stiassny (2011) realizaram um extenso estudo das relações filogenéticas da família Alestidae e recuperaram *Arnoldichthys* como grupo-irmão de Ctenoluciidae. A família africana Hepsetidae é obtida como irmã de *Arnoldichthys spilopterus* na análise molecular e de evidência total. Apesar da análise molecular e de evidência total apontarem para a relação mais próxima de *A. spilopterus* e *Hepsetus odoe*, não há sinapomorfias com base nos caracteres morfológicos que suportam tal relação. Arroyave e Stiassny (2011) propuseram uma relação mais próxima de *Arnoldichthys spilopterus* com *Ctenolucius hujeta* (Ctenoluciidae), e a família Hepsetidae seria o grupo mais basal dentro da subordem Characoidei. Em linhas gerais, o posicionamento de Hepsetidae neste último trabalho (Arroyave e Stiassny, 2011) pode ser analisado de forma moderada, pois há pouca representatividade das famílias que compõem a ordem Characiformes.

CONCLUSÕES

- 1) A superfamília Erythrinioidea (*sensu* Buckup, 1998) não é obtida como monofilética em nenhuma análise filogenética (molecular, morfológica e evidência total), sendo restringida às famílias Ctenoluciidae, Erythrinidae e Lebiasinidae;
- 2) A família Crenuchidae é obtida como basal à subordem Characoidei, e não está relacionada proximamente com Erythrinioidea;
- 3) A análise filogenética morfológica recuperou satisfatoriamente algumas relações familiares e suprafamiliares em Erythrinioidea. No entanto algumas famílias reconhecidamente monofiléticas como Lebiasinidae e Alestidae não são aqui obtidas como monofiléticas possivelmente devido às homoplasias presentes neste tipo de caráter quando se analisa grupos muito distantes;
- 4) A relação próxima de *Arnoldichthys* com (*Rhabdalestes* + *Micralestes*) na análise morfológica aponta para uma nova hipótese de relacionamento para este grupo de Alestidae;
- 5) A análise conjunta de caracteres, morfológicos e moleculares, melhorou os valores relativos de suporte dos principais clados, mostrando-se úteis na elucidação das relações suprafamiliares em Characiformes.

REFERÊNCIAS

- Aljanabi SM, Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* 1997; 25(22): 4692-4693.
- Amanze D, Yvengar A. The micropyle: a sperm guidance system in teleost fertilization. *Development* 1990; 109: 495-500.
- Arroyave J, Stiassny MLJ. Phylogenetic relationships and the temporal context for the diversification of African characins of the family Alestidae (Ostariophysi: Characiformes): Evidence from DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2011; 60: 385-397.
- Azevedo MA. Análise comparada de caracteres reprodutivos em três linhagens de Characidae (Teleostei: Ostariophysi) com inseminação [Tese de Doutorado]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil; 2004.
- Baccetti B, Burrini AG, Gilbertini G, Mazzini M, Zerunian S. Fish germinal cells. I. Comparative spermatology of seven cyprinid species. *Gamete Research* 1984; 10: 373-396.
- Baicere-silva CM, Benine RC, Quagio-Grassiotto I. *Markiana nigripinnis* (Perugia, 1891) as a putative member of the subfamily Stevardiinae (Characiformes: Characidae): spermatic evidence. *Neotropical Ichthyology* 2011a; 9: 371-376.
- Baicere-Silva CM, Ferreira KM, Malabarba LR, Benine RC, Quagio-Grassiotto I. Spermatic characteristics and sperm evolution on the subfamily Stevardiinae (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). *Neotropical Ichthyology* 2011b; 9: 377-392.
- Baicere-Silva CM. Caracteres espermáticos: uma abordagem filogenética utilizando a família Characidae (Teleostei: Characiformes) como modelo [Tese de Doutorado]. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil; 2013.
- Bremer K. The limits of amino acid sequence data in angiosperm phylogenetic reconstruction. *Evolution* 1988; 42: 795–803.

- Bremer K. Branch support and tree stability. *Cladistics* 1994; 10: 295–304.
- Buckup PA. The Characidiinae: a phylogenetic study of the South American darters and their relationships with others characiform fishes [PhD. Dissertation]. University of Michigan, Ann Arbor; 1991.
- Buckup PA. The monophyly of the Characidiinae, a Neotropical group of characiform fishes (Teleostei: Ostariophysi). *Zoological Journal of the Linnean Society* 1993; 108: 225-245.
- Buckup PA. Relationships of the Characidiinae and phylogeny of characiform fishes (Teleostei: Ostariophysi). In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS, editors. *Phylogeny and Classification of the Neotropical fishes*. Porto Alegre: Edipucrs; 1998. p. 123-144.
- Burns JR, Weitzman SH. Novel Gill-derived gland in the male swordtail characin *Corynopoma riisei* (Teleostei: Characidae: Glandulocaudinae). *Copeia* 1996; 1996: 627-633.
- Burns JR, Weitzman SH, Lange KR, Malabarba LR. Sperm ultrastructure in characid fishes (Teleostei, Ostariophysi). In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS, editors. *Phylogeny and Classification of the Neotropical fishes*. Porto Alegre: Edipucrs; 1998. p. 235-244.
- Burns JR, Weitzman SH. Insemination in ostariophysian fishes. In: Grier HJ, Uribe MC, editors. *Viviparous Fishes*. Homestead Florida: New Life Publications; 2005. p.107-134.
- Burns JR, Quagio-Grassiotto I, Jamieson BGM. Ultrastructure of Spermatozoa: Ostariophysi. In: Jamieson BGM, editor. *Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes (Agnathans and Neoteleostomi)*. New Hampshire: Science Publishers; 2009. p. 287-387.
- Calcagnotto D, Scott AS, DeSalle R. Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2005; 36: 135–153.

Decru E, Vreven E, Snoeks J. A revision of the Lower Guinean *Hepsetus* species (Characiformes; Hepsetidae) with the description of *Hepsetus kingsleyae* sp. nov. Journal of Fish Biology 2013a; 82: 1351–1375.

Decru E, Snoeks J, Vreven E. The true identity of the holotype of *Hepsetus odoe* and the names of the two West African species of *Hepsetus* (Teleostei: Hepsetidae). Ichthyological Exploration of Freshwaters 2013b; 24(2): 187-192.

Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. 2004. Nucleic acids research 32 (5): 1792-1797.

Eschmeyer WN, Fong JD. Species by family/subfamily. 2014. (<http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>). Electronic version accessed 13 03 2014.

Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the Bootstrap. Evolution 1985; 39: 783–791.

Ferreira KM, Menezes NA, Quagio-Grassiotto I. A new genus and two new species of Stevardiinae (Characiformes: Characidae) with a hypothesis on their relationships based on morphological and histological data. Neotropical Ichthyology 2011; 9: 281-298.

Fink SV, Fink WL. Interrelationships of the ostariophysan fishes (Teleostei). Zoological Journal of the Linnean Society 1981; 72: 297-353.

Franzén Å. Phylogenetic aspects of the morphology of spermatozoa and spermiogenesis. In: Baccetti B, editor. Comparative Spermatology. New York: Academic Press; 1970. p. 29-45.

Friesen VL, Congdon BC, Kidd MG, Birt TP. Polymerase chain reaction (PCR) primers for the amplification of five nuclear introns in vertebrates. Molecular Ecology 1999; 8: 2141–2152.

Goloboff PA, Farris JS, Nixon KC. TNT, a free program for phylogenetic analysis. Cladistics 2008; 24: 774–786.

Gusmão-Pompiani P. Ultraestrutura da espermiogênese e dos espermatozoides de peixes da ordem Characiformes, família Characidae (Teleostei: Ostariophysi): uma abordagem filogenética [Tese de Doutorado]. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil; 2003.

Gusmão-Pompiani P, Malabarba LR, Oliveira C, Quagio-Grassiotto I. Spermiogenesis and spermatozoa ultrastructure in the Serrasalminae (Ostariophysi: Characiformes) with further evidence on the relationships of the piranhas and pacus. *Neotropical Ichthyology* 2009; 7(3):385-394.

Irwing DM, Kocher TD, Wilson AC. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *Journal of Molecular Evolution* 1991; 32:128-144.

Jamieson BGM. *Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa*. 1.ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1991.

Javonillo R, Burns JR, Weitzman SH. Sperm modifications related to insemination, with examples from the Ostariophysi. In: Jamieson BGM, editor. *Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes (Agnathans and Neoteleostomi)*. New Hampshire: Science Publishers; 2009. p. 723-763.

Javonillo R, Malabarba LR, Weitzman SH, Burns JR. Relationships among major lineages of characid fishes (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), based on molecular sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2010; 54: 498–511.

Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Pääbo S, Villablanca FX, Wilson A. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of Natural Academy of Sciences* 1989; 86: 6196-6200.

Lima FCT, Malabarba LR, Buckup PA, Pezzi JFS, Vari RP, Harold A. et al. *Genera Incertae Sedis in Characidae*. In: Reis RE, Kullander SO, Ferraris CJ, editors. *Check list of the freshwater fishes of South and Central America (CLOFFSCA)*. Porto Alegre: Edipucrs; 2003. p. 106-169.

Lovejoy NR, Collette BB. Phylogenetic relationships of new world needlefishes (Teleostei: Belontiidae) and the biogeography of transitions between marine and freshwater habitats. *Copeia* 2001; 1: 324–338.

Lucena CAS. Estudo filogenético da família Characidae com uma discussão dos grupos naturais propostos (Teleostei, Ostariophysi, Characiformes) [Tese de Doutorado]. Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil; 1993.

Malabarba LR, Weitzman SH. Description of a new genus with six species from southern Brazil, Uruguay and Argentina, with a discussion of a putative characid clade (Teleostei: Characiformes: Characidae). *Comunicações do Museu de Ciência e Tecnologia da PUCRS, Série Zoologia* 2003; 16: 67-151.

Matos E, Matos P, Corral L, Azevedo C. Estrutura fina do espermatozoide de *Acestrorhynchus falcatus* Bloch (Teleostei, Characidae) da região norte do Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 2000; 17: 747-751.

Mattei X. Spermiogenése des poisson.. In: Baccetti B, editor. *Comparative Spermatology*. New York: Academic Press; 1970. p.57-72.

Mattei X. Spermatozoon ultrastructure and its systematic implications in fishes. *Canadian Journal of Zoology* 1991; 69: 3038-3055.

Mirande JM. Weighted parsimony phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes). *Cladistics* 2009; 25: 574-613.

Mirande JM. Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. *Neotropical Ichthyology* 2010; 8(3):385-568.

Moreira CR. Relações Filogenéticas na ordem Characiformes (Ostariophysi, Teleostei) [Tese de Doutorado]. Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil; 2007.

Nelson JS. *Fishes of the World*. 4. ed. New York: John Wiley and Sons; 2006. 601p.

Oliveira CLC. Análise comparada de caracteres reprodutivos e da glândula branquial de duas espécies de Cheirodontinae (Teleostei: Characidae) [Dissertação de Mestrado].

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil; 2003.

Oliveira CLC. Análise comparada da ultraestrutura dos espermatozoides e morfologia da glândula braquial em espécies de Cheirodontinae (Characiformes: Characidae). [Tese de Doutorado]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil; 2007.

Oliveira C, Avelino GS, Abe KT, Mariguela TC, Benine, RC, Ortí G. et al. Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis extensive ingroup sampling. BMC Evolutionary Biology 2011; 11: 275-300.

Ortí G. Radiation of Characiform fishes: evidence from mitochondrial and nuclear DNA sequences. In: Kocher TD, Stepien CA, editors. Molecular Systematics of Fishes. London: Academic Press; 1997. p. 219-243.

Ortí G, Meyer A. Molecular evolution of ependymin and the phylogenetic resolution of early divergences among euteleost fishes. Molecular Biology and Evolution 1996; 13: 556-573.

Ortí G, Meyer A. The radiation of characiform fishes and the limits of resolution of mitochondrial ribosomal DNA sequences. Systematic Biology 1997; 46: 75-100.

Palumbi SR. Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. In Molecular Systematics. Edited by Hillis D, Moritz C, Mable B. Massachusetts: Sinauer Associates Inc. 1996: 205-247.

Pecio A, Burns JR, Weitzman SH. Comparison of spermiogenesis in the externally fertilizing *Hemigrammus erythrozonus* and the inseminating *Corynopoma riisei* (Teleostei: Characiformes: Characidae). Neotropical Ichthyology 2007; 5(4):457-470.

Pecio A. Ultrastructural Examination of Spermiogenesis and Spermatozoon Ultrastructure in Congo tetra *Phenacogrammus interruptus* Boulenger, 1899 (Ostariophysi: Characiformes: Alestidae). Folia biologica (Kraków) 2009; 57(1-2): 13-21.

