

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR

Tese de Doutorado

**Hibridação natural entre duas espécies de lambaris na
cabeceira do Rio Grande e suas consequências na
gametogênese e morfologia gonadal dos híbridos**

Ana Paula Barbosa Pinheiro
Belo Horizonte
2021

Ana Paula Barbosa Pinheiro

**Hibridação natural entre duas espécies de lambaris na
cabeceira do Rio Grande e suas consequências na
gametogênese e morfologia gonadal dos híbridos**

Tese de doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biologia
Celular do Departamento de Morfologia do
Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas Gerais
como requisito para obtenção de título de
Doutor em Biologia Celular.

Orientadora: Profª. Dra. Elizete Rizzo
Co-orientador: Prof. Dr. Rafael Magno Costa Melo

Belo Horizonte
Janeiro de 2021

043

Pinheiro, Ana Paula Barbosa.

Hibridação natural entre duas espécies de lambaris na cabeceira do Rio Grande e suas consequências na gametogênese e morfologia gonadal dos híbridos [manuscrito] / Ana Paula Barbosa Pinheiro. – 2021.

90 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Elizete Rizzo. Co-orientador: Prof. Dr. Rafael Magno Costa Melo.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Biologia Celular. 2. Hibridização Genética. 3. Infertilidade. 4. Apoptose. 5. Autofagia. 6. Fibrose. 7. *Astyanax fasciatus* – Reprodução. I. Bazzoli, Elizete Rizzo. II. Melo, Rafael Magno Costa. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576

*Aos meus pais... minha saudade
diária e eterna, minha maior
fonte de inspiração, meu alicerce
e meu guia até aqui.*

AGRADECIMENTOS

Ninguém consegue fazer nada sozinho... sempre precisamos de alguém que nos ensine, que nos inspire, que nos apoie, que nos faça acreditar em nós mesmos ou que simplesmente nos tire da rotina pesada para um momento de descontração. E tudo isso tem grande importância para o sucesso de qualquer trabalho que nos propomos a fazer. Assim, posso dizer com toda certeza que este trabalho teve a contribuição de muitas pessoas, sem as quais não teria sido possível chegar até aqui.

À banca, por aceitar dedicar um pouco do seu tempo para conhecer e contribuir para o aprimoramento do nosso trabalho.

À minha orientadora Elizete Rizzo pela oportunidade que me foi dada quando eu era quase uma caloura... pela confiança construída e aprendizados adquiridos ao longo desses muitos anos de convivência, pela paciência e tempo dedicados em me orientar.

Ao meu co-orientador Rafael, sem o qual esse projeto não teria existido, as coletas não teriam acontecido... agradeço pelos muitos ensinamentos, pela imensa colaboração e disponibilidade.

Ao professor Daniel Carvalho por me receber com boa vontade em seu laboratório, estabelecendo uma colaboração essencial para o sucesso deste trabalho.

Aos colegas do Labictio: Davidson, Yves, Francisco, André, Alessandro, Lourenço e Camila(s) pelas experiências compartilhadas, pela boa vontade e prontidão para ajudar sempre e por tornarem os dias de trabalho mais leves. Um agradecimento especial à Camila Sales, que se tornou uma grande parceira (e amiga) ao longo dessa caminhada... na realização das técnicas de laboratório, discussão de dados e desenvolvimento do projeto como um todo, contribuindo de forma essencial para este trabalho.

Aos colegas do LGC pela receptividade e boa vontade em ajudar, em especial Daniel Teixeira e Izabela.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular.

Àqueles que torceram por mim ou que de alguma forma contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal.

À minha amiga Jéssica, pela cumplicidade, presença e apoio em todos os momentos da minha vida... por ser alguém com quem sempre posso contar.

À Dani pela torcida e apoio de sempre.

Ao meu noivo Joubert por ser meu porto seguro, pela paciência e compreensão nas minhas ansiedades e ausências.

Ao meu irmão Rafael, pela torcida, carinho e apoio.

Ao meu irmão Daniel, por compartilhar sempre... parceiro nas maiores alegrias e apoio nas maiores tristezas, lutando sempre as mesmas batalhas comigo.

Aos meus pais, Sandra e Antonio - meus maiores incentivadores, pelo apoio incondicional, pelas orações constantes, pelas renúncias, por acreditarem mais em mim do que eu mesma, por serem as melhores pessoas que já conheci... pelo exemplo de vida que sempre representarão para mim. Eu amo vocês para sempre.

Gratidão a Deus por ter colocado pessoas e oportunidades maravilhosas no meu caminho. Por nunca me desamparar, por me mostrar a força que posso ter e me permitir ter saúde para superar e seguir em frente sempre.

*“Por vezes sentimos que aquilo
que fazemos não é senão uma
gota de água no mar. Mas o
mar seria menor se lhe
faltasse uma gota.”*

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

A hibridação é um processo relevante para ecologia, conservação e evolução das espécies, mas sua ocorrência natural e as consequências na biologia dos híbridos ainda são pouco estudadas. Além disso, embora seja um evento que frequentemente leva a alterações gonadais nos híbridos, a morfologia das gônadas desses animais e as vias celulares envolvidas nessas alterações tem sido pouco investigadas. Neste sentido, o primeiro objetivo deste trabalho foi testar a hipótese que as duas espécies de lambaris *A. fasciatus* e *A. paranae*, vivendo em simpatria na cabeceira do Rio Grande, são capazes de intercruzar no ambiente natural e gerar híbridos. Para isso, utilizamos uma abordagem multidisciplinar que envolveu métodos de análises morfométrica e merística dos peixes, estudo da biologia reprodutiva e morfologia gonadal, além de sequenciamento de fragmentos dos genes mitocondrial (COI) e nuclear (S7). A análise anatômica mostrou características intermediárias nos potenciais híbridos, enquanto as espécies parentais apresentaram caracteres exclusivos. O estudo da biologia reprodutiva e gametogênese mostrou que *A. fasciatus* e *A. paranae* apresentam sobreposição de período reprodutivo, similaridade na morfologia de gônadas e gametas, bem como nas estratégias reprodutivas. As análises genéticas suportaram a hipótese de hibridação, uma vez que mostraram a existência de duas espécies distintas e um grupo intermediário, com DNA mitocondrial das duas espécies, apesar de apresentarem um único morfótipo e DNA nuclear apresentando picos duplos (coincidentes com os das espécies *A. fasciatus* e *A. paranae*) no cromatograma do sequenciamento, indicando heterozigose. Em seguida, o objetivo foi explorar a morfologia gonadal dos híbridos e esta análise mostrou diversas alterações como ausência de espermátides e espermatozoides em machos e de ovócitos pré-vitelogênicos e vitelogênicos em fêmeas, vacuolização e degeneração de células germinativas, aumento de tecido intersticial e infiltrado inflamatório, perda da organização de células germinativas em cistos ou ninhos, dados que indicaram a infertilidade dos híbridos. Por fim, o último objetivo deste estudo foi testar a hipótese que autofagia, apoptose e proteínas de matriz extracelular estão envolvidas no processo de degeneração das células germinativas e remodelamento tecidual nas gônadas dos híbridos. Para isso, imunolocalizamos as proteínas Beclin1, CathepsinaD, Caspase3, Fibronectina e Colágeno tipo I. A quantificação de todas as proteínas analisadas mostrou que os híbridos exibem maior área gonadal marcada para estas moléculas em relação às espécies parentais. Esses resultados indicam que as alterações morfológicas nas gônadas

dos híbridos culminam em autofagia e degradação lisossomal dependente de CatepsinaD, seguidas de apoptose e remodelamento tecidual com fibrose.

Palavras-chave: hibridação, *Astyanax*, infertilidade, apoptose, autofagia, fibrose.

ABSTRACT

Hybridization is a relevant process for ecology, conservation and evolution of species, but its occurrence and consequences on the biology of hybrids are still poorly studied. In addition, although it is an event that frequently leads to gonadal changes in the hybrids, the morphology of their gonads and the cellular pathways involved in these changes have been poorly investigated. In this sense, the first aim of this study was to test the hypothesis that the two lambaris species *A. fasciatus* and *A. paranae*, living in sympatry at the headwaters of Grande river, are able to interbreed in the natural environment and generate hybrids. For this, we used a multidisciplinary approach that involved methods of morphometric and meristic analysis of fish, study of the reproductive biology and gonadal morphology, as well as sequencing of fragments of mitochondrial (COI) and nuclear (S7) genes. The anatomical analysis showed intermediate characteristics in the putative hybrids, while the parental species showed exclusive characters. The study of reproductive biology and gametogenesis showed that *A. fasciatus* and *A. paranae* present overlap of reproductive period, similarity in the morphology of gonads and gametes, as well as reproductive strategies. Genetic analyzes supported the hybridization hypothesis, since they showed the existence of two distinct species and an intermediate group, with mitochondrial DNA from both species, despite having a single morphotype and nuclear DNA with double peaks (coinciding with those of species *A. fasciatus* and *A. paranae*) in the sequence chromatogram, indicating heterozygosity. Then, the aim was to explore the gonadal morphology of the hybrids and this analysis showed several changes such as absence of spermatids and spermatozoa in males and previtellogenic and vitellogenic oocytes in females, vacuolization and degeneration of germ cells, increased interstitial tissue and inflammatory infiltrate, loss of the organization of germ cells in cysts or nests; all these data indicated the infertility of the hybrids. Finally, the last aim was to test the hypothesis that autophagy, apoptosis and extracellular matrix proteins are involved in the germ cell degeneration process and tissue remodeling in the gonads of hybrids. For this, we immunolocalized the proteins Beclin1, CathepsinD, Caspase3, Fibronectin and Collagen type I. The quantification of all analyzed proteins showed that gonads of hybrids exhibit a larger marked area for these molecules compared to the parental species. These results indicate that the morphological changes in the gonads of the infertile hybrids culminate in autophagy and catpsinD-mediated lisosomal degradation, followed by apoptosis and tissue remodeling with fibrosis.

Keywords: hybridization, *Astyanax*, infertility, apoptosis, autophagy, fibrosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Localização geográfica do Rio Grande e sua bacia hidrográfica. Adaptado de Melo et al. (2016).....	14
Figura 2: Analogia entre DNA <i>barcoding</i> e código de barras convencional. Reproduzido de Ortiz (2010).....	17
Figura 3: Modelo esquemático de autofagia e etapas de formação do autofagossomo. Adaptado de Kang et al. (2011).....	22

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	13
1.1 O Rio Grande.....	13
1.2 O gênero <i>Astyanax</i>	14
1.3 DNA <i>barcoding</i>	16
1.4 Hibridação.....	17
1.5 Reprodução e gametogênese de peixes.....	19
1.6 Autofagia.....	21
1.7 Apoptose.....	22
1.8 Matriz extracelular.....	23
2. OBJETIVOS.....	25
2.1 Objetivo geral.....	25
2.2 Objetivos específicos.....	25
3. RESULTADOS.....	26
3.1 CAPÍTULO I.....	26
Integrative approach detects natural hybridization of sympatric lambaris species and emergence of infertile hybrids (<i>artigo publicado na revista Scientific Reports em 2019</i>)	
3.2 CAPÍTULO II.....	45
Autofagia e apoptose durante degeneração e remodelamento gonadal de peixes híbridos (<i>artigo a ser submetido na revista Reproduction Fertility and Development</i>)	
4. DISCUSSÃO GERAL.....	71
5. CONCLUSÕES.....	76
6. REFERÊNCIAS.....	77
7. APÊNDICE: PRODUÇÃO CIENTÍFICA.....	89

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 O Rio Grande

O Rio Grande nasce no município de Bocaina de Minas - MG e apresenta 1.360 km de extensão total (IGAM, 2012), ocupando territórios de Minas Gerais e São Paulo, com área de drenagem de cerca de 143.000 km², sendo 60% em território mineiro (Santos, 2010). A cabeceira desse rio está localizada na região da Serra da Mantiqueira, próximo ao Parque Nacional do Itatiaia (unidade de conservação do bioma Mata Atlântica), possui mata ciliar preservada e pouca influência antrópica, sem registros de contaminantes na água em relatórios anuais do Instituto Mineiro de Gestão das Águas (IGAM). As cabeceiras dos rios são regiões vulneráveis aos impactos antrópicos e constituem locais de importância para a conservação de espécies de peixes e do curso do rio. De acordo com Maistro et al. (2000), o estudo de peixes de cabeceiras de rios é interessante de um ponto de vista evolutivo devido à ocorrência de um pequeno número de indivíduos isolados geograficamente.

A bacia do Rio Grande é uma das bacias hidrográficas com maior biodiversidade do estado de Minas Gerais (Drummond et al., 2005) e, mesmo assim, é responsável por 7,81% da capacidade de geração de energia elétrica instalada no Brasil (IPT, 2008). Estima-se que Minas Gerais abrange 15 bacias hidrográficas e abriga aproximadamente 354 espécies de teleósteos (Drummond et al., 2005), sendo pelo menos 114 registradas na bacia do Rio Grande (Paiva et al., 2002; Santos, 2010). Devido ao seu grande potencial energético, mesmo apresentando rica biodiversidade e, portanto, importância para conservação, o Rio Grande é o rio mais represado no Brasil (Andrade e Braga, 2005). Esse rio apresenta 12 usinas hidrelétricas instaladas ao longo de sua extensão, assumindo assim um papel estratégico na geração de energia elétrica nacional (Borges & Abjaudi, 2016). Essas hidrelétricas formam um sistema em cascata, perfazendo juntas uma área submersa de 3.511 km² (Santos e Formagio, 2000) e, assim, configurando um cenário de grandes impactos ao longo da extensão do Rio Grande.

permanece ainda carente de estudos, especialmente de caráter comparativo e filogenético (Martins et al., 2012). A identificação das espécies do gênero *Astyanax* tem sido historicamente dificultada pela ampla similaridade morfológica compartilhada pelos animais e atualmente este gênero está inserido no grupo *Insertae Sedis*, que inclui 88 gêneros da família Characidae com biologia e taxonomia pouco compreendidas, sendo possivelmente um grupo polifilético (Lima et al., 2003). Os lambaris *A. paranae* e *A. fasciatus* podem ser encontrados em simpatria na bacia do Rio Grande, isto é, coabitando uma mesma área em algumas regiões, incluindo a cabeceira desse rio.

A espécie *Astyanax scabripinnis* (Jenyns, 1842) apresenta pequeno porte e normalmente habita pequenos corpos d'água (Britski, 1972). Diferenciações morfológicas notadas dentro dessa espécie culminaram na definição de algumas subespécies como *A. scabripinnis scabripinnis* (Jenyns, 1842) e *A. scabripinnis paranae* (Eigenmann, 1927). Moreira-Filho e Bertolo (1991) estudaram sete populações de *A. scabripinnis* nas bacias de três diferentes rios e observaram uma grande diversidade morfológica e cariotípica nessa espécie, sugerindo assim o termo “complexo *scabripinnis*” para designar essas populações e relacionando a diversidade desses peixes ao isolamento de microbacias dos sistemas hidrográficos. *Astyanax scabripinnis paranae* é encontrado comumente na bacia do alto rio Paraná, tipicamente em regiões de cabeceiras (Britski, 1972; Garutti e Britski, 2000; Veregue e Orsi, 2003), onde essa espécie possui numerosas populações isoladas entre si (Garutti e Britski, 2000). Uma vez que existe uma tendência de se elevar as subespécies ao nível de espécie, *A. scabripinnis paranae* passou a ser classificada taxonomicamente como *A. paranae*, assim como sugerido na classificação de Graça e Pavanelli (2007).

Da mesma forma que a espécie *A. scabripinnis*, alguns autores sugerem que *A. fasciatus* (Cuvier, 1819) também representa um complexo de espécies (Garutti e Britski, 2000; Melo, 2001; Pazza et al., 2006; Pazza et al., 2008). Análises citogenéticas indicam que as populações desse complexo que habitam a bacia do alto rio Paraná pertencem a um grupo diverso de peixes que atualmente integram esse mesmo taxa (Pazza et al., 2006). *Astyanax fasciatus* é comum em vários ecossistemas brasileiros e parece se adaptar bem ao ambiente lêntico criado pelo barramento de rios, sendo abundante em reservatórios (Schulz e Martins-Júnior, 2001; Carvalho et al., 2009; Prado et al., 2011). Além disso, devido a sua ampla distribuição, tanto em águas limpas quanto em poluídas, seu pequeno tamanho, hábito alimentar onívoro e uma estratégia reprodutiva com múltiplas desovas durante o ano, *A. fasciatus* tem sido indicado como espécie sentinela

para investigações ambientais e ensaios de exposição ambiental em diversos estudos (Schulz e Martins-Júnior, 2001; Alberto et al., 2005; Carrasco-Letelier et al., 2006; Prado et al., 2011; Prado et al., 2014).