Quagio-Grassiotto I, Negrão JNC, Carvalho ED, Foresti F. Ultrastructure of spermatogenic cells and spermatozoa in *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Characiformes, Erythrinidae). Journal of Fish Biology 2001; 59:1494-1502.

Quagio-Grassiotto I, Gameiro MC, Schneider T, Malabarba LR, Oliveira C. Spermiogenesis and spermatozoa ultrastructure in five species of the Curimatidae with some considerations on spermatozoal ultrastructure in the Characiformes. Neotropical Ichthyology 2003; 1: 35-45.

Quagio-Grassiotto I, Oliveira C. A new type of spermiogenesis and spermatozoa ultrastructure in Pimelodidae with a comparative review on spermatozoa ultrastructure of the Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi). Zoologischer Anzeiger 2008; 247: 55-66.

Quagio-Grassiotto I, Malabarba LR, Azevedo MA, Burns JR, Baicere-Silva CM, Quevedo R. Unique derived features in spermiogenesis and sperm morphology supporting a close relationship between the species of *Hollandichthys* and *Rachoviscus* (Characiformes: Characidae). Copeia 2012; 2012(4): 609-625.

Santana JCO, Baicere-silva CM, Gusmão-Pompiani P, Benine RC, Quagio-Grassiotto I. An assessment approach for application of spermiatic data in phylogenetic analyses: within the genus *Moenkhausia* Eigenmann, 1903 (Characiformes: Characidae). Acta Zoologica (Stockholm) 2013a; 94: 335-354.

Santana JCO, Netto-Ferreira AL, Calcagnotto D, Quagio-Grassiotto I. Sperm characteristics as additional evidence of close relationship between Lebiasina and Piabucina (Characiformes: Lebiasinidae: Lebiasininae). Neotropical Ichthyology 2013b; 11: 573-579.

Sharin AAB. Spermatogenesis and spermatozoon ultrastructure in the Nile pebblyfish *Alestes dentex* (Teleostei: Characiformes: Alestidae) in Egypt. World Journal of Zoology 2006; 1: 1-16.

Uj A. Étude comparative de l'ostéologie crânienne des poissons de la famille des Characidae et son importance phylogénétique. [PhD. Dissertation]. Université de Genève, Genève; 1990.

Vari RP. Anatomy, relationships and classification of the families Citharinidae and Distichodontidae (Pisces, Characoidea). Bulletin of the British Museum (Natural History – Zoological Series) 1979; 36: 261-344.

Vari RP. The neotropical fish family Ctenoluciidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes): Supra and intrafamilial phylogenetic relationships, with a revisionary study. Smithsonian Contributions to Zoology 1995; 564: 1-97.

Veríssimo-Silveira R. Ultraestrutura da espermiogênese e dos espermatozoides de peixes da Subordem Characoidei (Teleostei:Characiformes): uma abordagem filogenética [Tese de Doutorado]. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil; 2007.

Veríssimo-Silveira R, Gusmão-Pompiani P, Vicentini CA, Quagio-Grassiotto I. Spermiogenesis and spermatozoa ultrastructure in *Salminus* and *Brycon*, two primitive genera in Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes). Acta Zoologica (Stockholm) 2006; 87: 305–313.

Weitzman SH, Menezes NA. Relationships of the tribes and genera of the Glandulocaudinae (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) with a description of a new genus, *Chrysobrycon*. In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZME, Lucena CA, editors. Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Porto Alegre: Edipucrs; 1998. p. 171-192.

Weitzman SH, Menezes NA, Evers HG, Burns JR. Putative relationships among inseminating and externally fertilizing characids, with a description of a new genus and species of Brazilian inseminating fish bearing an anal-fin gland in males (Characiformes: Characidae). Neotropical Ichthyology 2005; 3: 329-360.

Zanata AM, Vari RP. The family Alestidae (Ostariophysi, Characiformes): a phylogenetic analysis of a trans-Atlantic clade. Zoological Journal of the Linnean Society 2005; 145: 1-144.

Zengeya TA, Decru E, Vreven E. Revalidation of *Hepsetus cuvieri* (Castelnau, 1861) (Characiformes: Hepsetidae) from the Quanza, Zambezi and southern part of the Congo ichthyofaunal provinces. Journal of Natural History 2011; 45(27-28): 1723-1744.

APÊNDICE I

Matriz de dados morfológicos utilizados na análise apenas com dados morfológicos e na análise de evidência total (juntamente com os dados moleculares). Os dados não comparáveis entre si foram assinalados com o símbolo “-“ e os dados não disponíveis ou de codificação duvidosa foram assinalados com o símbolo “?”.