1.3 DNA *barcoding*

Proposto por Hebert et al. (2003), o DNA *barcoding* consiste em um método padronizado de identificação molecular das espécies e em animais baseia-se no sequenciamento de um fragmento de aproximadamente 650 pares de bases na extremidade 5' do gene mitocondrial COI. Este gene codifica parte de uma enzima terminal da cadeia respiratória da mitocôndria que é denominada citocromo oxidase (subunidade I). O nome desse método é uma analogia ao sistema de identificação de produtos por código de barras (Figura 1). Dessa forma, assim como um produto é reconhecido por sua combinação única de código de barras, uma espécie pode ser identificada por sua combinação única e exclusiva de nucleotídeos no fragmento do gene COI (Hebert et al., 2003). Uma característica do DNA mitocondrial é que ele apresenta conteúdo e número de genes relativamente constante entre os animais, o que garante a ortologia, isto é, a descendência comum desses genes, permitindo que seja obtida uma estimativa mais precisa da divergência entre eles (Russo et al., 2004). O gene COI apresenta baixa taxa de recombinação e ausência de íntrons; possui *primers* universais bem estabelecidos para a maioria dos filos animais; exhibe melhor potencial de sinal filogenético, com taxas de mutação maiores quando comparadas às taxas de genes como 12S e 16S rDNA e citocromo b (Hebert et al., 2003), características que justificaram a escolha do gene COI para o método de identificação molecular das espécies. Além disso, foi observado que esse gene apresenta uma alta variabilidade interespecífica, enquanto sua variabilidade intraespecífica é reduzida – *barcode gap* (Hebert et al., 2003; Hebert et al., 2004). Assim, o método de DNA *barcoding* explora a diversidade entre as sequências de DNA e considera que estas, através de mutações, tendem a se tornar únicas e exclusivas durante a história evolutiva das espécies (Hebert et al., 2003).

DNA *barcoding* – sequência das bases nitrogenadas

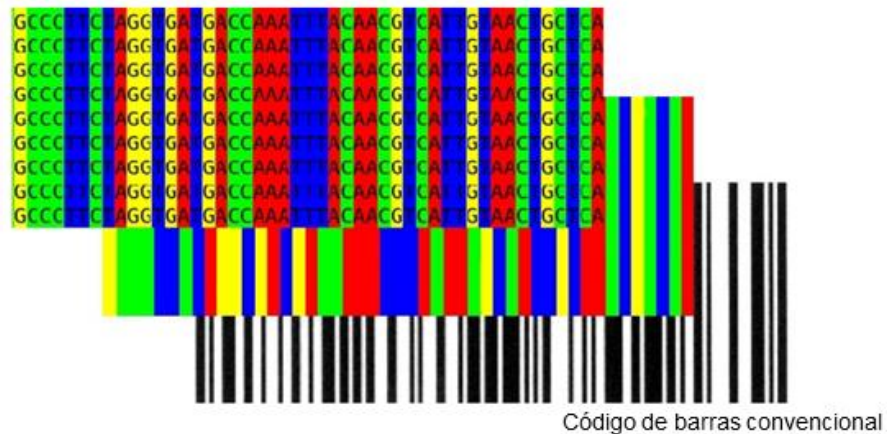


Figura 2: Analogia entre DNA *barcoding* e código de barras convencional. Reproduzido de Ortiz, (2010).

1.4 Híbridação

A hibridação consiste no cruzamento de grupos ou indivíduos que diferem geneticamente, incluindo cruzamentos entre linhagens de uma mesma espécie – intraespecífica, ou entre indivíduos de espécies distintas - interespecífica (Bartley et al., 2001). Em geral, o processo de hibridação é mais frequente em peixes do que nos demais vertebrados possivelmente devido ao fato de peixes apresentarem características ecofisiológicas favoráveis a esse processo como fertilização externa, competição por territórios de desova, fracos mecanismos de isolamento reprodutivo, abundância desigual dos parentais, susceptibilidade para contato entre indivíduos que divergiram recentemente, bem como convivência em ambientes limitados (Hubbs, 1955; Allendorf & Waples, 1996; Scribner et al., 2001).

A hibridação pode ocorrer de maneira natural no ambiente ou ser induzida artificialmente para produzir indivíduos com melhor desempenho (vigor híbrido) para piscicultura do que as espécies parentais (Bartley et al., 2001). Além disso, como alternativa para a otimização da produção de peixes, a obtenção de indivíduos híbridos inférteis para utilização como hospedeiro no transplante de células germinativas de espécies de interesse comercial (quimerismo) tem sido realizada (Piva et al., 2018). Híbridos interespecíficos geralmente apresentam características morfológicas intermediárias em relação às suas espécies parentais (Hubbs, 1955) e, historicamente, foram identificados por métodos morfológicos de detecção (Scribner et al., 2001). Entretanto, com o avanço das técnicas moleculares, a identificação de híbridos passou a

ser baseada principalmente na análise de polimorfismo genético diretamente ao nível de DNA, com base na detecção da variabilidade de regiões do genoma nuclear e mitocondrial (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Neste contexto, ferramentas como sequenciamento de DNA e genotipagem assumiram grande importância na detecção de indivíduos híbridos (Prado et al., 2012; Carvalho et al., 2013; Burcea, et al., 2014; Hashimoto et al., 2014). O DNA mitocondrial, por apresentar herança materna, pode ser utilizado para o aperfeiçoamento dos estudos de hibridação, uma vez que possibilita a identificação do parental materno (Prado et al., 2012). Porém, a utilização apenas de marcadores mitocondriais nem sempre é capaz de identificar híbridos interespecíficos devido ao seu modo de herança uniparental, sendo necessária assim a sua aplicação em conjunto com marcadores nucleares (Scribner et al., 2001).

A hibridação natural está também relacionada à evolução das espécies, uma vez que a transferência de DNA de uma espécie para o conjunto genômico de outra espécie por retrocruzamentos repetidos entre híbridos e espécies parentais (hibridação introgressiva), pode constituir uma considerável fonte de variabilidade genética nas populações (Arnold e Martin, 2009). Neste sentido, estudo recente sugere a hibridação como ferramenta para conservação de espécies (Chan et al., 2019), apesar de ser um ponto controverso entre autores (Allendorf et al., 2001). Embora a hibridação natural seja aparentemente mais comum em animais do que se imaginava, ainda não está claro como sua ocorrência é difundida e se, de fato, alguns grupos zoológicos ou regiões biogeográficas podem ser mais propensos a promover tal processo (Trigo et al., 2008).

A hibridação interespecífica geralmente é facilitada pela proximidade filogenética entre as espécies envolvidas, uma vez que elas tendem a apresentar menor divergência genética e número diploide de cromossomos ou tamanho do genoma parecidos (Bassin, et al., 2011; Peres et al., 2012). Apesar disso, muitas vezes o cruzamento entre diferentes espécies leva à formação de indivíduos contendo cromossomos extras, que não possuem pares homólogos e, portanto, não permitem uma divisão celular meiótica normal no momento da formação dos gametas (Bartley et al., 2001). Dessa forma, muitos híbridos apresentam alterações morfológicas gonadais e esterilidade. Em mamíferos, a falha no pareamento entre cromossomos homólogos seguida de interrupção meiótica de cromatina não sincronizada tem sido proposta como responsável por apoptose de células germinativas e esterilidade (Torgasheva e Borodin, 2016). Híbridos de peixes ciclídeos, por exemplo, apresentaram aumento de tecido intersticial, células em degeneração contendo lisossomos grandes e núcleos apoptóticos (Fishelson, 2003). Em indivíduos triploides, sabe-se que

durante a meiose todos os três homólogos se alinham lado a lado, mas apenas dois cromossomos se envolvem na sinapse (Roeder, 1997), o que pode culminar em interrupção da meiose (Blanco et al., 2001). Entretanto, apesar de apresentarem cariótipo com a mesma quantidade de cromossomos das espécies parentais, híbridos de medaka apresentaram espermatozoides com diversas alterações como aumento de diâmetro, variação na espessura do flagelo e microtúbulos do flagelo com padrão diferente da estrutura normal 9+2 (Shimizu et al., 1997). Dessa forma, nesse estudo, quando híbridos de ambos os sexos foram cultivados juntos, fêmeas foram capazes de realizar desova, mas os ovos não se desenvolveram e machos não produziram espermatozoides funcionais (Shimizu et al., 1997). Assim, alguns peixes híbridos possuem gônadas com tamanho e estrutura normais, mas seus gametas apresentam anormalidades morfológicas e/ou cariotípicas, ou são inviáveis (Hooe et al., 1994; Shimizu et al., 1997). Neste sentido, apesar de provavelmente serem causadas pela combinação de alelos divergentes e interações epistáticas entre os genes, a natureza e complexidade das incompatibilidades dos híbridos são ainda pouco compreendidas (Yoshikawa et al., 2018). Em conjunto, esses dados mostram que o processo de hibridação pode ser mais complexo do que descrito na literatura e as vias celulares e moleculares envolvidas nas alterações gonadais dos híbridos ainda precisam ser melhor elucidadas.

1.5 Reprodução e gametogênese de peixes

A gametogênese é um processo fisiológico altamente regulado, dependente de interações celulares e moleculares perfeitamente ordenadas, sendo controlada por fatores hormonais (eixo hipotálamo-hipófise-gônada) e ambientais em peixes (Nagahama, 1994). Sob influência de estímulos ambientais, como temperatura e fotoperíodo, o hipotálamo libera hormônios liberadores de gonadotrofinas (GnRH), os quais atuam na adenohipófise promovendo a secreção de hormônios gonadotróficos (FSH e LH). Estes hormônios se ligam aos seus respectivos receptores gonadais, acarretando na síntese e secreção de esteroides sexuais, que promovem os eventos mitóticos e meióticos envolvidos na gametogênese (Waal et al., 2009; Yaron e Levavi-Sivan, 2011). Os eventos mitóticos estão principalmente relacionados à proliferação celular de ovogônias e espermatogônias localizadas no epitélio germinativo, que garantem o estoque dessas células nas gônadas dos peixes, conseqüentemente permitindo a produção contínua de gametas ao longo de toda a vida desses animais (Jalabert, 2005; Waal et al., 2009).

Os eventos meióticos culminam na produção dos ovócitos vitelogênicos e espermatozoides a partir de ovogônias e espermatogônias, possibilitando a ocorrência da reprodução. Durante a gametogênese, a partir da proliferação por múltiplas divisões mitóticas, ovogônias e espermatogônias se encontram rodeadas por cada vez maior quantidade de células pré-foliculares e células de Sertoli, respectivamente, formando cistos (Nakamura et al., 2010; Schulz, 2010; Quagio-Grassiotto et al., 2011). Dentro dos cistos, ovogônias e espermatogônias, entram em meiose, dando origem a ovócitos ou espermatócitos, respectivamente, que permanecem unidos por pontes citoplasmáticas, apresentando desenvolvimento sincrônico (Quagio-Grassiotto et al., 2011). Nas fêmeas, a meiose prossegue até a fase de diplóteno tardio, na prófase I, quando os ovócitos são individualizados por células envoltórias pré-foliculares e então ocorre parada da meiose; enquanto em machos a conclusão da meiose ocorre dentro dos cistos na maioria das espécies de teleósteos (Quagio-Grassiotto et al., 2011). Ao contrário da espermatogênese, na qual não há parada no processo meiótico, na ovogênese, os ovócitos permanecem na fase de diplóteno até o momento da maturação ovocitária. Dessa forma, a ovogênese é normalmente dividida em três fases: 1) crescimento primário, quando ocorre a divisão das ovogônias e diferenciação em ovócitos perinucleolares, de forma independente da ação de gonadotrofinas; 2) crescimento secundário, consiste na formação de alvéolos corticais nos ovócitos pré-vitelogênicos e na incorporação de vitelo nos folículos vitelogênicos, sendo uma fase dependente de gonadotrofinas; 3) maturação ovocitária ou maturação final, quando ocorre a retomada da meiose, permitindo o desenvolvimento final do ovócito, que se torna apto à fertilização (Grier *et al.*, 2007; Quagio-Grassiotto *et al.*, 2011).

Durante a meiose, a segregação cromossômica é precedida pela recombinação gênica, na qual fragmentos de DNA são trocados entre pares de cromossomos homólogos, os quais são separados após a primeira divisão meiótica (Whitaker, 1996). Além de contribuir para a diversidade genética, o pareamento dos cromossomos homólogos por meio de *crossing over* garante a segregação correta dos cromossomos (Ferguson et al., 2007). Em mamíferos, cromossomos que faltam um local de recombinação podem ser removidos do *pool* meiótico devido à ativação de um ponto de verificação no paquíteno, causando infertilidade; ou podem sofrer segregação anormal dos homólogos na meiose I uma vez que não há *crossing over* para mantê-los juntos na placa metafásica, causando aneuploidia (Martin, 2006). Em geral, defeitos na divisão meiótica, que frequentemente são decorrentes de anormalidades cromossômicas e/ou segregação incorreta dos cromossomos, culminam na interrupção da meiose ou aumento da frequência de gametas

aneuploides, gerando infertilidade (Roeder, 1997; Vendrell et al., 1999; Egozcue et al., 2005; Ma et al., 2006; Martin, 2006; Ferguson et al., 2007).

1.6 Autofagia

A autofagia é um processo celular catabólico induzido que fornece a energia necessária para sustentar as mudanças no metabolismo, sendo caracterizado pelo sequestro partes do citoplasma e organelas dentro de vacúolos (autofagossomos) que são entregues aos lisossomos para degradação em massa e ocorre em resposta ao estresse ou dano da célula, como inanição, estresse oxidativo, privação de nutrientes, senescência de organelas e retirada de fatores de crescimento (Maiuri et al., 2007; Moreau et al., 2010; Morais et al., 2012). A autofagia é um processo regulado geneticamente e altamente conservado de leveduras até seres humanos, que contribui para o desenvolvimento, diferenciação e manutenção da homeostase dos tecidos, garantindo a sobrevivência da célula ou desencadeando o processo de morte celular (Cao e Klionsky, 2007; Kourtis e Tavernakis, 2009; Kang et al., 2000; Ryter et al., 2013, 2014; Agnello & Chiarelli, 2016).

De maneira geral, o termo autofagia se refere à digestão lisossomal de componentes citoplasmáticos e, portanto, são definidos três tipos de autofagia, de acordo com sua função fisiológica e o modo de entrega da carga a ser degradada ao lisossomo: 1) microautofagia; 2) autofagia mediada por chaperonas e 3) macroautofagia. A microautofagia é caracterizada pela incorporação de componentes citoplasmáticos diretamente em lisossomos através de invaginações da membrana lisossomal, de forma seletiva ou não seletiva (Mizushima e Komatsu, 2011). A autofagia mediada por chaperonas ocorre quando proteínas citoplasmáticas são marcadas para degradação com uma sequência específica de aminoácidos, ligando-se a chaperonas, como Hsp73, e sendo então transferidas para os lisossomos através da interação dessas proteínas com receptor da membrana lisossomal LAMP-2 (Alerting, 2007). A macroautofagia, que nesta tese será referida apenas como autofagia, é a via de degradação lisossomal mais comumente mencionada na literatura. Esta via é caracterizada pela presença de estruturas com dupla membrana denominadas autofagossomos, que englobam e isolam componentes citoplasmáticos (inclusive organelas) para degradação (Gómez-Sintes *et al.*, 2016). Assim, a autofagia começa com a formação do fagóforo, uma estrutura com dupla membrana que se expande formando o autofagossomo contendo componentes do citoplasma no seu interior e, finalmente, ocorre a fusão do autofagossomo com o lisossomo, formando o autolisossomo para degradação do conteúdo e membrana interna

por hidrolases ácidas (He e Klionsky, 2009). Beclin1 é a proteína responsável por promover a formação dos autofagossomos por meio da nucleação autofágica (Figura 2) e recrutamento de proteínas citosólicas necessárias a esse processo (Kang et al, 2011), sendo, portanto, uma proteína-chave da via autofágica e, conseqüentemente um bom marcador desta via.

O processo autofágico é dependente da maquinaria lisossomal, incluindo a ação da CatepsinaD, que é uma enzima hidrolítica dos lisossomos, atuando na degradação dos componentes intracelulares presentes no autofagossomo (Yue et al. 2003; Kourtis e Tavernarakis 2009). Além deste papel na autofagia, a CatepsinaD pode influenciar o processo de morte celular, por meio da degradação de proteínas anti-apoptóticas e permeabilização da membrana mitocondrial quando esta hidrolase ácida é liberada no citosol (Gómez-Sintes et al. 2016).

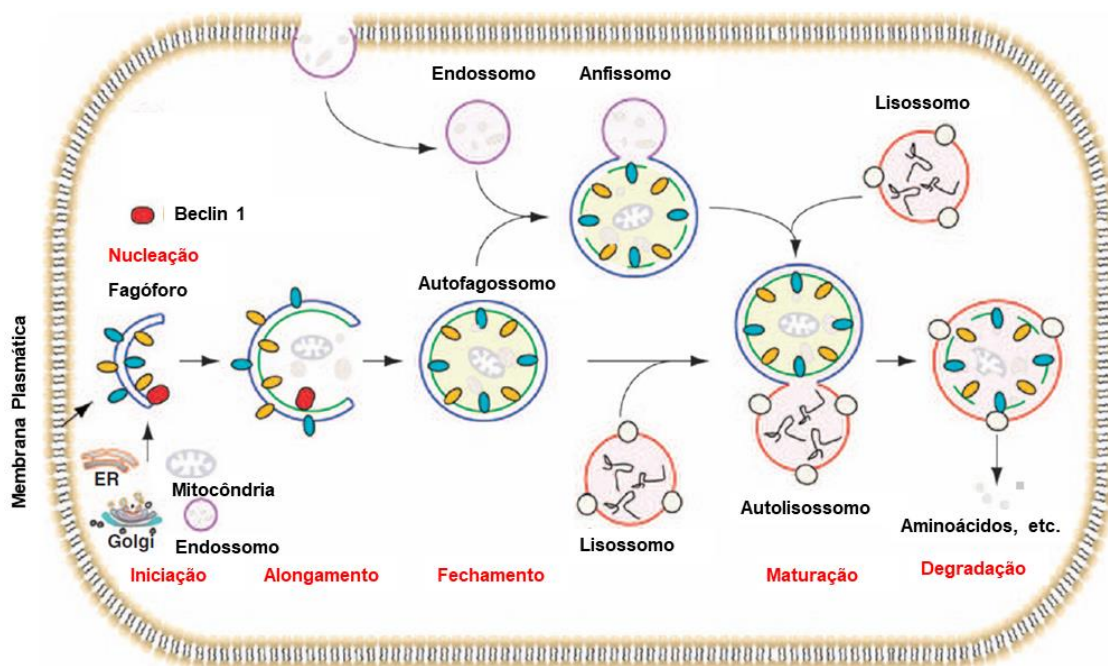


Figura 3: Modelo esquemático de autofagia e etapas de formação do autofagossomo. Adaptado de Kang et al. (2011).

1.7 Apoptose

A apoptose é um processo fisiológico regulado geneticamente e altamente conservado durante a evolução que elimina células desnecessárias ou danificadas durante o desenvolvimento, garantindo a homeostase do tecido e manutenção do número apropriado de células em organismos multicelulares (Kerr et al., 1972; Jenkins et al.,

2013). Ao longo do processo apoptótico ocorre fragmentação do DNA nucleossomal, formando corpos apoptóticos, perda de junções de adesão com outras células e com a matriz extracelular; condensação da cromatina na periferia do envoltório nuclear e retração celular (Bangs et al., 2000). Os corpos apoptóticos são posteriormente endocitados por fagócitos ou células vizinhas, sem a ativação de uma resposta inflamatória (Wyllie et al., 1980; Bangs et al., 2000). Todo o processo apoptótico é realizado com ação bem regulada e coordenada de proteases e nucleases para manutenção da integridade da membrana plasmática (Morais et al., 2016), desta forma não permitindo o extravasamento de conteúdo citoplasmático e reação inflamatória.

A apoptose é considerada o principal mecanismo de morte celular programada e depende da ação de proteínas iniciadoras e efetoras conhecidas como caspases (Djavaheri-Mergny et al., 2010; Galluzzi et al., 2018). As caspases efetoras ativam endonucleases dependentes de íons Ca^{2+} e Mg^{2+} que clivam o DNA em fragmentos de 180-200 pares de bases nucleotídicas (Huettenbrenner et al., 2003). A Caspase3 é considerada a principal efetora do processo apoptótico, sendo responsável pela clivagem de várias estruturas citoplasmáticas, culminando nas mudanças morfológicas observadas nesse processo de morte celular (Kerr et al., 1972; Brentnall et al., 2013).

O processo apoptótico está envolvido no remodelamento, diferenciação e degeneração em vários tipos celulares (Janz et al., 1997). Em peixes, a apoptose tem sido relatada em gônadas como resposta a diferentes tipos de fatores estressores (Kaptaner and Ünal 2011; Thomé et al., 2012; Marcon et al. 2017; Cruz Vieira et al. 2019; Sales et al. 2020; Qiang e Cheng 2021) e foi também observada em gônadas morfológicamente alteradas de híbridos (Fishelson 2003), mostrando a importância da apoptose na dinâmica reprodutiva de peixes.

A apoptose também está relacionada com o equilíbrio das interações entre célula e matriz extracelular, uma vez que uma modificação desse tipo de interação, como o desprendimento da célula de sua matriz, pode levar ao processo de ativação da apoptose (Frisch e Francis, 1994; Pinkse et al., 2004).

1.8 Matriz extracelular

Em organismos multicelulares, as células sofrem influência do microambiente no qual se inserem por meio de interações com células vizinhas e com a matriz extracelular que as circundam (Pinkse et al., 2004). As interações entre células e matriz extracelular exercem efeitos em diversos processos, como regulação gênica, formação da estrutura do

citoesqueleto, bem como diferenciação, crescimento e morte celular (Frisch e Francis, 1994). Neste sentido, quando uma célula se desprende de sua matriz extracelular, ocorre a desfosforilação da quinase de adesão focal, o que culmina na ativação do efeito cascata das caspases, induzindo a apoptose (Frisch e Francis, 1994; Pinkse et al., 2004).

Proteínas de matriz extracelular são especialmente importantes nos processos de remodelamento tecidual de ovários de peixes, ao longo da maturação gonadal e desova (Thomé et al. 2010). Similar ao processo degenerativo de atresia folicular, o tecido gonadal de híbridos pode passar por involução e remodelamento como consequência da infertilidade (Pinheiro et al. 2019). O equilíbrio entre regeneração e degradação da matriz extracelular em processos de remodelamento ocorre, em parte, pela ação de enzimas proteolíticas como as metaloproteinases da matriz (MMPs), que são secretadas para o meio extracelular por células locais (Thomé et al. 2010).

De maneira geral, o Colágeno é a principal proteína encontrada na matriz extracelular e em mamíferos, o Colágeno tipo I é a proteína mais abundante do corpo dos animais (Fratzl, 2008). A Fibronectina (FN) é uma proteína de matriz extracelular importante nos processos de adesão, migração, crescimento e diferenciação celular (Rodgers *et al.* 2003). Além disso, a FN está relacionada à deposição de colágeno, provavelmente servindo de estrutura para o agrupamento das fibrilas, uma vez que em alguns sistemas essa proteína é necessária para a formação das fibrilas de colágeno (Sottile and Hocking 2002). Nesse sentido, alguns estudos têm demonstrado que o bloqueio da polimerização da fibronectina pode levar à melhora em quadros de fibrose em diferentes órgãos (Altrock *et al.* 2015; Valiente-Alandi *et al.* 2018). A fibrose é causada pela deposição excessiva de componentes da matriz extracelular, especialmente fibrilas colágenas, em resposta a injúrias nos tecidos, causando substituição do parênquima normal por tecido conjuntivo (Wynn 2008).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a ocorrência de hibridação natural entre as espécies de lambaris *Astyanax fasciatus* e *A. paranae* na cabeceira do Rio Grande e suas consequências na gametogênese e dinâmica gonadal dos híbridos.


2.2 Objetivos específicos

- Analisar dados anatômicos morfométricos e merísticos dos lambaris;
- Analisar comparativamente a biologia reprodutiva e morfologia gonadal das espécies *A. fasciatus* e *A. paranae* (estádios de maturação, quantificação da gametogênese, diâmetro de células germinativas, índices biológicos);
- Sequenciar fragmentos dos genes mitocondrial COI e nuclear S7;
- Explorar a morfologia gonadal dos híbridos (microscopia de luz e eletrônica), analisando características das células germinativas e do tecido intersticial;
- Detectar e quantificar as alterações gonadais dos híbridos;
- Imunolocalizar as proteínas Beclin1, CatepsinaD, Caspase3, Fibronectina e Colágeno tipo I por imunofluorescência;
- Quantificar as marcações positivas das imunofluorescências;
- Relacionar as marcações positivas e as vias autofágica, lisossomal e apoptótica com as alterações gonadais dos híbridos;
- Relacionar as marcações positivas de Fibronectina e Colágeno tipo I com a dinâmica do tecido intersticial dos híbridos.

3. RESULTADOS

3.1 CAPÍTULO I: Integrative approach detects natural hybridization of sympatric lambaris species and emergence of infertile hybrids (*artigo publicado na revista Scientific Reports em 2019*)

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

Integrative approach detects natural hybridization of sympatric lambaris species and emergence of infertile hybrids

Ana Paula Barbosa Pinheiro¹, Rafael Magno Costa Melo¹, Daniel Fonseca Teixeira², José Luís Olivan Birindelli³, Daniel Cardoso Carvalho² & Elizete Rizzo¹

Despite its relevance for ecology, evolution and conservation of species, natural hybridization and hybrids biology are still poorly studied in freshwater fish. Here, we tested the hypothesis that sympatric species *Astyanax paranae* and *A. fasciatus* are able to interbreed in the natural environment and presented evidence for the first record of hybridization between these species. We analyzed anatomical traits, gametogenesis, reproductive biology, and genetic variations of the COI and S7 genes of both species and putative hybrids. Intermediate morphometric and meristic features were observed in hybrids when compared to *A. paranae* and *A. fasciatus*. Overlap in reproductive season was showed for these species, with greater reproductive activity from August to January, but hybrids did not present any sign of gonadal maturation. Oogonia and perinuclear follicles as well as spermatogonia and primary spermatocytes were found in hybrids, but previtellogenic and vitellogenic follicles, spermatids, and spermatozoa were absent. Moreover, several alterations in gametogenesis were detected, such as interrupted meiosis in both males and females, vacuolated and degenerated germ cells, increased interstitial tissue, and presence of immune cells. Molecular analyses supported the hypothesis of hybridization between *A. paranae* and *A. fasciatus*. Overall, our multidisciplinary approach also provides strong evidence that hybrids are infertile.

Hybridization consists of the crossing of groups or individuals that differ genetically, including crosses between lineages of the same species - intraspecific or between individuals of different species - interspecific¹. In general, the hybridization is considered more common in plants than animals² but is more frequent in fish than in other vertebrates³. In freshwater fish, hybridization is favored by ecophysiological attributes, such as external fertilization, competition for spawning territories, poor mechanisms of reproductive isolation, unequal abundance of the parental species, susceptibility to contact between individuals who have recently diverged, as well as cohabitation in limited environments³⁻⁵.

Although natural hybridization is an event considered rare historically, it is relatively common, especially in groups such as fish and amphibians^{3,6}. Natural hybridization is also related to the evolution of species, since the transfer of DNA from one species to the genomic set of another species by repeated backcrossing between hybrids and parental species (introgressive hybridization) may constitute a considerable source of genetic variability in populations⁷. It is estimated that at least 10% of the animal species can undergo natural interspecific hybridization⁸.

In general, interspecific hybrids have intermediate morphological characteristics compared to parental species³ and have historically been identified by morphometric and meristic analyses⁴. With the advancement of molecular biology techniques, identification of hybrids has been based on detection of genetic polymorphism in regions of the nuclear and mitochondrial DNA⁹⁻¹¹. In this context, DNA barcoding using the COI gene has been

¹Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, C. P. 486, 31270-901, Minas Gerais, Brazil. ²Programa de Pós-graduação em Biologia de Vertebrados, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, PUC Minas, Belo Horizonte, 30535-610, Minas Gerais, Brazil. ³Departamento de Biologia Animal e Vegetal, Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, C. P. 10.011, 86057-970, Paraná, Brazil. Correspondence and requests for materials should be addressed to E.R. (email: ictio@icb.ufmg.br)

widely used in molecular taxonomy for fish identification^{12,13} and may be also an auxiliary tool for the identification of hybrids as well as other mitochondrial genes^{4,14–16}. In addition, the S7 ribosomal protein gene has been successfully used in order to confirm the parental contributions in hybridization studies^{17,18}.

Interspecific hybridization is generally facilitated by phylogenetic proximity between the species, since they tend to have less genetic divergence and a similar diploid chromosome number or genome size^{19,20}. However, cross-breeding often leads to the formation of individuals containing extra chromosomes, which do not have homologous pairs and, then, do not allow normal meiotic cell division at the time of gamete formation¹. Therefore, many hybrids may present gonadal alterations and sterility, characteristics rarely investigated in hybridization studies.

The *Astyanax* genus of the family Characidae is one of the most diverse freshwater taxa of the Neotropical ichthyofauna²¹. These fish are popularly known as lambaris and are geographically distributed from Argentina to the border region between Mexico and the United States²². *Astyanax paranae* Eigenmann, 1914 is typically a headwaters species, while *A. fasciatus* (Cuvier, 1819) is a more generalist species and can be found in a wide range of aquatic systems, including lentic and lotic environments^{23,24}. *Astyanax* species usually present a long reproductive period with multiple spawning, external fertilization, and absence of parental care^{24–26}. Although they are small fish, the lambaris have ecological and commercial importance, since they are forage species for several predators²⁷ and are caught in professional and artisanal fishing, possibly constituting protein source for riverine populations²⁴. In addition, *Astyanax* species have been indicated as sentinels for environmental investigations of pollutants^{28,29}.

Due to their morphofunctional plasticity, lambaris have a wide geographic distribution, and it is common to find different species coexisting in sympatry in some habitats. Sympatry may lead to ecological and reproductive niche overlapping, eventually favoring interbreeding between related species¹⁹. Considering the phylogenetic proximity and morphophysiological similarities found among fish from the genus *Astyanax*, it is possible that the overlap of niches culminates in occasional cross-fertilization of the gametes, in a process of hybridization. In this regard, evidence of interbreeding between populations of *Astyanax bimaculatus* from Paraná and São Francisco River basins after deviation of a tributary was reported²⁰.

Recent studies on hybridization of freshwater fish species are mainly based on cytogenetic and molecular approaches, with identification of hybrids resulting from artificial crossing in aquaculture, introduction of species, and damage to habitats^{9,11,16,20,30}. The aim of this study was to test, using a multi-disciplinary approach, the hypothesis that the sympatric species *Astyanax paranae* and *A. fasciatus* are able to interbreed in the natural environment. We analyzed anatomical traits, gametogenesis, reproductive biology, and genetic variations of COI and S7 genes of both species and its putative hybrids.

Methods

Study area and fish sampling. The study was performed in an area of waterfall (22°13'7.04"S 44°32'23.14"W) at the headwaters of the Grande River, southeastern Brazil. The area is close to Itatiaia National Park, an important conservation unit of the Atlantic Forest biome, which has little anthropic influence and preserved ciliary forest.

Quarterly samplings during a reproductive cycle were carried out. A total of 494 lambaris specimens were collected using gillnets (0.8, 1.3, and 1.5 cm between opposing knots). The specimens presented three different morphotypes: the species *A. paranae* (n = 239; MZUEL18646) and *A. fasciatus* (n = 212; MZUEL18645) and the morphotype *Astyanax* sp. – putative hybrids (n = 43; MZUEL18647), which exhibited anatomical features of both *A. paranae* and *A. fasciatus*. The fish were identified according to Graça and Pavanelli³¹ and deposited at the Museum of Zoology of the State University of Londrina (MZUEL). During fish collection, physicochemical parameters of the water were obtained in each period using a Horiba U-51 multiparameter probe.

In the field, fish caught alive were euthanized by immersion in eugenol 85 mg/L, and then the biometric data of each specimen were obtained. All the indicated procedures followed the principles established by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA). The study was approved by the State Forestry Institute (IEF - fishing license no. 153) and the Ethics Committee on Animal Use of the Federal University of Minas Gerais, Brazil (CEUA-UFGM, protocol no. 92).

Morphometric and meristic analyses. A total of 21 specimens were examined, seven each of *A. paranae*, *A. fasciatus*, and putative hybrids. All specimens were collected and preserved together. Counts and measurements followed Fink and Weitzman³², except for longitudinal scale rows above lateral line, counted from the middorsal scale row to lateral line, not including the scale of the middorsal row immediately anterior to dorsal-fin origin or the small scale on dorsal-fin base; and scale rows below lateral line, counted from lateral line to pelvic-fin origin, the half scale was only counted when the scale immediately anterior to pelvic-fin origin had at least half height above pelvic-fin insertion. Pored scales of lateral line included pored scales on base of caudal-fin rays. Differences in body shape among samples were determined by analyzing the morphological traits through principal component analysis (PCA) using PAST software^{33,34}. Data were log transformed prior to analysis.

Biological indexes and fecundity. Total length (TL), body weight (BW), and gonads weight (GW) were obtained using a caliper with accuracy of 0.01 cm and an analytical balance, accurate to 0.01 g. These biometric data were used to calculate the biological indices: gonadosomatic (GSI = 100 GW/BW) and Fulton condition factor (K = 100 BW/TL³). The stages of gonadal maturation were determined based on macroscopic and microscopic characteristics of the gonads and GSI variations²⁸: 1, resting; 2/3, ripening/ripe and 4, spawning.

To estimate fecundity, samples from the middle region of mature ovaries were collected during the reproductive season peak (January). The samples (n = 20 *A. paranae* and 20 *A. fasciatus*) were weighed and fixed in Gilson's fluid (100 ml 60% of ethyl alcohol, 880 ml of distilled water, 15 ml of 80% nitric acid, 18 ml of glacial acetic

acid and 20 g of mercuric chloride). The dissociated vitellogenic oocytes were separated and counted under a stereoscopic microscope. The number of oocytes per gram of ovary was determined and used to calculate batch fecundity based on total ovary weight. Relative fecundity was estimated from the number of vitellogenic oocytes in the ovaries per unit of gonadal weight (GW).