Caracteres	
Outgroup	
1.Pimelodella_sp.	000012--0--000-1-0300---00-----0-01000001211040012011100-0-0
Ingroup	
2.Citharinus_sp.	000012--0--010-0-000000-00-0---0-01-00051033000110001100-0-0
3.Xenocharax_spilurus	000012--0--001-0-0000---00-----0-00000051111000112001100-0-0
4.Distichodus_affinis	000012--0--001-0-0000---00-----0-00000051111000112001100-0-0
5.Distichodus_decemmaculatus	000012--0--001-0-0000---00-----0-00000051111000112001100-0-0
6.Distichodus_fasciolatus	000012--0--001-0-0000---00-----0-00000051111000112001100-0-0
7.Nannocharax_sp.	000012--0--001-0-0000---00-----0-00000051111000112001100-0-0
8.Neolebias_trilineatus	000012--0--001-0-0000---00-----0-00000051111000112001100-0-0
9.Ichthyborus_ornatus	000012--0--001-0-0000---00-----0-00000051111000112001100-0-0
10.Phago_boulengeri	000012--0--001-0-0000---00-----0-00000051111000112001100-0-0
11.Acestrorhynchus_falcatus	00000-0101-0000-3-301--3--3----100001--00---050---0---00-0-1
12.Acestrorhynchus_pantaneiro	00000-0101-0000-3-301--3--3----100001--00---050---0---00-0-1
13.Acestrorhynchus_falcirostris	00000-0101-0000-3-301--3--3----100001--00---050---0---00-0-1
14.Pyrrhulina_australis	00000-1101-0000-3-301--3--4----0-00010010003040112111100-0-0
15.Hepsetus_odoec	00000-1001-0100-3-300003--40---0-000000010000312220111??-0-0
16.Boulengerella_cuvieri	00000-000000100-0-100011--020--00-0010000122301000000110120-0
17.Ctenolucius_hujeta	00000-000000100-0-100011--020--00-0010000122101000001100120-0
18.Raphiodon_vulpinus	00000-000000100-0-100021--021--00-000000011101201120001110110
19.Chalceus_epakros	-----0-0-200011--021--00-0010004100011022201??00-110
20.Bryconalestes_longipinnis	00000-000000100-0-000011--020--00-00100021112110100111000-100
21.Alestes_dentex	00000-000000100-0-000011--020--00-00100021112110100111000-??0
22.Brachypetersius_altus	00000-000000100-0-000011--020--00-001000010001?022201??00-100
23.Brycinus_imberi	00000-000000100-0-200011--021--00-001000210001?022201??00-??0
24.Brycinus_lateralis	00000-000000100-0-200011--021--00-001000210001?022201??00-??0
25.Phenacogrammus_interruptus	00000-000000100-0-310010--021--00-0010001202101011111110130-0
26.Micralestes_acutidens	00000-400010100-2-300002--31---00-0010001100001?222111100-0-0
27.Rhabdalestes_rhodesienses	00000-300010100-2-310022--120--00-00100011000011222111100-0-0
28.Alestopetersius_compressus	00000-300010100-2-300022--120--00-0000001100011022201111130-0
29.Arnoldichthys_spilopterus	00000-100010100-2-300022--420--00-00?01?11??01????0111??0-0
30.Brycon_microlepis	00000-000000100-0-100011--121--10-00100001111120111011010-0-0
31.Brycon_orbignyanus	00000-000000100-0-100011--121--10-00100001111120111011010-0-0
32.Brycon_hilarii	00000-000000100-0-100011--121--10-00100001111120111011010-0-0
33.Salminus_brasiliensis	00000-000000100-0-100011--021--10-00100001111120111011010-0-0
34.Salminus_maxillosus	00000-000000100-0-100011--021--10-00100001111120111011010-0-0
35.Erythrinus_erythrinus	00000-100010100-2-310002--41---0-01-010011100301120111-1?0-0
36.Hoplerethrinus_unitaeniatus	00000-100010100-2-310002--41---0-01-010011100301120111-130-0
37.Hoplias_malabaricus	00000-100010100-2-301022--41---0-01-010011100301121111-130-0
38.Crenuchus_spilurus	00000-200000100-0-3001-0--2--00-0-0000001211103011111101?0-0
39.Lebiasina_aff_festae	00000-3001-1101-3-3101-4--2--00-1100000012000010222111100-0-0
40.Lebiasina_bimaculata	00000-3001-1101-3-3101-4--2--00-1100000012000010222111100-0-0
41.Lebiasina_erythrinoides	00000-3001-1101-3-3101-4--2--00-1100000012000010222111100-0-0
42.Lebiasina_melanoguttata	00000-3001-1101-3-3101-4--2--00-1100000012000010222111100-0-0
43.Lebiasina_aff_uryensis1	00000-3001-1101-3-3101-4--2--00-1100000012000010222111100-0-0

44.	Lebiasina_aff._uruyensis2	00000-3001-1101-3-3101-4--2--00-1100000012000010222111100-0-0
45.	Piabucina_boruca	00000-3001-1101-3-3101-4--2--00-1100000012000010222111100-0-0
46.	Piabucina_elongata	00000-3001-1101-3-3101-4--2--00-1100000012000010222111100-0-0
47.	Piabucina_panamensis	00000-3001-1101-3-3101-4--2--00-1100000012000010222111100-0-0
48.	Nannostomus_beckfordi	00000-4001-0100-3-300003--20---0-00000002000040222111100-0-0
49.	Nannostomus_eques	00000-4001-0100-3-300003--20---0-00000002000010222111100-0-0
50.	Nannostomus_nitidus	00000-4001-0100-3-300003--20---0-00000002000010222111100-0-0
51.	Copeina_sp._	00000-1001-0100-2-300003--41---0-0000??????????????????-?-?
52.	Copella_nattereri	00000-1001-0100-2-300003--41---0-000000110000?0222111101?0-0
53.	Piaractus_mesopotamicus	00000-000000102-0-000020--120--00-00000051111110111011100-110
54.	Serrasalmus_maculatus	00000-000000100-0-400020--120--00-000000511111301110111012110
55.	Mylossoma_duriventre	00000-000000100-0-400020--120--00-00000051111110111011100-110
56.	Metynnis_mola	00000-000000100-0-400020--120--00-000000511111101110111012110
57.	Psectrogaster_essequibenses	00000-000000100-0-100020--521--00-00100001222050001111113110
58.	Prochilodus_lineatus	00000-000000100-0-100020--521--00-001000011111501110011113110
59.	Abramites_sp.	00000-000000100-0-100020--521--00-001000011110501110011113110
60.	Leporinus_lacustris	00000-000000100-0-100020--521--00-001000011110501110011113110
61.	Triportheus_paranensis	000010--0--010-1-03001-01-21--00-0100000122206000000000-0-0
62.	Astyanax_altiparanae	000010--0--010-1-03001--02---0000-0000000101?03011?011000-0-0
63.	Astyanax_bimaculatus	000010--0--010-1-03001--02---0000-000000111?03011?010000-0-0
64.	Tetragonopterus_argenteus	000010--0--010-1-03001--02---1100-000000011?03111-001100-0-0
65.	Moenkhausia_sanctaefilomenae	000011--0--010-1-03001--12---1100-00000101100110112011100-2-0
66.	Inpaychthys_kerri	000011--0--010-1-03001--12---1000-0000100121?050122000000-2-0
67.	Bryconops_affinis	000011--0--010-1-03001--02---0000-10000001210070001011?00-0-0
68.	Bryconamericus_stramineus	000010--1--010-1-13001--21---0000-00000011000070222000000-0-0
69.	Cheirodon_stenodon	000011--0--010-1-03001--02---0000-1000101101?160022000000-0-0
70.	Creagrutus_meridionalis	000010--1--010-1-13001--21---0000-00000011000070222000000-0-0
71.	Hemibrycon_surinamensis	?00010--1--010-1-13001--21---0000-00000011000070222000000-0-0
72.	Hemigrammus_herythrozonus	000011--0--010-1-03001--02---1100-000001112111-0011001100-2-0
73.	Hyphessobrycon_eques	000011--0--010-1-03001--12---1100-000010110000-0122011100-0-0
74.	Knodus_meridae	000010--1--010-1-13001--21---0000-00000001000070222000000-0-0
75.	Roeboides_microlepis	000010--0--010-1-03001--01---1100-000000110?041111000000-0-0
76.	Mimagoniates_microlepis	11110-0011-1003-3-300-4--0---00-0001-00333-0-0---0--00-0-0
77.	Gephyrocharax_atricaudatus	11110-0011-1103-3-3001-4--41-1100-000000033301-0222000000-0-0
78.	Characidium_gomesi	00000-000000100-0-310000--021--00-0000003100303022201111130-0
79.	Characidium_sp.	00000-000000100-0-310000--021--00-0000003100303022201111130-0

APÊNDICE II

Artigo científico (1) publicado no periódico Neotropical Ichthyology a partir dos dados originados da presente Tese de doutorado. Em cumprimento à Instrução Normativa - 007/2012.