Light and transmission electron microscopy. For histological analyses of gametogenesis and gonadal maturation, samples from the middle region of the gonads of each fish were fixed in Bouin's fluid (75 ml of saturated picric acid solution 1.3% in water, 25 ml of formalin and 5 ml of glacial acetic acid). Gonad samples were dehydrated in crescent concentrations of ethanol (70, 80, 95 and 100%), embedded in paraffin, sectioned at 5 μ m thickness, and stained with hematoxylin-eosin (HE) and Gomori trichrome.

For ultrastructure analysis of the germ cells of putative hybrids, samples of the gonads were fixed in modified Karnovsky's solution (2.5% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde). At the Microscopy Center of the Federal University of Minas Gerais, the samples were submitted to secondary fixation in 2% osmium tetroxide and were incubated in sucrose solution with 4% uranyl acetate overnight. Then, they were dehydrated in ethanol and embedded in Epon resin. The ultrathin sections were examined using a transmission electron microscope at 120 kV (Tecnaï G2-12 – Spirit Biotwin FEI).

Morphometry of the germ cells. The diameter of the germ cells in each developmental phase was measured in each species using Axiovision image analysis software coupled to a photomicroscope. Type A and B oogonia (G_A and G_B), early and advanced perinucleolar (PN_1 and PN_2), previtellogenic (PV, with cortical alveoli) and vitellogenic oocytes (V) were measured at 100 or 1000 x magnification from five fish in the ripening/ripe stage of each species, totaling 50 measurements of the germ cells in each developmental phase. The follicular and theca cell layers were not considered for these measurements. Similarly, the nuclear diameter of 50 male germ cells (G_A and G_B , types A and B spermatogonia, SP_1 and SP_2 , primary and secondary spermatocytes; T, spermatids and Z, spermatozoa) from five fish in the ripening/ripe stage of each species was measured at 1000 x magnification. Germ cells were identified according to Quagio-Grassiotto *et al.*³⁵, Lubzens *et al.*³⁶ and Schultz *et al.*³⁷.

To determine the proportion (%) of the germ cells, 10 images of the ovaries and testes of each group (*A. paranae*, *A. fasciatus* and putative hybrids) in resting stage were randomly chosen and analyzed with Image J software. Using a grid with 550 intersections, germ cells in different developmental phases^{35–37} and the following gonadal components were quantified: tubular lumen, interstitial tissue, inflammatory infiltrate, blood vessel, tissue degeneration, and apoptotic body. Myoid and Leydig cells were included in the interstitial tissue. The sex of the putative hybrids was recognized by histological analyses of the gonads, i.e. presence of at least one oocyte and absence of cyst-like structures for females, and presence of tubular organization and cyst-like structures for males.

Immunofluorescence. To investigate whether germ cells in putative hybrids were compromised with apoptosis, we performed immunofluorescence for caspase 3. Gonad samples were fixed in 4% paraformaldehyde solution, embedded in paraffin, sectioned at 5 μ m thickness, and submitted to an immunocytochemistry reaction using primary antibody rabbit anti-caspase-3 (polyclonal). For antigen recovery, sections were boiled in 10 mM sodium citrate buffer at pH 6.0 for 20 min and incubated with 2% BSA solution (bovine serum albumin) in PBS (phosphate-buffered saline) for 30 min to block non-specific reactions. Next, primary antibody (dilution 1: 100) was applied to the sections overnight in a humidified chamber at 4 °C. Sections were washed in PBS and then incubated with secondary antibody anti-rabbit ALEXA 488 (1: 500). Nuclear DNA labelling was performed using 4,6-diamidino-2-phenyl-indole (DAPI, 1:500). For negative control, the treatment with the primary antibody was omitted. Sections were examined with a fluorescence microscope (Axio Imager Z2 – ApoTome 2 Zeiss) from the Microscopy Center of the Federal University of Minas Gerais.

Molecular analysis. For mitochondrial Cytochrome Oxidase Subunit I (COI) gene, DNA was obtained from caudal fin tissue fixed in absolute ethanol from 26 *A. paranae*, 25 *A. fasciatus*, and 23 putative hybrids. DNA extraction was carried out using the salt extraction method, adapted from Aljanabi and Martinez³⁸. The sequences were amplified using M13-tailed primer cocktails for the COI gene³⁹. The amplification was done using the PCR technique in a thermocycler using 10 μ l of a solution composed of 7 μ l of ultrapure water, 0.3 μ l of dNTP (10 mM), 1 μ l of buffer $MgCl_2$, 0.4 μ l of M13-tailed primer (10 μ M), 0.3 μ l of Taq DNA polymerase (5 U/ μ l), and 1 μ l of template DNA. The PCR conditions used for amplification of the COI gene were: denaturation at 95 °C (2 min), then 35 denaturation cycles at 94 °C (30 s), primer annealing at 56 °C (30 s), extension at 72 °C (1 min), and final extension at 72 °C (10 min). PCR products were bidirectionally sequenced by the Sanger method using an Applied Biosystems, 3500 Genetic Analyzer and a commercial BigDye[®] Terminator v3.1 sequencing kit. Sequences were compared to reference sequences from GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>): JN 988740 and JN 988739 for *A. paranae*, and JQ 353543 and JQ 353534 for *A. fasciatus*.

For nuclear S7 ribosomal protein gene (first intron), DNA was amplified using the primers S7RPEX1F and S7RPEX2R⁴⁰, and the following PCR conditions: initial denaturation at 94 °C (2 min) followed by 35 denaturation cycles at 94 °C (45 s), primer annealing at 59 °C (45 s), extension at 72 °C (45 s), then final extension at 72 °C (7 min). PCR products were sequenced using an Applied Biosystems, 3730 Genetic Analyzer. Samples of caudal fin tissue from eight specimens of each morphotype (*A. paranae*, *A. fasciatus* and putative hybrids) were used for this analysis.

For the construction of the consensus of COI sequences (contigs), DNA Baser software version 4.16 was used. The alignment of the contigs was done in MEGA 6.0, followed by manual conference and editing. PopART 1.7 was used to construct the haplotype network. Kimura 2-parameter distance (K2P) was calculated using the software DnaSP 5.10.01. For the analysis of the S7 gene, the sequences were aligned using the Geneious R8 software.

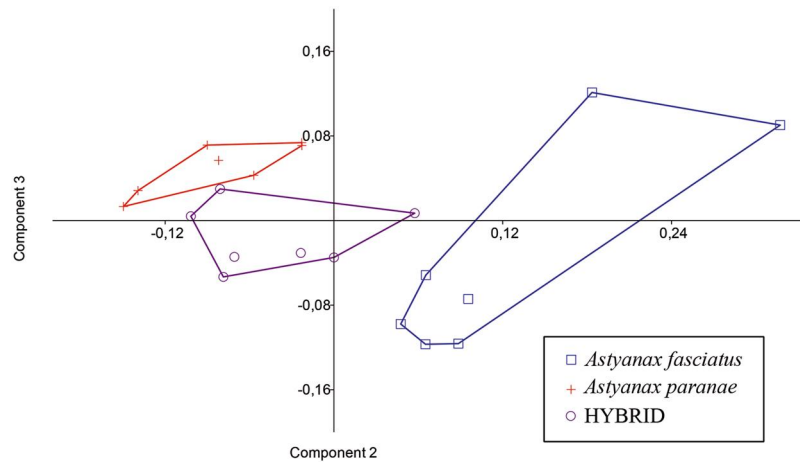


Figure 1. Dispersion diagram of individual scores in samples of *Astyanax fasciatus*, *A. paranae* and hybrids in the space defined by principal components 2 and 3.

	Females			Males		
	<i>A. paranae</i>	Hybrids	<i>A. fasciatus</i>	<i>A. paranae</i>	Hybrids	<i>A. fasciatus</i>
TL (cm)	9.68 ± 0.06 ^a	10.23 ± 0.46 ^{ab}	10.92 ± 0.08 ^b	9.03 ± 0.15 ^a	10.94 ± 0.23 ^{bc}	10.46 ± 0.37 ^c
BW (g)	12.93 ± 0.27 ^a	14.24 ± 2.27 ^{ab}	15.97 ± 0.37 ^b	9.77 ± 0.51 ^a	17.98 ± 1.26 ^b	12.93 ± 1.39 ^a
GSI	6.93 ± 0.55 ^a	0.07 ± 0.02 ^b	2.71 ± 0.37 ^c	2.09 ± 0.61 ^a	0.10 ± 0.04 ^b	0.32 ± 0.12 ^{ab}
K	1.41 ± 0.01 ^a	1.25 ± 0.04 ^{bc}	1.20 ± 0.01 ^c	1.31 ± 0.02 ^a	1.32 ± 0.02 ^a	1.15 ± 0.02 ^b

Table 1. Biometric data and biological indexes of *A. paranae*, *A. fasciatus* and hybrids from the headwaters of Grande River. Values represent mean ± SEM. In a line, different letters indicate significant differences between individuals of the same sex, $p < 0.05$, Kruskal-Wallis, Dunn's post-test. (TL) total length, (BW) body weight, (GSI) gonadosomatic index, (K) Fulton condition factor.

Statistical analysis. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software version 5.0 for Windows. Values are expressed as means ± SD or SEM, and the results were considered significant at a 95% confidence interval. As the biological data did not show a normal distribution, they were analyzed using the Kruskal-Wallis test (followed by Dunn's post-test) and Mann-Whitney test (when applicable).

Results

To verify if the water quality was favorable for fish reproduction, we evaluated its physicochemical parameters which were summarized in the Supplementary Table S1. Low temperatures throughout the year and high levels of dissolved oxygen were obtained. The amount of total dissolved solids was according resolution no. 357 of National Council for the Environment, CONAMA⁴¹, Brazil, indicating water quality suitable for supporting fish reproduction.

Morphometric and meristic data. Sampled specimens of *A. paranae* and *A. fasciatus* were identified based on several meristic characteristics, including the number of scales on the lateral line, scale rows around caudal peduncle, scale rows above and below lateral line, and the number of branched anal-fin rays (see Supplementary Table S2). These meristic traits were intermediate in putative hybrids. For example, these specimens had 18–19 branched anal-fin rays, whereas *A. paranae* had 14 to 15 and *A. fasciatus* had 22 to 25. The body shape of putative hybrids was also intermediate between *A. paranae* and *A. fasciatus* (see Supplementary Table S3). The major differences in the body shape of *A. paranae* and *A. fasciatus* were related to the caudal peduncle length, anal-fin base length, and horizontal eye diameter.

In the PCA analysis, PC1 accounted for 70% of the observed variation, but included only positive values, as PC1 represents variation in size of specimens. PC2 and PC3 accounted for 16.2% and 6.2% of the found variation, respectively, and included positive and negative values, representing most of the body shape variation of the samples (see Supplementary Table S4). In the diagram from the PCA analysis, *A. paranae* and *A. fasciatus* were found to be completely non-overlapping groups on the PC2 axis with the hybrid population included between these species (Fig. 1). The major variables in PC 2 were: caudal peduncle length and caudal peduncle depth for *A. paranae*, and anal-fin base length and horizontal eye diameter for *A. fasciatus*.

Biometrical data and biological indexes. The body size of the lambaris varied from 7.6 to 14.2 cm TL, and from 6.52 to 38.90 g BW. In general, specimens of *A. fasciatus* were bigger than *A. paranae* (Table 1). Sexual dimorphism in size was observed between females and males of *A. paranae* and *A. fasciatus* (Mann-Whitney test).

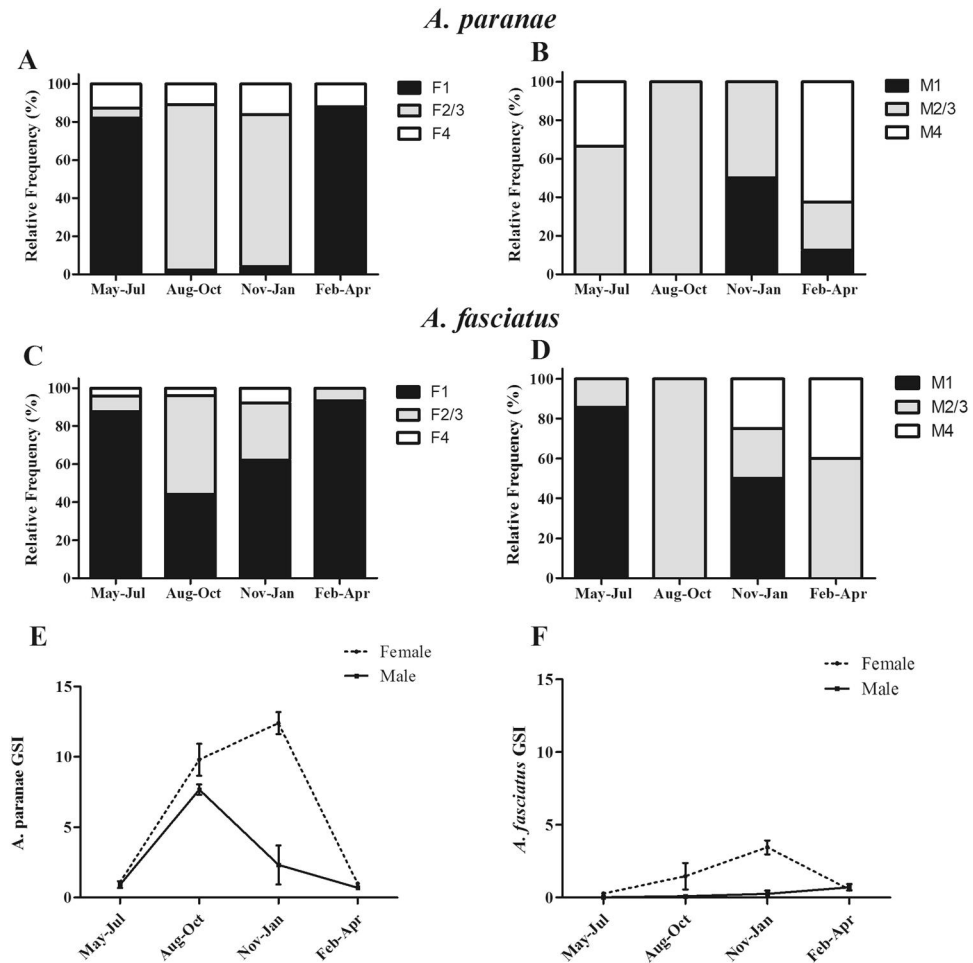


Figure 2. Reproductive parameters of *A. paranae* and *A. fasciatus* from the Grande River headwaters. (**A–D**): Seasonal distribution of the relative frequencies (%) of the gonad maturation stages for females and males of *A. paranae* (**A,B**) and *A. fasciatus* (**C,D**). Gonad maturation stages: (1) resting, (2/3) maturation/ripe and (4) spawned. (**E,F**) Seasonal distribution of the gonadosomatic index (GSI) for females and males of *A. paranae* (**E**) and *A. fasciatus* (**F**). Values represent mean \pm SEM. Sample size is given above bars. *A. paranae*: n = 217 females and 22 males. *A. fasciatus*: n = 195 females and 17 males.

The Fulton condition factor (K) was statistically higher for females and males of *A. paranae* when compared to *A. fasciatus* ($p < 0.0001$), while females of hybrids showed an intermediate value between both species of lambaris. Hybrids specimens did not show gonadal maturation and exhibited very thin gonads and the lowest values of GSI among the compared fish (Table 1). In general, higher GSI was observed in females than males, and the highest values occurred in *A. paranae* when compared to *A. fasciatus* and hybrids.

Reproductive biology. To confirm whether *A. paranae* and *A. fasciatus* reproduce in the headwaters of the Grande River, we comparatively assessed gametogenesis and gonadal maturation (see Supplementary Fig. S1). The relative frequency of gonadal maturation stages revealed specimens in the ripening/ripe stage in most sampling periods, with a higher frequency in the August–October and November–January quarters (Fig. 2A–D), when females had the higher GSI (Fig. 2E,F). Spawned females were also found in almost all periods, thus indicating a prolonged reproductive season with greater reproductive activity from August to January for *A. paranae* and *A. fasciatus* in the headwaters of the Grande River. Females in the resting stage were more frequent in *A. fasciatus* than *A. paranae* from August to January. Batch fecundity (BF) was not significantly different between *A. paranae* and *A. fasciatus* ($p = 0.335$) (see Supplementary Table S5).

Morphological alterations in gonads of hybrids. Hybrid specimens did not present gonadal maturation, and morphological analyzes showed several tissue alterations, such as vacuolated and degenerated germ cells, increased interstitial tissue, presence of immune cells, and degeneration of organelles (Fig. 3). We observed alterations in the first meiotic division, and most cells had chromatin aggregates close to nuclear envelope, in a typical pattern of apoptosis (Fig. 3A–C,F–I). In these animals, a continuum was observed from tissues that presented some progression in gametogenesis, exhibiting a perinucleolar oocyte or few spermatogonia and spermatocytes spread between the vacuolated cells (Fig. 3A,B,H,I), until fully vacuolated tissue with totally degenerated germ cells, which did not advance in meiosis (Fig. 3E). However, previtellogenic and vitellogenic oocytes as well

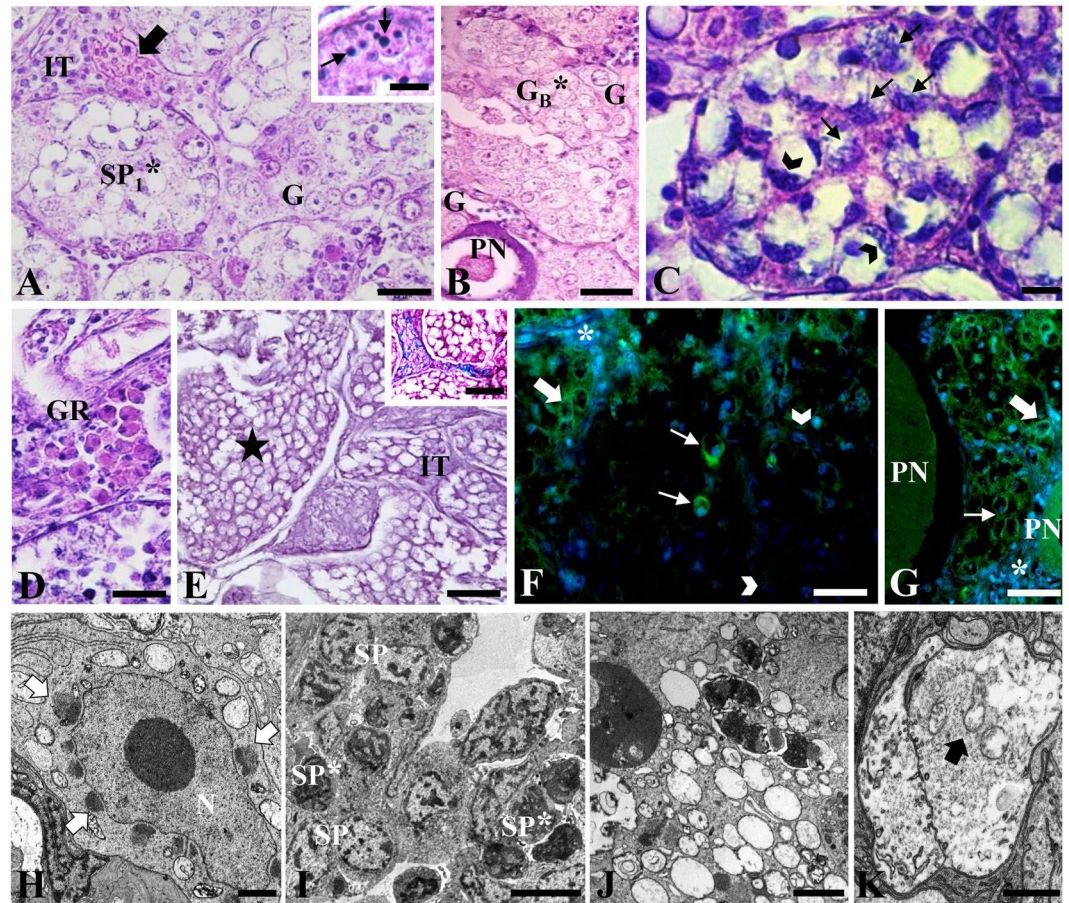


Figure 3. Histological sections of gonads of hybrids stained with hematoxylin and eosin (A–E) and Gomori trichrome (detail E), immunofluorescence for caspase 3 (F,G) and electron microscopy (H–K). A: testis with spermatocytes in degeneration (SP₁*), interstitial tissue (IT), blood vessel (arrow) and spermatogonia (G). Detail: Apoptotic bodies. (B) Ovary with a normal perinucleolar oocyte (PN), type B oogonia in degeneration (G_B*) and normal oogonia (G). (C) Spermatocytes in degeneration showing chromatin attached to the nuclear envelope at the periphery of the cell (arrowhead), little evident nucleolus and signs of interrupted meiosis with formation of chromosomes and altered spindle fibers (arrows). (D) Presence of granulocytes (GR) in the interstitial tissue. (E) Degenerated tissue (star) with cells without evident nucleus and increased interstitial tissue (IT). Detail: same tissue stained with Gomori trichrome. (F) Immunolocalization of caspase 3 in testis, positive reaction for spermatocytes in degeneration (fine arrow) and spermatogonia (thick arrow); negative reaction (arrowhead) and interstitial tissue (asterisk). (G) Immunolocalization of caspase 3 in ovary, positive reaction for type B oogonia in degeneration (arrow), normal oogonia (arrowhead) and perinucleolar oocytes (PN); negative reaction for interstitial tissue (asterisk). (H) Ultrastructure of spermatocytes presenting elongated nucleus (N) and presence of nuages (arrow). (I) Normal spermatocytes (SP) and in degeneration (SP*). (J) Detail of the cytoplasm of an intensely vacuolated cell. (K) Large autophagic vacuole, containing organelles in degeneration (arrow) inside. Bar: (A) 20 μm, (detail) 6 μm; (B) 40 μm; (C,I) 5 μm; (D) 20 μm; (E) 15 μm, (detail) 10 μm; (F) 20 μm, detail (6 μm); (G) 30 μm; (H) 2 μm; (J) 0.5 μm, (K) 1 μm.

as spermatids and spermatozoa were not observed in any of the hybrid specimens. Some immune cells were also observed in the gonads of these animals (Fig. 3D,K). The immunolocalization of caspase 3 occurred in several of degenerated cells (B oogonia in females and primary spermatocytes in males) (Fig. 3F,G). Wide cytoplasmic vacuolization and autophagic vacuoles were also frequently observed in hybrids. (Fig. 4L,M).

Gametogenesis. Germ cells of *A. paranae* and *A. fasciatus* had similar diameters in most developmental phases and the gametes formed at the end of this process did not present significant differences (see Supplementary Table S6). The proportion (%) of germ cells in the resting stage (Fig. 4) showed no significant difference in females of *A. paranae* and *A. fasciatus*. However, the males of *A. fasciatus* had increased interstitial tissue ($34.13 \pm 0.86\%$) and blood vessels ($6.69 \pm 1.97\%$) as well as decreased tubular lumen than males of *A. paranae*. In the hybrids, the ovaries had G_A ($8.11 \pm 1.16\%$), G_B ($5.64 \pm 0.53\%$), and PN₁ ($8.88 \pm 4.09\%$), besides histopathological alterations such as increased interstitial tissue ($26.63 \pm 3.18\%$) and inflammatory infiltrate ($10.19 \pm 2.54\%$) when compared to resting females of *A. paranae* and *A. fasciatus*. The presence of degenerated tissue ($6.51 \pm 4.35\%$), apoptotic bodies ($0.09 \pm 0.06\%$), and B oogonia in degeneration ($29.65 \pm 4.93\%$) were also

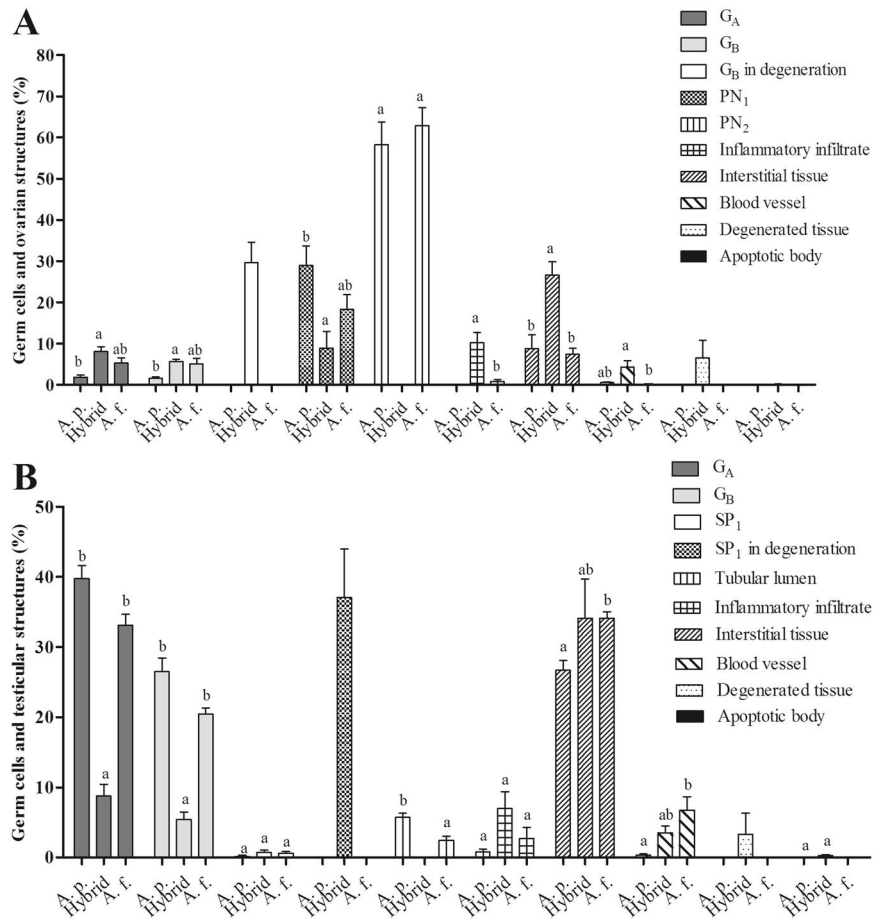


Figure 4. Proportion (%) of germ cells and ovarian (A) and testicular (B) structures in *A. paranae* (A. p.), hybrids and *A. fasciatus* (A. f.) from the Grande River headwaters. Values represent mean \pm SEM. Different letters indicate significant differences among the groups A. p., hybrid and A. f.

detected in hybrids, which were all absent in the *A. paranae* and *A. fasciatus*. Regarding the males, hybrid specimens had intermediate proportion of interstitial tissue and blood vessels when compared to the other two species and a lower amount of G_A and G_B (8.76 ± 1.70 ; $5.37 \pm 1.08\%$), as well as the presence of degenerated tissue ($3.30 \pm 3.03\%$) and SP_1 in degeneration ($37.01 \pm 6.96\%$), which were absent in *A. paranae* and *A. fasciatus*.

Molecular analyses. After alignment, manual conferencing, and trimming of the ambiguous ends, the COI sequences obtained were 564 base pairs in length. A total of 26 COI sequences were obtained from *A. paranae*, 25 from *A. fasciatus*, and 23 from hybrids.

The haplotype network showed the presence of two phylogenetically distinct clades, one referring to *A. paranae* and another referring to *A. fasciatus* (Fig. 5). A total of 9 haplotypes was detected in the 74 lambaris samples, and they were numbered from H-1 to H-9 in the haplotype network. The H-10 haplotype was found only in reference sequences for the *A. paranae* species obtained from the GenBank. Among the haplotypes sampled in this study, two were related to *A. fasciatus* clade (H-1 and H-2) and the other seven to *A. paranae* clade (H-3, H-4, H-5, H-6, H-7, H-8, and H-9). The H-2 haplotype was the most representative in this study, being shared by 40 animals, including most of the *A. fasciatus* specimens. In *A. paranae*, the most representative haplotype was H-5, which was shared by 15 individuals. The H-6 haplotype was observed in a specimen of the morphotype *Astyanax* sp. - hybrids, although according to the BOLD database, it belongs to the *A. paranae* clade. The haplotype network showed that *A. paranae* and *A. fasciatus* did not share haplotypes, while hybrids had shared haplotypes of both species of lambaris (H-2, H-4, H-5, H-6, and H-8), even though only showing one morphotype. Seven specimens of hybrids were grouped with *A. paranae* (Hybrid clade *paranae*) while 16 specimens were grouped with *A. fasciatus* (Hybrid clade *fasciatus*).

The mean genetic distance (K2P) between the sequences of the mitochondrial COI gene ranged from 0 to 2.2% (see Supplementary Table S7). The genetic distance analysis confirmed that the *A. paranae* and *A. fasciatus* morphotypes correspond to distinct species, since the distance between these two groups was 2.2%. In addition, the observed divergences between samples and reference sequences were low (0.5% for *A. paranae* and 0% for *A. fasciatus*). The genetic distance found between *A. paranae* haplotypes was 0.171%, while *A. fasciatus* haplotypes were 0.014% distant. Thus, a DNA “barcode gap” was observed among species of the genus *Astyanax*, showing that DNA barcoding was able to distinguish these species successfully.

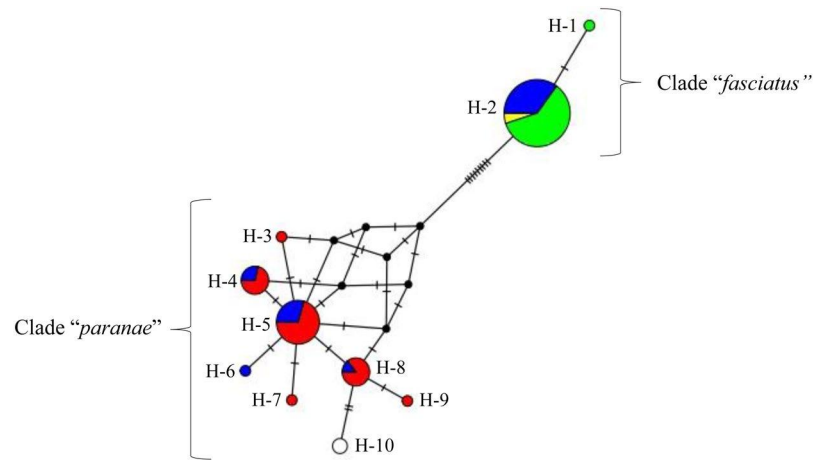


Figure 5. Haplotype network built with COI gene sequences of hybrids (blue), *A. fasciatus* (green) and *A. paranae* (red) from the Grande River headwaters obtained in the present study and reference sequences of *A. fasciatus* (yellow) and *A. paranae* (white) downloaded from GenBank.

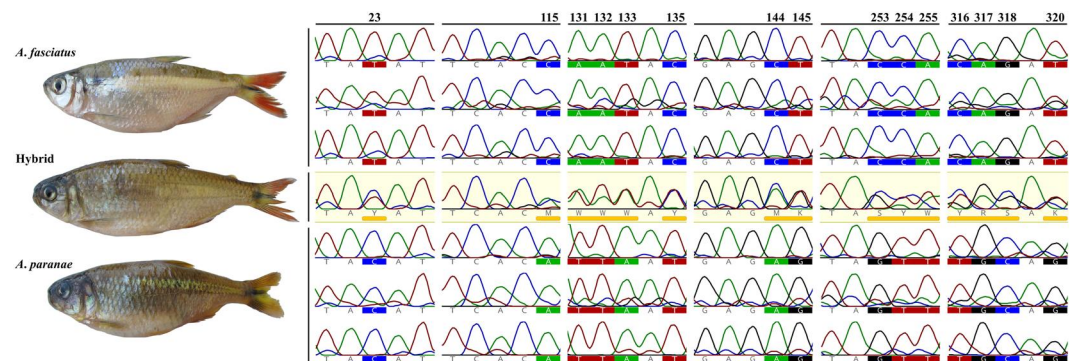


Figure 6. Photographs of lambaris from the Grande River headwaters and genetic alignment of the nuclear S7 gene fragment. Chromatograms show the hybrid individual's heterozygous peaks (underlined with yellow bars) at the diagnostic sites, where *A. fasciatus* and *A. paranae* present fixed differences.

The S7 sequences obtained were 390 base pairs in length after alignment, manual conferencing, and trimming of the ambiguous ends. A total of 196 variable sites were observed in hybrids when compared to *A. paranae* and *A. fasciatus*. Hybrid specimens showed well-marked double peaks in their DNA sequencing chromatograms, an evidence of being heterozygotes^{42,43}, with an allele inherited from each parental species. *A. paranae* and *A. fasciatus* presented fixed differences between each other at these variable sites (Fig. 6).

Discussion

In South America, reduction in the abundance and distribution of species, removal of isolation barriers of populations, river transposition, and escape of domestic species from fish farming contribute to hybridization and are an increasing threat to fish fauna^{9,11,16,20,30}. Here, we report for the first time the natural hybridization between the lambaris *A. paranae* and *A. fasciatus* by using a multidisciplinary approach.

Morphological analysis of putative hybrids showed intermediate anatomical features when compared to *A. paranae* and *A. fasciatus*, as expected for hybrid fish^{3,4}. Among these features, it includes branched anal-fin rays, which is one of the main features used to diagnose *A. paranae* and closely related species, the so-called *Astyanax scabripinnis* species complex⁴⁴. In Brazilian aquaculture, the common artificial crossing between the catfishes *Pseudoplatystoma corruscans* and *P. reticulatum* gives rise to a hybrid that shows a morphological characteristic with an intermediate pattern of its lateral body spots in relation to parental species⁴⁵.

In the current study, both species showed sexual dimorphism in size, with larger and heavier females than males, thus corroborating previous studies in *Astyanax* species^{46,47}. The presence of small specimens of *A. paranae* and *A. fasciatus* in reproductive activity in this study indicates that first sexual maturation occurs early in the development of lambaris. Indeed, Ferreira⁴⁶ found specimens of *A. paranae* reproducing with a size of 3–5 cm in the Mogi Guaçu River basin. Although the hybrids exhibit from 8.6 to 14.2 cm, a length at which most lambaris of *A. paranae* and *A. fasciatus* species shows reproductive activity, these specimens did not present gonadal maturation. Also, the trend of greater weight presented by the hybrids in relation to the other species may be due to the absence of energy investment in reproduction¹.