Neotropical Ichthyology, 11(3):573-579, 2013
Copyright © 2013 Sociedade Brasileira de Ictiologia

Sperm characteristics as additional evidence of close relationship between *Lebiasina* and *Piabucina* (Characiformes: Lebiasinidae: Lebiasininae)

Júlio César de O. Santana¹, André L. Netto-Ferreira², Daniela Calcagnotto³
and Irani Quagio-Grassiotto⁴

Spermiogenesis and spermatozoa of representatives of the genera *Lebiasina* and *Piabucina* are described. Spermiogenesis is quite similar among all analyzed species of these genera and is identified as Type II. In this type of spermiogenesis, the flagellum of earliest spermatids lies lateral to the nucleus. A slight movement of the nucleus towards the centriolar complex is observed. In late spermatids, the nucleus slightly elongates towards the flagellum. The formation of two striated rootlets apparently occurs in early/intermediate spermatids. The spermatozoa of species of *Lebiasina* and *Piabucina* share (1) a drop-shaped slightly elongated nucleus that is laterally positioned relative to the flagellum; (2) a superolateral centriolar complex; (3) two striated rootlets; (4) a basolateral midpiece; (5) oblong mitochondria and (6) a few spherical vesicles. The spermiotic characteristics of *Lebiasina* and *Piabucina* indicate that spermiogenesis is a homologous process among all species of both genera examined to date and can be considered, along with the spermatozoa morphology, additional evidence indicating a close relationship between *Lebiasina* and *Piabucina*.

A espermiogênese e os espermatozoides de representantes dos gêneros *Lebiasina* e *Piabucina* são descritos. O processo de espermiogênese é muito semelhante entre todas as espécies analisadas, sendo descrita como do Tipo II. Nesta variação de espermiogênese o flagelo das espermátides iniciais localiza-se lateralmente ao núcleo. O núcleo movimenta-se ligeiramente sobre o complexo centriolar. Nas espermátides finais, o núcleo alonga-se ligeiramente em direção ao eixo flagelar. A formação de duas raízes estriadas ocorre nas espermátides iniciais e intermediárias. Os espermatozoides das espécies de *Lebiasina* e *Piabucina* compartilham principalmente (1) o núcleo em forma de gota, lateralmente posicionado em relação ao eixo flagelar, e ligeiramente alongado em direção ao flagelo, (2) o complexo centriolar superolateral, (3) duas raízes estriadas surgindo a partir do centríolo distal, (4) peça intermediária basolateral, (5) mitocôndrias oblongas e (6) algumas vesículas esféricas. As características espermáticas de *Lebiasina* e *Piabucina* foram observadas comparativamente e permitem concluir que o processo de espermiogênese é homólogo em todas as espécies destes dois gêneros examinadas até o momento. Os espermatozoides e principalmente os dados de espermiogênese são apresentados aqui como evidências adicionais que indicam uma relação estreita entre os gêneros *Lebiasina* e *Piabucina*.

Key words: Ostariophysi, Neotropical Fish, Spermatozoa, Systematics, Ultrastructure.

APÊNDICE III

Artigo científico (2) publicado no periódico Neotropical Ichthyology a partir dos dados originados da presente Tese de doutorado. Em cumprimento à Instrução Normativa - 007/2012.

Neotropical Ichthyology, 12(2): 419-427, 2014
Copyright © 2014 Sociedade Brasileira de Ictiologia
DOI: 10.1590/1982-0224-20130177

Sperm evolution in the family Alestidae with comparative data for the genus *Chalceus* (Ostariophysi: Characiformes)

Júlio César de O. Santana¹, Daniela Calcagnotto² and Irani Quagio-Grassiotto^{3*}

Spermiogenesis and spermatozoa in six genera of the African family Alestidae plus the Neotropical genus *Chalceus* are described. Spermiogenesis is quite similar in all Alestidae and is identified as Type I and its variants. In Type I spermiogenesis, the flagellum of earliest spermatids lies lateral to the nucleus, and rotation of the nucleus towards the centriolar complex is observed. Nuclear rotation is complete reaching 90 degrees in *Bryconalestes longipinnis*, *Brachypetersius altus*, *Erycinus imberi*, *E. lateralis*, and *Alestopetersius compressus*; and is incomplete reaching 20 degrees in *Micralestes acutidens* and *Rhabdalestes rhodesiensis*. Spermatozoa morphology varies from a medial nucleus with fibrillar chromatin in the most basal genus *Erycinus* to a strongly eccentric nucleus with highly condensed chromatin in the more derived *Rhabdalestes* and *Micralestes*. *Chalceus* has a very similar spermatozoon to that found in *Erycinus* sharing the fibrillar aspect of the chromatin in the nucleus. This feature is so far only observed in these two genera among African and Neotropical characiform fishes.

A espermiogênese e os espermatozoides de seis gêneros que compõem a família Alestidae mais o gênero *Chalceus* são descritos. A espermiogênese é muito similar em todas as espécies de Alestidae analisadas e pode ser considerada como sendo o Tipo I e suas variações. Neste tipo de espermiogênese, o flagelo das espermátides iniciais dispõe-se lateral ao núcleo. A rotação do núcleo em direção ao complexo centriolar está presente. A rotação nuclear é completa, atingindo 90 graus, em *Bryconalestes longipinnis*, *Brachypetersius altus*, *Erycinus imberi*, *E. lateralis* e *Alestopetersius compressus*; incompleta, atingindo 20 graus, em *Micralestes acutidens* e *Rhabdalestes rhodesiensis*. A morfologia dos espermatozoides de Alestidae varia desde o núcleo medial com cromatina fibrilar no gênero *Erycinus*, considerado mais basal, até o núcleo muito excêntrico com cromatina altamente compactada, nos gêneros *Rhabdalestes* e *Micralestes*, considerados mais derivados dentro de Alestidae. *Chalceus* possui um espermatozoide muito similar a *Erycinus*, compartilhando entre eles o aspecto fibrilar da cromatina no núcleo. Esta característica até o momento só foi observada nestes dois gêneros dentre os Characiformes Africanos e Neotropicals.