The frequency distribution of the gonadal maturation stages described in this study demonstrated the overlap of reproductive period between *A. paranae* and *A. fasciatus* species. In *A. paranae*, spawned females were observed throughout all collections, suggesting that this species reproduces throughout the year in the headwaters of the Grande River, showing multiple spawns. This same reproductive strategy has been associated with *A. fasciatus* in some studies^{24,48}. In addition, the morphology of ovaries and testes was similar in *A. paranae* and *A. fasciatus*, as also observed in *A. bimaculatus*, *A. scabripinnis*, and *A. fasciatus* from the Velhas River⁴⁹. Morphological and reproductive similarities between the species studied reflects the phylogenetic proximity and the overlap of reproductive niches (area and/or period of spawning), features known to favor the hybridization^{3,8,19,20,30,50}. In fact, a confined environment, such as the waterfall lagoon inhabited by the lambaris species of the present study, has been considered favorable for accidental fertilization of eggs of another species⁵¹.

Histological and ultrastructural analyses performed on the gonads of the hybrids strongly suggest that the first phase of meiosis was interrupted in these fish. Apparently, it did not advance to stages after prophase due to the incorrect pairing of chromosomes and formation of altered spindle fibers in B oogonia and primary spermatocytes, leading to the alterations observed in their gonads. Evidence of this process is that spermatids, spermatozoa, and previtellogenic and vitellogenic follicles were not found in any of the hybrid specimens. Chromatin aggregates attached to the nuclear envelope and positive reaction for caspase 3 indicated apoptosis of the germ cells, which was triggered after meiosis failure. Apoptosis can be a common finding in germ cells of hybrids and it was observed in 45% of seminiferous tubules analyzed in mules (crossing of male *Equus asinus* and female *Equus caballus*)⁵². Along with the morphological alterations observed in this study, degenerated tissue was formed and immune cells engulfed tissue remnants, while there was a remodeling for the formation of connective interstitial tissue. Despite the above-mentioned changes, some normal germ cells were observed in the hybrids, showing that a few cells advanced in meiosis similar to that found in sunfish hybrids and mules^{52,53}. The ultrastructural analyses showed degeneration of organelles and presence of autophagic vacuoles, with autophagy possibly being related to nutrient recycling to sustain cell metabolism during tissue degeneration. Similarly, hybrids of cichlid fish showed increased interstitial tissue, degenerated cells containing large lysosomes, and apoptotic nuclei⁵⁴.

During meiosis, recognition and pairing of homologous chromosomes occur with the formation of the synaptonemal complex and crossing over, with the establishment of chiasmata in prophase in a highly regulated process⁵⁵. Failures during this and other stages of meiosis have been associated with human infertility^{56,57}. Here, we believe that failure in meiosis of hybrids triggered the morphological damage observed in these fish, i.e. tissue degeneration and apoptosis of B oogonia and primary spermatocytes. In triploid individuals, the three homologues align side by side during meiosis, but only two chromosomes are involved in the synapse⁵⁸, and this can lead to the interruption of meiosis⁵⁹. In medaka hybrids, the meiotic cell cycle was interrupted before reaching metaphase I, and when hybrids of both sexes were cultured together, females were able to spawn but the eggs did not develop, and males did not produce functional spermatozoa⁶⁰. Also, defects in meiosis in sunfish hybrids led to sterility and production of altered gametes⁵³.

COI analysis identified *A. paranae* and *A. fasciatus* as two phylogenetically distinct clades and the divergence between the haplotypes was greater than 2%, which is considered a cut-off limit for distinct fish species⁶¹. The proximity of the standard reference value found in this study (2.2%) may be related to the phylogenetic proximity between the analyzed species, a feature correlated to hybridization³⁰. In fact, Rossini *et al.*¹³ suggest that *A. paranae* and *A. fasciatus* present recent radiation with low values of genetic distance. Although these species are close related, they present different chromosome counts in their karyotypes (*A. paranae* $2n = 50$ and *A. fasciatus* $2n = 46-48$)⁶²⁻⁶⁴. Therefore, the interrupted meiosis and sterility of the hybrids found in the present study are probably related to the presence of extra chromosomes, which possibly do not have homologous pairs, preventing the progression of meiosis and, consequently, formation of gametes in these specimens¹.

The fact that a single morphotype shares haplotypes of two distinct species may be an indication of hybridization, since haplotypes have uniparental inheritance⁶⁵. Thus, the specimens of morphotype *Astyanax* sp. may be considered hybrids resulting from the crossing between the lambaris species *A. paranae* and *A. fasciatus*. Considering that COI is a mitochondrial gene and its inheritance is maternal, this crossing could be bidirectional: females of *A. paranae* with males of *A. fasciatus* or males of *A. paranae* with females of *A. fasciatus*, since the inheritance was associated with both species.

Corroborating the COI data, analysis of S7 nuclear gene evidenced the hybridization process, since all the specimens of *Astyanax* sp. morphotype were heterozygous and showed several sites of double peaks within their DNA sequencing chromatograms, a peak from each pure parental species. Moreover, all variation found within the S7 fragment of the hybrids analyzed in this study was limited to the variability presented by *A. fasciatus* and *A. paranae*. In order to confirm a hybridization process, an ideal genetic marker cannot show variation within a species, besides presenting fixed differences between parental species and potentially showing hybrids as heterozygous⁴³. In this sense, microsatellites often fail in diagnosing hybridization between closely related species, because they show wide range in allele size and, consequently, overlap during analysis⁴³. Therefore, S7 gene first intron region proved to be an effective marker for hybridization diagnosis between the species *A. paranae* and *A. fasciatus*.

In the current study, genetic data supported the hypothesis of natural hybridization between *A. paranae* and *A. fasciatus*. Furthermore, we highlight the data of the reproductive biology and germ cells morphology that strongly corroborate the molecular data and, in addition, suggest that hybrids are infertile. Thus, integrating data on anatomy, reproductive biology, gonadal morphology, and mitochondrial and nuclear DNA, the present study provides strong evidence of natural hybridization between two species of lambaris. Assessment of hybridization markers, including morphological and genetic issues, is of great relevance to improve the knowledge on conservation status of the phylogenetically close species that exhibit reproductive niche overlap in natural environments.

Data Availability

The datasets generated and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request. The sequences obtained in this study were deposited in GenBank under accession numbers MH626656–MH626729 and MK318200–MK318216.

References

- Bartley, D. M., Rana, K. & Immink, A. J. The use of inter-specific hybrids in aquaculture and fisheries. *Rev. Fish Biol. Fish.* **10**, 325–337 (2001).
- Trigo, T. C. *et al.* Inter-species hybridization among Neotropical cats of the genus *Leopardus*, and evidence for an introgressive hybrid zone between *L. geoffroyi* and *L. tigrinus* in southern Brazil. *Mol. Ecol.* **17**, 4317–4333 (2008).
- Hubbs, C. L. Hybridization between fish species in nature. *Syst. Zool.* **4**, 1–20 (1955).
- Scribner, K. T., Page, K. S. & Bartron, M. L. Hybridization in freshwater species: a review of case studies and cytonuclear methods of biological inference. *Rev. Fish Biol. Fish.* **10**, 293–323 (2001).
- Hashemzadeh Segherloo, I. *et al.* Genetic and morphological support for possible sympatric origin of fish from subterranean habitats. *Sci. Rep.* **8**(2909), 1–13 (2018).
- Zaidan, F. C. & Fagundes, V. An effective method for interspecific introgression identification based on SNPs. *Conserv. Genet. Resour.* **6**, 543–546 (2014).
- Arnold, M. L. & Martin, N. H. Adaptation by introgression. *J. Biol.* **8**, 82 (2009).
- Mallet, J. Hybridization as an invasion of the genome. *Trends Ecol. Evol.* **20**, 229–237 (2005).
- Carvalho, D. C., Seerig, A. S., Figueiredo, B. S. A., Crepaldi, D. V. & de Oliveria, D. A. A. Molecular identification of the hybrid between the catfish species *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum* using a set of eight microsatellite markers. *J. Fish Biol.* **83**, 671–676 (2013).
- Burcea, A., Florescu, I. E., Dudu, A., Georgescu, S. E. & Costache, M. Molecular Methods for the detection of natural hybrids in sturgeon populations. *Transylvanian Rev. Syst. Ecol. Res.* **16**, 65–72 (2014).
- Hashimoto, D. T., Senhorini, J. A., Foresti, F., Martínez, P. & Porto-Foresti, F. Genetic identification of F1 and post-F1 serrasalmid juvenile hybrids in Brazilian aquaculture. *PLoS One* **9**, 1–8 (2014).
- Ward, R. D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R. & Hebert, P. D. N. DNA barcoding Australia's fish species. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **360**, 1847–1857 (2005).
- Rossini, B. C. *et al.* Highlighting *Astyanax* species diversity through DNA barcoding. *PLoS One* **11**, 1–20 (2016).
- Papoušek, I. *et al.* Identification of natural hybrids of gibel carp *Carassius auratus gibelio* (Bloch) and crucian carp *Carassius carassius* (L.) from lower Dyje River floodplain (Czech Republic). *J. Fish Biol.* **72**, 1230–1235 (2008).
- Aboim, M. A., Mavárez, J., Bernatchez, L. & Coelho, M. M. Introgressive hybridization between two Iberian endemic cyprinid fish: A comparison between two independent hybrid zones. *J. Evol. Biol.* **23**, 817–828 (2010).
- Prado, F. D., do, Hashimoto, D. T., Senhorini, J. A., Foresti, F. & Porto-Foresti, F. Detection of hybrids and genetic introgression in wild stocks of two catfish species (Siluriformes: Pimelodidae): The impact of hatcheries in Brazil. *Fish. Res.* **125–126**, 300–305 (2012).
- Yaakub, S. M., Bellwood, D. R., Herwerden, L. Van & Walsh, F. M. Hybridization in coral reef fishes: Introgression and bi-directional gene exchange in *Thalassoma* (family Labridae). *Mol. Phylogenet. Evol.* **40**, 84–100 (2006).
- Wallis, G. P. *et al.* Interspecific hybridization causes long-term phylogenetic discordance between nuclear and mitochondrial genomes in freshwater fishes. *Mol. Ecol.* **26**, 3116–3127 (2017).
- Bassin, L., Alvarez, N., Pellissier, L. & Triponez, Y. Ecological niche overlap in sister species: How do oil-collecting bees *Macropis europaea* and *Macropis fulvipes* (Hymenoptera: Melittidae) avoid hybridization and competition? *Apidologie* **42**, 579–595 (2011).
- Peres, W. A. M. *et al.* Invasion, dispersion and hybridization of fish associated to river transposition: Karyotypic evidence in *Astyanax 'bimaculatus' group* (Characiformes: Characidae). *Rev. Fish Biol. Fish.* **22**, 519–526 (2012).
- Lima, F. C. T. *et al.* Genera incertae sedis in Characidae. In *Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America* 106–168 (2003).
- Zanata, A. M. & Camelier, P. *Astyanax vermillion* and *Astyanax burgerai*: New characid fishes (Ostariophysi: Characiformes) from Northeastern Bahia, Brazil. *Neotrop. Ichthyol.* **7**, 175–184 (2009).
- Veregue, A. M. L. & Orsi, M. L. Reproductive biology of *Astyanax scabripinnis paranae* (Eigenmann) (Osteichthyes, Characidae) from Marrecas creek of the Tibagi basin, Paraná. *Rev. Bras. Zool.* **20**, 97–105 (2003).
- Carvalho, P. A., Paschoalini, A. L., Santos, G. B., Rizzo, E. & Bazzoli, N. Reproductive biology of *Astyanax fasciatus* (Pisces: Characiformes) in a reservoir in southeastern Brazil. *J. Appl. Ichthyol.* **25**, 306–313 (2009).
- Melo, R. M. C. *et al.* Comparative morphology of the reproductive system of seven species of ostariophysan fishes from the upper Das Velhas River, Brazil. *J. Morphol.* **278**, 170–181 (2017).
- Abilhoa, V. Natural history aspects of *Astyanax scabripinnis* Jenyns (Teleostei, Characidae) in a Auracaria Forest stream in southern Brazil. *Rev. Bras. Zool.* **24**, 997–1005 (2007).
- Esteves, K. E. Feeding ecology of three *Astyanax* species (Characidae, Tetragonopterinae) from a floodplain lake of Mogi-Guaçu River, Paraná River Basin, Brazil. *Environ. Biol. Fishes* **46**, 83–101 (1996).
- Prado, P. S., Souza, C. C., Bazzoli, N. & Rizzo, E. Reproductive disruption in lambari *Astyanax fasciatus* from a Southeastern Brazilian reservoir. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **74**, 1879–1887 (2011).
- Weber, A. A. *et al.* Reproductive effects of oestrogenic endocrine disrupting chemicals in *Astyanax rivularis* inhabiting headwaters of the Velhas River, Brazil. *Sci. Total Environ.* **592**, 693–703 (2017).
- Sales, N. G., Pessali, T. C., Andrade Neto, F. R. & Carvalho, D. C. Introgression from non-native species unveils a hidden threat to the migratory Neotropical fish *Prochilodus hartii*. *Biol. Invasions*, <https://doi.org/10.1007/s10530-017-1556-4> (2017).
- Graça, W. J. & Pavanelli, C. S. *Peixes da planície de inundação do Alto Rio Paraná e áreas adjacentes*. (eds Graça, W. J. and Pavanelli, C. S.) 241p (Maringá, 2007).
- Fink, W. L. & Weitzman, S. H. The so-called cheirodontin fishes of Central America with descriptions of two new species (Pisces: Characidae). *Smithson. Contrib. to Zool.* 1–46, <https://doi.org/10.5479/si.00810282.172> (1974).
- Neff, N. A. & Smith, G. R. Multivariate analysis of hybrid fishes. *Syst. Zool.* **28**, 176–196 (1979).
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T. A. T. & Ryan, P. D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontol. Electron.* **4**(1), 1–9 (2001).
- Quagio-Grassiotto, I., Grier, H., Mazzoni, T. S., Nóbrega, R. H. & De Arruda Amorim, J. P. Activity of the ovarian germinal epithelium in the freshwater catfish, *Pimelodus maculatus* (Teleostei: Ostariophysi: Siluriformes): Germline cysts, follicle formation and oocyte development. *J. Morphol.* **272**, 1290–1306 (2011).
- Lubzens, E., Young, G., Bobe, J. & Cerdà, J. Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. *Gen. Comp. Endocrinol.* **165**, 367–389 (2010).
- Schulz, R. W. *et al.* Spermatogenesis in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* **165**, 390–411 (2010).
- Aljanabi, S. M. & Martinez, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4692–4693 (1997).

39. Ivanova, N. V., Zemlak, T. S., Hanner, R. H. & Hebert, P. D. N. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Mol. Ecol. Notes* **7**, 544–548 (2007).
40. Chow, S. & Hazama, K. Universal PCR primers for S7 ribosomal protein gene introns in fish. *Mol. Ecol.* **7**, 1247–1263 (1998).
41. CONAMA. *Resolução Conama nº 357/05. DOU nº 053, 18/03/2005*, 58–63 (2005).
42. Flot, J.-F. & Tillier, S. Molecular phylogeny and systematics of the scleractinian coral genus *Pocillopora* in Hawaii. In *Proc. of the 10th Int. Coral Reef Symp.* 24–29, <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2006.09.014> (2006).
43. He, S., Johansen, J. L., Hoey, A. S., Pappas, M. K. & Berumen, M. L. Molecular confirmation of hybridization between *Dascyllus reticulatus* × *Dascyllus aruanus* from the Great Barrier Reef. *Mar. Biodivers.* 1–10, <https://doi.org/10.1007/s12526-017-0819-8> (2017).
44. Bertaco, V. A. & De Lucena, C. A. S. Two new species of *Astyanax* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) from eastern Brazil, with a synopsis of the *Astyanax scabripinnis* species complex. *Neotrop. Ichthyol.* **4**, 53–60 (2006).
45. Hashimoto, D. T., Senhorini, J. A., Foresti, F. & Porto-Foresti, F. Interspecific fish hybrids in Brazil: Management of genetic resources for sustainable use. *Rev. Aquac.* **4**, 108–118 (2012).
46. Ferreira, K. M. Biology and ecomorphology of stream fishes from the rio Mogi-Guaçu basin, Southeastern Brazil. *Neotrop. Ichthyol.* **5**, 311–326 (2007).
47. Veloso-Júnior, V. C., Guimarães-Cruz, R. J., Barros, M. D. M., Barata, R. S. L. & Santos, J. E. Reproduction of the lambari *Astyanax scabripinnis* (Jenyns, 1842) (Pisces: Characidae) in a small stream in Southeastern Brazil. *J. Appl. Ichthyol.* **25**, 314–320 (2009).
48. Gurgel, H. D. C. B. Population structure and breeding season of *Astyanax fasciatus* (Curvier) (Characidae, Tetragonopterinae) from Ceará Mirim River, Poço Branco, Rio Grande do Norte, Brazil. *Rev. Bras. Zool.* **21**, 131–135 (2004).
49. Melo, R. M. C., Ribeiro, Y. M., Luz, R. K., Bazzoli, N. & Rizzo, E. Influence of low temperature on structure and dynamics of spermatogenesis during culture of *Oreochromis niloticus*. *Anim. Reprod. Sci.* **172**, 148–156 (2016).
50. Romero, A. Introgressive hybridization in the *Astyanax fasciatus* (Pisces: Characidae) population at La Cueva Chica. *Natl. Speleol. Soc. Bull.* **45**, 81–85 (1983).
51. Parveen, S., Abbas, K., Afzal, M. & Hussain, M. Prediction of potential hybridization between three major carps in Ravi River (Punjab, Pakistan) basin by using microsatellite markers. *Turkish. J. Fish. Aquat. Sci.* **18**, 27–35 (2018).
52. Neves, E. S., Chiarini-Garcia, H. & França, L. R. Comparative testis morphometry and seminiferous epithelium cycle length in donkeys and mules. *Biol. Reprod.* **67**, 247–255 (2002).
53. Wills, P. S., Sheehan, R. J. & A., S. K. Jr. Reduced reproductive capacity in diploid and triploid hybrid Sunfish. *Trans. Am. Fish. Soc.* **129**, 30–40 (2000).
54. Fishelson, L. Comparison of testes structure, spermatogenesis, and spermatocytogenesis in young, aging, and hybrid cichlid fish (Cichlidae, Teleostei). *J. Morphol.* **256**, 285–300 (2003).
55. Kleckner, N. Meiosis: How could it work? *Proc. Natl. Acad. Sci. United States Am.* **93**, 8167–8174 (1996).
56. Martin, R. H. Meiotic chromosome abnormalities in human spermatogenesis. *Reprod. Toxicol.* **22**, 142–147 (2006).
57. Hunt, P. A. & Hassold, T. J. Human female meiosis: what makes a good egg go bad? *Trends Genet.* **24**, 86–93 (2008).
58. Roeder, G. S. Meiotic chromosomes: it takes two to tango. *Genes Dev.* **11**, 2600–2621 (1997).
59. Blanco, J., Egozcue, J. & Vidal, F. Meiotic behaviour of the sex chromosomes in three patients with sex chromosome anomalies (47,XXY, mosaic 46,XY/47,XXY and 47,YYY) assessed by fluorescence *in-situ* hybridization. *Hum. Reprod.* **16**, 887–892 (2001).
60. Shimizu, Y., Shibata, N. & Yamashita, M. Spermiogenesis without preceding meiosis in the hybrid medaka between *Oryzias latipes* and *O. curvinotus*. *J. Exp. Zool.* **279**, 102–112 (1997).
61. Ward, R. D. DNA barcode divergence among species and genera of birds and fishes. *Mol. Ecol. Resour.* **9**, 1077–1085 (2009).
62. Morelli, S., Bertollo, L. A. C., Foresti, F., Moreira-Filho, O. & Toledo-Filho, S. A. Cytogenetic Considerations on the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). I. Karyotypic variability. *Caryologia Int. J. Cytol. Cytosystematics Cytogenet.* **36**, 235–244 (1983).
63. Pazza, R., Kavalco, K. F. & Bertollo, L. A. C. Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). I. Karyotype analysis, Ag-NORs and mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in sympatric karyotypes and their possible hybrid forms. *Cytogenet. Genome Res.* **112**, 313–319 (2006).
64. Nishiyama, P. B. *et al.* Karyotypic diversity among three species of the genus *Astyanax* (Characiformes: Characidae). *Brazilian. J. Biol.* **76**, 360–366 (2016).
65. Yu, J., Kuroda, C. & Gong, X. Natural hybridization and introgression between *Ligularia cymbulifera* and *L. tongolensis* (Asteraceae, Senecioneae) in four different locations. *PLoS One* **9**, 1–17 (2014).

Acknowledgements

We thank Oscar Shibatta and Fernando Assega for helping in the PCA analysis; technicians at the Microscopy Centre of the Federal University of Minas Gerais for preparing the biological material for electron microscope and Mônica Cândida Pereira Ricardo for preparing the histological slides. The study was supported by the Brazilian institutions: Petróleo Brasileiro S.A. (Petrobras), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Author Contributions

A.P.B.P. contributed to fieldwork and sample collection, performed the lab work and data analysis and wrote the manuscript. R.M.C.M. designed the study, contributed to fieldwork and sample collection, data analysis and writing of the manuscript. D.T.F. and D.C.C. contributed to the molecular experiments and analysis. J.O.B. performed the anatomical analysis. E.R. coordinated the study and contributed to the writing of the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40856-4>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

Supplementary Information for

Natural hybridization of sympatric species of lambaris: a multi-disciplinary approach

Ana Paula Barbosa Pinheiro¹, Rafael Magno Costa Melo², Daniel Fonseca Teixeira³, José Luís Olivan Birindelli⁴, Daniel Cardoso Carvalho³, Elizete Rizzo^{1*}

¹Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, C. P. 486, 31270-901, Minas Gerais, Brasil.

²Centro de Ciências Ambientais, Universidade Federal do Sul da Bahia, UFSB, Porto Seguro, 45810-000, Bahia, Brasil.

³Programa de Pós-graduação em Biologia de Vertebrados, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, PUC Minas, Belo Horizonte, 30535-610, Minas Gerais, Brasil.

⁴Departamento de Biologia Animal e Vegetal, Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, C. P. 10.011, 86057-970, Paraná, Brasil.

*To whom correspondence should be addressed: Elizete Rizzo

Table S1: Water quality in the headwaters of Grande River

	May-July	August- October	November-January	February-April
Temperature (°C)	13.54 ± 0.55	11.26 ± 0.01	16.18 ± 0.01	14.02 ± 0.01
pH	6.57 ± 0.06	6.07 ± 0.03	5.98 ± 0.01	6.54 ± 0.01
Dissolved oxygen (mg/L)	13.28 ± 0.27	12.64 ± 0.05	11.19 ± 0.07	12.75 ± 0.27
Conductivity (µS/cm)	12.00 ± 0.01	12.00 ± 0.01	12.33 ± 0,33	12.00 ± 0.01
Total suspended solids (mg/L)	8.00 ± 0.01	8.00 ± 0.01	8.00 ± 0.01	8.00 ± 0.01

Data (mean ± SEM) were obtained during a reproductive cycle.

Table S2. Meristic data of samples of *Astyanax fasciatus*, *A. paranae* and *Astyanax* sp.

Characters	<i>A. fasciatus</i> (n=7)			<i>A. paranae</i> (n=7)			<i>Astyanax</i> sp. (n=7)		
	Range			Range			Range		
Pored scales on lateral line*	39	-	42	35	-	38	36	-	38
Scale rows between dorsal-fin origin and lateral line*	7	-	8	6	-	6	6	-	7
Scales rows between lateral line and pelvic-fin origin*	6	-	6	5	-	5	5	-	6
Pre-dorsal scales	11	-	13	11	-	13	11	-	12
Scale rows around caudal peduncle*	16	-	16	14	-	14	14	-	16
Dorsal-fin branched rays	9	-	9	9	-	9	9	-	9
Anal-fin branched rays*	22	-	25	14	-	15	18	-	19
Pectoral-fin branched rays	13	-	15	12	-	14	12	-	13
Pelvic-fin branched rays	7	-	7	6	-	6	7	-	8
Upper caudal-fin branched rays	8	-	9	9	-	9	9	-	9
Lower caudal-fin branched rays	8	-	8	8	-	8	8	-	8
Outer premaxillary teeth	3	-	5	3	-	4	4	-	4
Inner premaxillary teeth	5	-	5	5	-	5	5	-	5
Maxillary teeth	1	-	1	1	-	2	1	-	2
Dentary teeth	5	-	5	5	-	6	5	-	6

Asterisks indicate most important characters.

Table S3. Morphometric data of samples of *Astyanax fasciatus*, *A. paranae* and *Astyanax* sp.

Characters	<i>Astyanax fasciatus</i>					<i>Astyanax paranae</i>					<i>Astyanax</i> sp.							
	n	Mean	Range		SD	n	Mean	Range		SD	n	Mean	Range		SD			
Standard Length (mm)	7	80.75	74.56	-	88.90	7	83.66	74.86	-	92.22	7	72.56	62.6	-	94.05			
Percentages of SL																		
Depth at dorsal-fin origin	7	33.61	30.42	-	36.56	1.99	7	30.85	29.08	-	32.25	1.06	7	32.24	30.66	-	35.05	1.63
Snout to dorsal-fin origin	7	48.71	45.99	-	50.15	1.42	7	50.49	48.68	-	53.41	1.66	7	49.84	48.42	-	51.28	1.09
Snout to pectoral-fin origin	7	25.17	21.58	-	26.89	1.71	7	26.88	25.98	-	27.64	0.61	7	26.36	24.49	-	29.71	1.66
Snout to pelvic-fin origin	7	46.39	44.94	-	48.58	1.42	7	49.60	48.57	-	50.47	0.62	7	49.38	48.03	-	51.42	1.36
Snout to anal-fin origin	7	64.95	62.74	-	66.58	1.28	7	67.80	66.54	-	68.78	0.97	7	67.35	66.18	-	69.09	1.11
Caudal-peduncle depth	7	10.56	8.02	-	11.42	1.15	7	11.86	11.35	-	12.14	0.31	7	11.51	11.20	-	12.42	0.44
Caudal peduncle length*	7	11.52	7.24	-	12.41	1.89	7	14.88	12.73	-	16.34	1.30	7	12.88	12.03	-	13.58	0.61
Pectoral-fin length	7	18.40	14.62	-	20.11	1.76	7	18.05	16.67	-	19.91	1.07	7	18.56	16.14	-	19.25	1.11
Pelvic-fin length	7	14.70	10.54	-	15.89	1.86	7	14.39	14.05	-	14.87	0.28	7	14.76	13.62	-	15.76	0.68
Dorsal-fin base length	7	13.40	10.39	-	14.42	1.41	7	13.95	12.61	-	15.04	1.01	7	13.53	12.81	-	14.05	0.45
Dorsal-fin depth	7	23.45	19.76	-	25.19	1.83	7	21.74	20.89	-	22.42	0.65	7	23.30	21.38	-	24.52	1.26
Anal-fin base length*	7	26.44	25.06	-	28.26	1.13	7	20.47	19.86	-	20.88	0.41	7	23.71	22.12	-	25.51	1.07
Anal-fin lobe length	7	15.06	13.01	-	16.83	1.20	7	14.67	13.17	-	16.77	1.23	7	15.55	14.29	-	16.45	0.93
Eye to dorsal-fin origin	7	35.58	32.55	-	37.00	1.44	7	39.13	36.52	-	41.21	1.45	7	37.51	36.17	-	39.17	1.07
Dorsal-fin origin to caudal-fin base	7	53.67	51.26	-	55.40	1.66	7	50.65	45.68	-	55.51	3.77	7	53.72	51.82	-	54.82	1.04
Bony head length	7	24.38	23.80	-	25.05	0.49	7	25.51	23.15	-	27.31	1.75	7	25.69	25.43	-	26.68	0.45
Percentages of head length																		
Horizontal eye diameter*	7	35.59	30.69	-	38.23	2.61	7	27.36	25.19	-	29.37	1.63	7	30.45	27.49	-	32.81	1.80
Snout length	7	27.83	25.54	-	30.81	1.89	7	29.58	27.28	-	32.88	2.35	7	28.93	27.61	-	29.66	0.90
Least interorbital distance	7	33.29	31.40	-	35.40	1.72	7	36.22	31.94	-	40.61	3.36	7	33.36	31.20	-	35.85	2.06
Upper jaw length	7	44.12	41.66	-	46.92	2.18	7	45.47	41.19	-	50.35	3.55	7	42.18	40.72	-	44.11	1.07

Asterisks indicate most important characters.

Table S4. Coefficients of variables on the first, second and third principal components of traits studied for *Astyanax fasciatus*, *A. paranae* and *Astyanax* sp.

Characters	PC 1	PC 2	PC 3
Standard Length	0.19311	0.10844	0.10243
Depth at dorsal-fin origin	0.18713	0.18481	-0.12594
Snout to dorsal-fin origin	0.20909	0.043068	0.095554
Snout to pectoral-fin origin	0.2091	-0.055709	-0.033929
Snout to pelvic-fin origin	0.20911	0.043799	0.11973
Snout to anal-fin origin	0.20912	0.062206	0.098139
Caudal-peduncle depth*	0.20913	-0.31074	-0.15377
Caudal peduncle length*	0.20914	-0.57773	-0.14631
Pectoral-fin length	0.20915	0.062166	-0.21205
Pelvic-fin length	0.20916	-0.19054	-0.46304
Dorsal-fin base length	0.20917	0.042309	0.065869
Dorsal-fin depth	0.20918	0.15205	-0.19407
Anal-fin base length*	0.20919	0.48252	-0.25787
Anal-fin lobe length	0.2092	0.20052	-0.054426
Eye to dorsal-fin origin	0.20921	0.0075885	0.17393
Dorsal-fin origin to caudal-fin base	0.20922	0.16614	0.029744
Bony head length	0.20923	0.031913	0.18535
Horizontal eye diameter*	0.20924	0.3752	-0.24098
Snout length	0.20925	0.035377	0.41589
Least interorbital distance	0.20926	-0.006654	0.39942
Upper jaw length	0.20927	0.057524	0.25564
% variation	70.35	16.16	6.12

Asterisks indicate most important variables.

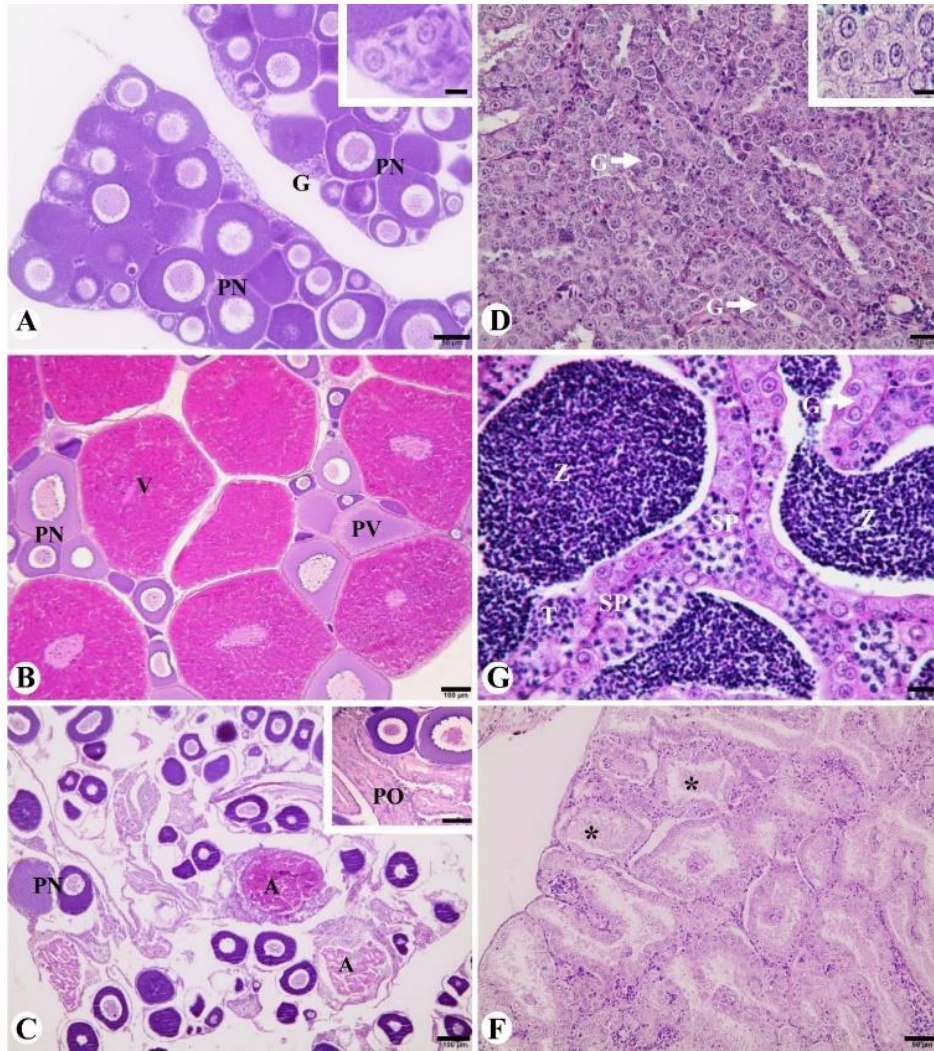


Figure S1. Histological sections of ovaries (A, B, C) and testes (D, E, F) of lambaris *A. paranae* and *A. fasciatus* in different gonad maturation stages stained with hematoxylin-eosin. A: Resting (F1) with ovigerous lamellae containing perinucleolar (PN) follicles and ovogonia (G) nests. B: Ripening/ripe (F2/3) with presence of perinucleolar (PN), pre-vitellogenic (PV) and vitellogenic (V) follicles. C: Spawned (F4) with atretic (A) and post-ovulatory (PO) follicles (detail) in regression and increased connective tissue between follicles. D: (M1) seminiferous tubules showing closed lumens and numerous spermatogonia (detail). E: (M2/3) cysts of germ cells in different developmental stages: spermatogonia (G), spermatocytes (SP), spermatids (T) and abundant spermatozoa (Z). F: (M4) seminiferous tubules (asterisks) with empty lumen or containing residual spermatozoa. Bar: (A) = 100 μm , detail = 7 μm ; (B) = 130 μm ; (C) = 170 μm , detail = 110 μm ; (D) = 17 μm , detail = 7 μm ; (E) = 13 μm ; (F) = 30 μm .