Key words: African Fish, Ostariophysi, Spermatozoa, Systematics, Ultrastructure.

ANEXO I

Carta de confirmação do estágio técnico realizado no South African Institute for Aquatic Biodiversity (SAIAB) para coleta de amostras das famílias de Characiformes Africanos Alestidae, Citharinidae, Distichodontidae e Hepsetidae.



ANEXO II

Carta de confirmação do estágio técnico realizado no American Museum of Natural History (AMNH) para coleta de amostras das famílias de Characiformes Africanos Alestidae, Citharinidae, Distichodontidae e Hepsetidae.

AMERICAN MUSEUM OF NATURAL HISTORY

DIVISION OF VERTEBRATE ZOOLOGY

DEPARTMENT OF ICHTHYOLOGY

Phone : 212 769- 5796

Email: mjlis@amnh.org

<http://research.amnh.org/iz/ichthyology/>

<http://research.amnh.org/iz/ichthyology/congo/index.html>

<http://www.columbia.edu/cu/le30/faculty.html>

<http://eggs.amnh.org/faculty/view/35>

August 16th, 2012

To Whom It May Concern

Dear Sir or Madam,

This letter is to affirm my support of the visa application of Mr. Júlio César de Oliveira Santana, a graduate student at the Universidade Estadual de Campinas –SP, Brazil, whom I have invited to spend a study visit at the Ichthyology Department, of the American Museum of Natural History here in New York City. Mr Santana is hoping to spend about 18 days here, arriving in 1st November and return to Brazil in 18th November, 2012.

Attendance at international research institutions, and participation in collaborative research is a critical part of graduate student education and accordingly I urge you to give his candidacy your favorable consideration.

Thanks in advance for your assistance with this request, and please feel free to contact me should you need additional information.



Melanie L.J. Stiassny
Axelrod Research Curator of Fishes
Professor, Richard Gilder Graduate School

ANEXO III

Lista de espécies e respectivos genes provenientes do trabalho de Calcagnotto *et al.* (2005) utilizadas no presente estudo para as análises molecular e de evidência total

Espécies	Voucher	GB 16s	GB cytb	GB flk	GBRag2	GBsia
<i>Pimelodella</i> sp.	AMNH233447	AY787953	AY791351	AY817285		AY790011
<i>Anostomus</i> sp.1	AMNH233421	AY787954	AY791352	AY817286		AY790012
<i>Astyanax bimaculatus</i>		AY787955		AY817287	AY804025	AY790013
<i>Acestrorhynchus</i> sp.		AY787956	AY791353	AY817288	AY804026	AY790014
<i>Acestrorhynchus</i> cf. <i>nasutus</i>	AMNH233420			AY817289		AY790015
<i>Ancistrus</i> sp.	AMNH233339	AY787958	AY791354	AY817290		AY790016
<i>Chrysichthys</i> sp.	AMNH 233630	AY787957	AY791355			AY790017
<i>Brycinus macrolepidotus</i>	RUSI 065121	AY787959	AY791356	AY817291		AY790018
<i>Brycinus caroliniae</i>	RUSI 065125	AY787960	AY791357	AY817292		AY790019
<i>Micralestes occidentalis</i>	RUSI 065135	AY787961	AY791358	AY817293	AY804027	AY790020
<i>Brycinus caroliniae</i>	RUSI 065136	AY787962	AY791359	AY817294	AY804028	AY790021
<i>Alestes baremoze</i>	AMNH 226451	AY787963	AY791360	AY817295	AY804029	AY790022
<i>Alestes macrophthalmus</i>		AY787964	AY791361	AY817296	AY804030	AY790023
<i>Anostomus</i> sp.2	AMNH233414	AY787965	AY791362	AY817297		AY790024
<i>Aphyocheirodon</i> sp.	AMNH233206	AY787966	AY791363	AY817298	AY804031	AY790025
<i>Astyanax scabripinnis</i>		AY787967		AY817299		AY790026
<i>Arnoldichthys spilopterus</i>	AMNH233399	AY787968	AY791364	AY817300	AY804032	AY790027
<i>Astyanacinus</i> sp.	AMNH233246	AY787969	AY791365	AY817301	AY804033	AY790028
<i>Brycinus nurse</i>	AMNH233415	AY787970	AY791366	AY817302	AY804034	AY790029
<i>Mylesinus schomburgki</i>		AY787971	AY791367	AY817303	AY804035	AY790030
<i>Brycinus imberi</i>	RUSI 61488#1	AY787972	AY791368		AY804036	AY790031
<i>Brycinus kingsleyae</i>	AMNH 231534	AY787973		AY817304	AY804037	AY790032
<i>Brycinus lateralis</i>	RUSI#49	AY787974	AY791369	AY817305	AY804038	AY790033
<i>Brycinus longipinis</i>	AMNH233405	AY787975		AY817306	AY804039	AY790034
<i>Brycon hilarii</i>		AY787976	AY791370	AY817307	AY804040	AY790035
<i>Bryconaethiops microstoma</i>	AMNH233390	AY787977	AY791371	AY817308	AY804041	AY790036
<i>Brycinus opistotaenia</i>		AY787978	AY791372	AY817309	AY804042	AY790037

<i>Botia</i> sp.	AMNH233431	AY787979			AY804043	AY790038
<i>Brycinus longipinis</i>	AMNH 230817	AY787980		AY817310	AY804044	AY790039
<i>Brycinus caroliniae</i>	AMNH 233628	AY787981	AY791373	AY817311	AY804045	AY790040
<i>Brycon</i> sp.		AY787982		AY817312	AY804046	AY790041
<i>Bryconaethiops</i> sp.		AY787983	AY791374	AY817313	AY804047	AY790042
<i>Bryconamericus</i> cf.	AMNH233340	AY787984	AY791375	AY817314	AY804048	AY790043
<i>diaphanus</i>		AY787985	AY791376	AY817315	AY804049	AY790044
<i>Bryconops</i> sp.		AY787986	AY791377	AY817316	AY804050	AY790045
<i>Brycinus schoutedeni</i>		AY787987		AY817317	AY804051	AY790046
<i>Astyanacinus</i> sp.	AMNH233243	AY787988		AY817318	AY804052	AY790047
<i>Characidium</i> cf.	AMNH233314	AY787989	AY791378	AY817319		AY790048
<i>purpuratum</i>	AMNH 226441	AY787990	AY791379	AY817320	AY804053	AY790049
<i>Citharinus citharus</i>		AY787991		AY817321	AY804054	AY790050
<i>Chalceus erythrurus</i>	AMNH233413	AY787992	AY791380	AY817322	AY804055	AY790051
<i>Characidium fasciatum</i>	AMNH233235	AY787993				AY790052
<i>Characidium fasciatum</i>	AMNH233251	AY787994	AY791381	AY817323	AY804056	AY790053
<i>Characidium</i> sp.	MNRJ12843	AY787995	AY791382	AY817324	AY804057	AY790054
<i>Roeboides</i> sp.	AMNH233430	AY787996	AY791383		AY804058	AY790055
<i>Cheirodon</i> sp.	AMNH233214	AY787997		AY817325		AY790056
<i>Cheirodontops</i> sp.	AMNH233215	AY787998	AY791384	AY817326	AY804059	AY790057
<i>Chilodus punctatus</i>	AMNH233424	AY787999	AY791385	AY817327	AY804060	AY790058
<i>Ctenolucius hujeta</i>	AMNH233412	AY788000	AY791386	AY817328	AY804061	AY790059
<i>Chalceus</i>	AMNH233404	AY788001			AY804062	AY790060
<i>macrolepidotus</i>		AY788002	AY791387	AY817329	AY804063	AY790061
<i>Colossoma</i>		AY788003	AY791388	AY817330	AY804064	AY790062
<i>macropomum</i>		AY788004	AY791389	AY817331		AY790063
<i>Creagrutus</i> sp.	AMNH233216	AY788005	AY791390	AY817332	AY804065	AY790064
<i>Micralestes</i> cf.	AMNH233417	AY788006	AY791391	AY817333	AY804066	AY790065
<i>pabrensis</i>	MNRJ12838	AY788007	AY791392	AY817334	AY804067	AY790066
<i>Characidium vidali</i>		AY788008	AY791393	AY817335		AY790067
<i>Distichodus affinis</i>	AMNH233391	AY788009	AY791394	AY817336	AY804068	AY790068
<i>Distichodus decemmaculatus</i>	AMNH233392	AY788010	AY791395	AY817337	AY804069	AY790069
<i>Distichodus hypostomatus</i>						
<i>Distichodus fasciolatus</i>	RUSI 065159					
<i>Distichodus fasciolatus</i>	AMNH 233624					
<i>Distichodus lusosso</i>	AMNH233437					
<i>Distichodus notospilus</i>	AMNH 231537					

<i>Danio rerio</i>	AMNH233432	AY788011		AY817338	AY804070	AY790070
<i>Distichodus sexfasciatus</i>	AMNH233393	AY788012	AY791396	AY817339	AY804071	AY790071
<i>Exodon paradoxus</i>	AMNH233426	AY788013	AY791397	AY817340	AY804072	AY790072
<i>Gephyrocharax</i> sp.	AMNH233275	AY788014	AY791398	AY817341	AY804073	AY790073
<i>Hemigrammopetersius barnardi</i>	RUSI 64917#1	AY788016		AY817342	AY804075	AY790075
<i>Hemigrammus bleheri</i>	AMNH233395	AY788017		AY817343	AY804076	AY790076
<i>Hydrocynus brevis</i>	AMNH 22644	AY788018	AY791400	AY817344	AY804077	AY790077
<i>Alestopetersius caudalis</i>		AY788019	AY791401	AY817345	AY804078	AY790078
<i>Hemibrycon beni</i>	AMNH233328	AY788020	AY791402	AY817346	AY804079	AY790079
<i>Hemistichodus vaillanti</i>		AY788021		AY817347		AY790080
<i>Hyphessobrycon eques</i>	AMNH233428	AY788022		AY817348	AY804080	AY790081
<i>Hemigrammus erythrozonus</i>	AMNH233396	AY788023		AY817349	AY804081	AY790082
<i>Hydrocynus forskalii</i>		AY788024	AY791403	AY817350	AY804082	AY790083
<i>Hydrocynus goliath</i>	AMNH 233631	AY788025		AY817351		AY790084
<i>Hydrocynus vittatus</i>	AMNH 233623	AY788026	AY791404	AY817352	AY804083	AY790085
<i>Hemiodus gracilis</i>	AMNH233427	AY788027	AY791405	AY817353	AY804084	AY790086
<i>Hemigrammocharax machadoi</i>	RUSI 61221	AY788028	AY791406	AY817354		AY790087
<i>Hemigrammocharax multifasciatus</i>	RUSI 63497	AY788029	AY791407	AY817355	AY804085	AY790088
<i>Hepsetus odoe</i>	AMNH 231495	AY788030	AY791408	AY817356	AY804086	AY790089
<i>Hoplias</i> sp.		AY788031	AY791409	AY817357	AY804087	AY790090
<i>Elachocharax</i> sp.	AMNH233425	AY788032		AY817358		
<i>Hydrolycus pectoralis</i> (= <i>Hydrolycus scomberoides</i>)		AY788033		AY817359	AY804088	AY790091
<i>Hemigrammus rodwayi</i>	AMNH233397	AY788034		AY817360	AY804089	AY790092
<i>Hydrocynus vittatus</i>	RUSI 065127	AY788035		AY817361	AY804090	AY790093
<i>Hydrocynus vittatus</i>	RUSI 061489	AY788036	AY791410	AY817362	AY804091	AY790094
<i>Citharinus</i> sp.	RUSI 065184	AY788037	AY791411	AY817363		AY790095
<i>Ichthyborus</i> sp.	AMNH 233626	AY788038	AY791412	AY817364	AY804092	AY790096
<i>Inpaichthys kerri</i>	AMNH233400	AY788039		AY817365	AY804093	AY790097
<i>Ictalurus punctatus</i>	AMNH233448	AY788040	AY791413	AY817366		AY790098
<i>Knodus</i> sp.	AMNH233223	AY788041	AY791414	AY817367	AY804094	AY790099
<i>Leporinus</i> sp.		AY788044	AY791416	AY817370	AY804095	AY790102

<i>Leporinus striatus</i>	AMNH233300	AY788045		AY817371	AY804096	AY790103
<i>Ladigesia roloffi</i>	AMNH233394	AY788046	AY791417	AY817372	AY804097	AY790104
<i>Micralestes acutidens</i>	RUSI 61487#1	AY788047	AY791418	AY817373	AY804098	AY790105
<i>Nannopetersius ansorgii</i>		AY788048	AY791419	AY817374	AY804099	AY790106
<i>Mylossoma duriventre</i>		AY788049		AY817375	AY804100	AY790107
<i>Metynnus calmoni</i> (=Pristobrycon <i>calmoni</i>)	MZUSP 85843	AY788050		AY817376		AY790108
<i>Mimagoniates lateralis</i>	AMNH233402	AY788051	AY791420	AY817377	AY804101	AY790109
<i>Micralestes interruptus</i>	AMNH233442	AY788052	AY791421	AY817378	AY804102	AY790110
<i>Misgrunus</i> sp.	AMNH233435	AY788053		AY817379	AY804103	AY790111
<i>Moenkhausia sanctaefilomenae</i>	AMNH233419	AY788054			AY804104	AY790112
<i>Myleus schomburgkii</i>	MZSUSP 58505	AY788055		AY817380	AY804105	AY790113
<i>Mylesinus</i> sp.	MZUSP 58508	AY788056		AY817381		AY790114
<i>Myleus</i> sp.	MZUSP 58511	AY788057	AY791422	AY817382		AY790115
<i>Neolebias ansorgii</i>		AY788058	AY791423	AY817383	AY804106	AY790116
<i>Nannostomus beckfordi</i>	AMNH233406	AY788059		AY817384		AY790117
<i>Nannocharax macropterus</i>	RUSI 7-6-00 #2	AY788060		AY817385		AY790118
<i>Neolebias powelli</i>	AMNH233408	AY788061	AY791424	AY817386	AY804107	AY790119
<i>Nannostomus espei</i>	AMNH233407	AY788062		AY817387		AY790120
<i>Nannocharax trilineatus</i>		AY788063	AY791425	AY817388	AY804108	AY790121
<i>Prodontocharax</i> sp.	AMNH233236	AY788064	AY791426	AY817389	AY804109	AY790122
<i>Parodon</i> sp.	AMNH233323	AY788065	AY791427	AY817390	AY804110	AY790123
<i>Phenacogrammus aurantiacus</i>	AMNH233441	AY788066	AY791428	AY817391	AY804111	AY790124
<i>Piaractus brachipomus</i>	MZUSP 85849	AY788067	AY791429	AY817392	AY804112	AY790125
<i>Bathyaethiops breuseghemi</i>	AMNH233422	AY788068	AY791430	AY817393	AY804113	AY790126
<i>Phago</i> sp.	AMNH 233627	AY788069	AY791431			AY790127
<i>Alestopetersius hilgendorfi</i>	AMNH233438	AY788070	AY791432	AY817394	AY804114	AY790128
<i>Phenacogrammus hilgendorfi</i>	AMNH233445	AY788071	AY791433	AY817395	AY804115	AY790129
<i>Phenacogrammus interruptus</i>	AMNH233444	AY788072	AY791434	AY817396	AY804116	AY790130
<i>Prochilodus lineatus</i>				AY817397	AY804117	
<i>Piaractus mesopotamicus</i>		AY788073	AY791435	AY817398	AY804118	AY790131
<i>Pygocentrus nattereri</i>		AY788074	AY791436	AY817399	AY804119	AY790132

<i>Prochilodus nigricans</i>	AMNH233305	AY788075	AY791437	AY817400	AY804120	AY790133
<i>Rhabdalestes</i>	RUSI 1-6-96	AY788077		AY817402	AY804122	AY790135
<i>maunensis</i>		AY788078		AY817403		
<i>Raphiodon vulpinus</i>		AY788079		AY817404	AY804123	AY790136
<i>Serrasalmus</i> sp.		AY788080	AY791438	AY817405	AY804124	AY790137
<i>Salminus maxillosus</i>		AY788081		AY817406		AY790138
<i>Serrasalmus rhombeus</i>	MZUSP 58506	AY788082		AY817407	AY804125	AY790139
<i>Triportheus angulatus</i>	AMNH233403	AY788083	AY791439	AY817408	AY804126	AY790140
<i>Melanocharacidium</i> sp.	AMNH233321	AY788084	AY791440	AY817409		AY790141
<i>Xenocharax spirulus</i>	AMNH 231548	AY788085	AY791441	AY817410		AY790142
<i>Xenocharax spirulus</i>						

ANEXO IV

Autorização da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da UNESP.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 206-CEEA, sobre "Análise das características ultraestruturais da espermiogênese e dos espermatozóides de representantes da superfamília *Erythrinioidea* (Teleostei:Characiformes): uma abordagem filogenética", sob a responsabilidade de **Irani Quagio Grassiotto**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL** (CEEA), em reunião de 09/04/2010.

Botucatu, 12 de abril de 2010.


Profª Drª PATRÍCIA FERNANDA F. PINHEIRO
Presidente - CEEA

Instituto de Biociências – Diretoria Técnica Acadêmica
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-000 Botucatu SP Brasil
Tel 14 3811 6013/6014 fax 14 3815 3744 e-mail: dta@ibb.unesp.br

ANEXO V

Autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNICAMP.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha tese de Doutorado intitulada Relações suprafamiliares em Erythrinioidea (Teleostei: Characiformes) com base em caracteres moleculares e da morfologia das células espermáticas:

() não se enquadra no § 4º do Artigo 1º da Informação CCPG 002/13, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

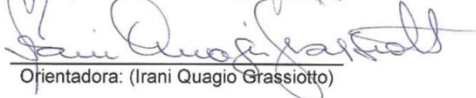
() CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No. _____, Instituição: _____

(X) CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No. 206-CEEA, Instituição: Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" - UNESP.

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. _____, Instituição: _____

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*


Aluno: (Júlio César de Oliveira Santana)


Orientadora: (Irani Quagio Grassiotto)

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

 - STEPHEN HYSLOP - VICE PRESIDENTE

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido


Prof. Dr. ALEXANDRE LEITE RODRIGUES DE OLIVEIRA
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/UNICAMP

Carimbo e assinatura