Table S5: Batch fecundity of *A. paranae* e *A. fasciatus* from the headwaters of Grande River

Species	Batch Fecundity		Relative Fecundity			
	Range	Mean	TL (cm)	BW (g)	GW (g)	r (GW)
<i>A. paranae</i>	2439-10217	5582.82 ± 413.04 ^a	575.55 ± 38.23 ^a	372.40 ± 21.49 ^a	1984.16 ± 81.91 ^a	0.848*
<i>A. fasciatus</i>	2676-8120	5668.57 ± 440.61 ^a	525.94 ± 41.06 ^a	325.51 ± 24.88 ^a	2662.84 ± 150.80 ^b	0.669*

Values represent mean ± SEM (µm). In a column, different letters indicate significant differences among the species. Pearson (r) correlation coefficient between batch fecundity and total length (TL), body weight (BW) and gonadal weight (GW). Asterisks indicate significant correlation between batch fecundity and GW.

Table S6: Diameters of female germ cells and nucleus of male germ cells in *A. paranae* e *A. fasciatus* captured on headwaters of the Grande River

	Females		Males		
	<i>A. paranae</i>	<i>A. fasciatus</i>	<i>A. paranae</i>	<i>A. fasciatus</i>	
G_A	14.08 ± 0.29 ^a	14.57 ± 0.33 ^a	G_A	6.37 ± 0.10 ^a	6.70 ± 0.12 ^a
G_B	10.83 ± 0.32 ^a	11.92 ± 0.33 ^b	G_B	4.62 ± 0.07 ^a	4.80 ± 0.08 ^a
PN₁	133.60 ± 1.89 ^a	146.70 ± 2.95 ^b	SP₁	3.70 ± 0.05 ^a	3.96 ± 0.05 ^b
PN₂	207.90 ± 4.49 ^a	229.90 ± 5.83 ^b	SP₂	2.29 ± 0.04 ^a	2.44 ± 0.03 ^b
PV	324.10 ± 5.48 ^a	341.90 ± 5.17 ^b	T	1.93 ± 0.02 ^a	1.87 ± 0.02 ^b
V	609.20 ± 5.90 ^a	598.80 ± 7.20 ^a	Z	1.84 ± 0.01 ^a	1.81 ± 0.01 ^a

Values represent mean ± SEM (µm). In a line, different letters indicate significant differences among the species, considering the same sex, $p < 0.05$, Mann-Whitney. (G_A) and (G_B): type A and type B oogonia or spermatogonia; (PN₁ and PN₂) initial and advanced perinucleolar oocytes, (PV) pre-vitellogenic and (V) vitellogenic oocytes; (SP₁ and SP₂) primary and secondary spermatocytes; (T) spermatids; (Z) spermatozoa.

Table S7: Mean genetic distance for the COI gene (%) between the different lambari morphotypes captured on headwaters of Grande River and reference sequences

Morphotypes	1	2	3	4	5	6
1. <i>A. paranae</i>	-					
2. <i>Astyanax</i> sp. clade <i>paranae</i>	0.2	-				
3. <i>Astyanax</i> sp. clade <i>fasciatus</i>	2.2	2.2	-			
4. <i>A. fasciatus</i>	2.2	2.2	0.0	-		
5. Reference <i>A. paranae</i>	0.5	0.6	2.5	2.5	-	
6. Reference <i>A. fasciatus</i>	2.2	2.2	0.0	0.0	2.5	-

3.2 Capítulo II: Autofagia e apoptose durante degeneração e remodelamento gonadal de peixes híbridos (*artigo em construção - a ser submetido na revista *Reproduction Fertility and Development**)

Autofagia e apoptose durante degeneração e remodelamento gonadal de peixes híbridos

ABSTRACT

Although it is known that meiosis failures can trigger hybrid infertility, the pathways involved in this process, which lead to morphological alterations in gonads, were not reported. Thus, the aim of this study was to test the hypothesis that autophagy, apoptosis and extracellular matrix proteins are involved in the germ cell degeneration process and tissue remodeling of infertile hybrid fish gonads. For this, we did morphological analyzes by transmission electron microscopy and routine histology, and immunolocalized the proteins Beclin1, CathepsinD, Caspase3, Fibronectin and Collagen type I in gonads of hybrids and their parental species *A. fasciatus* and *A. paranae*. Morphological analysis of hybrids gonads showed wide vacuolization, loss of tissue organization in germ cells cysts or nests, increased interstitial tissue and inflammatory infiltrate, as well as degenerated oogonia and spermatocytes with apoptotic characteristics. Beclin1, CathepsinD and Caspase3 were immunolocalized in germ cells and Fibronectin and Caspase3 were observed in the interstitial tissue. For all proteins analyzed the quantification showed that hybrid gonads had statistically greater marked area ($p < 0.05$), while the parental species did not show significant difference, except for Fibronectin, which was more expressed in *A. fasciatus* than *A. paranae*. Our results showed that the dynamics of gonadal degeneration of infertile hybrids involves the interruption of meiosis and vacuolization of germ cells, followed by autophagy, cathepsin-dependent lysosomal degradation, cell death and tissue remodeling with fibrosis.

INTRODUÇÃO

A gametogênese é um processo fisiológico altamente regulado, que envolve diversas interações celulares e moleculares. Dessa forma, o desenvolvimento e manutenção de gônadas funcionais em peixes é dependente de fatores genéticos, bem como da expressão e/ou inibição de várias proteínas, que participam dos eventos mitóticos e meióticos desses órgãos (Patiño and Sullivan 2002; Miura and Miura 2003; Schulz *et al.* 2010; Melo *et al.* 2015; Ribeiro *et al.* 2017). Os eventos mitóticos estão relacionados à proliferação celular de ovogônias e espermatogônias localizadas no epitélio germinativo, as quais garantem o estoque dessas células nas gônadas dos peixes, consequentemente permitindo a produção contínua de gametas ao longo da vida desses

animais (Jalabert 2005; de Waal *et al.* 2009). Os eventos meióticos agem diretamente na produção de gametas a partir de ovogônias e espermatogônias. Durante a meiose, a segregação cromossômica é precedida pela recombinação gênica, na qual fragmentos de DNA são trocados entre pares de cromossomos homólogos, os quais então são separados após a primeira divisão meiótica (Whitaker 1996). Além de contribuir para a diversidade genética, a recombinação gênica garante que os cromossomos homólogos permaneçam pareados e unidos por meio de locais de *crossing over*, facilitando assim a segregação correta desses cromossomos durante a divisão meiótica (Ferguson *et al.* 2007).

A hibridação resultante do cruzamento entre espécies diferentes muitas vezes leva à formação de indivíduos contendo cromossomos extras, que não possuem pares homólogos e, portanto, não permitem uma divisão celular meiótica normal no momento da formação dos gametas (Bartley *et al.* 2001). Em mamíferos, cromossomos que faltam um local de recombinação podem ser removidos do *pool* meiótico devido à ativação de um ponto de verificação no paquíteno ou podem sofrer segregação anormal dos homólogos na meiose I, uma vez que não há *crossing over* para mantê-los juntos na placa metafásica (Martin 2006). Esses defeitos gerados por anormalidades cromossômicas e/ou segregação incorreta de cromossomos na anáfase I, geralmente culminam na interrupção da meiose e aneuploidia (Vendrell *et al.* 1999; Ma *et al.* 2006; Martin 2006; Ferguson *et al.* 2007), com consequentes alterações morfológicas gonadais e infertilidade nos híbridos (Shimizu *et al.* 1997; Wills *et al.* 2000; Fishelson 2003; Piva *et al.* 2018; Pinheiro *et al.* 2019).

A apoptose é um processo fisiológico regulado geneticamente e altamente conservado durante a evolução que elimina células desnecessárias ou danificadas durante o desenvolvimento, garantindo a homeostase do tecido (Jenkins *et al.* 2013). Esse processo de morte celular programada é caracterizado pela fragmentação do DNA, formando corpos apoptóticos que são posteriormente endocitados por células fagocíticas sem gerar uma reação inflamatória no tecido (Bangs *et al.* 2000). A apoptose é dependente da ação de uma maquinaria proteica especializada, incluindo uma família de proteases denominadas caspases (Djavaheri-Mergny *et al.* 2010). Dentre essas proteínas, a Caspase3 (Casp3) é considerada a principal efetora do processo apoptótico, sendo responsável pela ativação de endonucleases que fazem a quebra de proteínas citoplasmáticas estruturais e DNA, culminando nas mudanças morfológicas observadas nesse processo de morte celular (Kerr *et al.*, 1972). A apoptose é comumente observada em tecidos alterados por diferentes tipos de estímulos (Kaptaner and Ünal 2011; Morais

et al. 2012; Marcon *et al.* 2017; Cruz Vieira *et al.* 2019; Sales *et al.* 2020; Qiang and Cheng 2021) e foi também observada em gônadas de animais híbridos (Neves *et al.* 2002; Fishelson 2003; Pinheiro *et al.* 2019).

Estudos recentes têm demonstrado o papel da autofagia na indução da via apoptótica (Nikoletopoulou *et al.* 2013; Cassel *et al.* 2017; Sales *et al.* 2019). A autofagia é um processo catabólico de degradação lisossomal que, assim como a apoptose, é regulado geneticamente e altamente conservado (Yue *et al.* 2003; Kourtis and Tavernarakis 2009). Nesse processo ocorre a reciclagem de organelas citoplasmáticas e proteínas envelhecidas ou defeituosas (Cao and Klionsky 2007; Kang *et al.* 2011), contribuindo para a sobrevivência celular, diferenciação, desenvolvimento e homeostase dos tecidos (Kourtis and Tavernarakis 2009). Beclin1 é uma proteína-chave da via autofágica e tem como função promover a nucleação autofágica (formação dos vacúolos autofágicos a partir da expansão de membrana) e o recrutamento de proteínas citosólicas necessárias para a formação do autofagossomo (Kang *et al.* 2011). Assim como a autofagia, lisossomos também parecem possuir um papel na contribuição e/ou amplificação da morte celular (Serrano-Puebla and Boya 2018). Nesse contexto, enzimas hidrolíticas como CatepsinaD (Ctsd) são liberadas no citosol, participando da degradação de proteínas anti-apoptóticas, permeabilização da membrana mitocondrial e indução da morte celular (Gómez-Sintes *et al.* 2016).

Proteínas de matriz extracelular são especialmente importantes nos processos de remodelamento tecidual de ovários de peixes, ao longo da maturação gonadal e desova (Thomé *et al.* 2010). Similar ao processo degenerativo de atresia folicular, o tecido gonadal de híbridos pode passar por involução e remodelamento como consequência da infertilidade (Pinheiro *et al.* 2019). A Fibronectina (FN) é uma proteína de matriz extracelular importante nos processos de adesão, migração, crescimento e diferenciação celular (Rodgers *et al.* 2003). Além disso, a FN está relacionada à deposição de colágeno, provavelmente servindo de estrutura para o agrupamento das fibrilas, uma vez que em alguns sistemas essa proteína é necessária para a formação das fibrilas de colágeno (Sottile and Hocking 2002). Nesse sentido, alguns estudos têm demonstrado que o bloqueio da polimerização da fibronectina pode levar à melhora em quadros de fibrose em diferentes órgãos (Altrock *et al.* 2015; Valiente-Alandi *et al.* 2018). A fibrose é causada pela deposição excessiva de componentes da matriz extracelular, especialmente fibrilas colágenas, em resposta a injúrias nos tecidos, causando substituição do parênquima normal por tecido conjuntivo (Wynn 2008).

Embora seja reconhecido que falhas na meiose são gatilhos que podem levar à infertilidade de híbridos, poucos estudos investigaram a morfologia gonadal desses animais (Wills *et al.* 2000; Fishelson 2003; Park *et al.* 2003; Cal *et al.* 2010; Pinheiro *et al.* 2019) e nenhum deles buscou desvendar as vias de sinalização celular envolvidas nesse processo, que como consequência, levam às alterações morfológicas nas gônadas. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi testar a hipótese que autofagia, apoptose e proteínas de matriz extracelular estão envolvidas no processo de degeneração das células germinativas e remodelamento tecidual de gônadas de peixes híbridos inférteis.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem dos peixes

Exemplares de peixes híbridos (n = 10) e suas espécies parentais *Astyanax fasciatus* (n = 6) e *Astyanax paranae* (n = 6) foram coletados usando redes de emalhar na região de cabeceira do Rio Grande (22°13'7.04"S 44°32'23.14"W), sudeste do Brasil. Os animais capturados vivos foram eutanasiados por meio da imersão em eugenol 85 mg/L, seguindo os procedimentos indicados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O estudo foi aprovado pelo Instituto Estadual de Florestas (IEF – licença no. 153) e pelo Comitê de Ética no Uso Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA-UFMG, protocolo no. 92). Amostras da região média das gônadas dos animais foram coletadas para análises morfológicas. A confirmação do processo de hibridação natural entre as duas espécies de lambaris, dando origem a híbridos inférteis foi reportada por Pinheiro *et al.*, (2019).

Exemplares de *A. fasciatus* e *A. paranae* em repouso gonadal foram utilizados como controle para comparação com as gônadas inférteis dos híbridos. O estágio reprodutivo de repouso em fêmeas é caracterizado pela presença de lamelas ovulíferas organizadas contendo apenas ovogônias, ovócitos iniciais e perinucleolares com suas camadas envoltórias (células foliculares e teca conjuntiva) e, portanto, ausência de ovócitos pré-vitelogênicos e vitelogênicos. Em machos, esse estágio apresenta gônada formada por túbulos seminíferos com lumes fechados e cistos contendo apenas espermatogônias e, eventualmente, alguns espermatócitos; portanto, espermátides e espermatozoides estão ausentes. Dessa forma, os animais do grupo controle, assim como os híbridos, não apresentaram gametas.

Microscopia de luz e eletrônica

Para análise histológica da gametogênese, amostras de gônadas foram fixadas em líquido de Bouin por 24h. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol, embebidas em parafina, seccionadas com 5 µm de espessura e coradas com hematoxilina-eosina (HE).

Para análises ultraestruturais, fragmentos de gônadas foram fixados em solução de Karnovsky modificada (glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 2%) por 24 horas a 4°C. Posteriormente, as amostras foram transferidas para tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,3 e mantidas nessa solução a 4°C. No Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) as amostras foram lavadas em tampão fosfato e então submetidas à fixação secundária em tetróxido de ósmio 2% por 2 horas em temperatura ambiente. Após lavagem com água, as amostras foram incubadas em solução de sacarose com acetato de uranila 4% overnight. Em seguida, foram desidratadas em etanol e incluídas em resina Epon. As secções ultrafinas foram contrastadas com citrato de chumbo e, finalmente, observadas ao microscópio eletrônico de transmissão a 120 kV (Tecnai G2-12 – Spirit Biotwin FEI) do Centro de Microscopia da UFMG.

Imunofluorescência

Para estudo da degeneração celular e remodelamento tecidual, as proteínas listadas na Tabela 1 foram imunolocalizadas nas gônadas dos peixes. Para isso, amostras de gônadas foram fixadas em solução de paraformaldeído 4% por 24h e os cortes seccionados com 5 µm de espessura foram submetidos à reativação antigênica em tampão citrato 10mM, pH 6.0 em banho maria com água fervente por 20 minutos. Para bloqueio de ligações inespecíficas, utilizou-se solução de BSA 2% em PBS sobre os cortes por 30 minutos. Posteriormente, os cortes foram incubados com os anticorpos primários listados na Tabela 1 (diluição 1:100) overnight a 4°C em uma câmara úmida. Em seguida os cortes foram lavados em PBS e incubados com o anticorpo secundário Cy5 (Tabela 1) na diluição 1:500. Os núcleos foram marcados com 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI; 1:2000; Sigma Aldrich, St. Louis). Para controle negativo, a cada experimento um dos cortes não recebeu anticorpo primário. As secções foram examinadas em um microscópio de fluorescência Axio Imager Z2 – ApoTome 2 Zeiss do Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Tabela 1: Anticorpos utilizados nas análises de imunofluorescência

Anticorpo	Fornecedor
Beclin1 polyclonal rabbit	Santa Cruz Biotechnology
CathepsinD polyclonal rabbit	Abcam
Caspas3 active polyclonal rabbit	Sigma Aldrich
Fibronectin polyclonal rabbit	Santa Cruz Biotechnology
Collagen type I polyclonal rabbit	Rockland
Cy5 polyclonal goat anti-rabbit IgG	Thermo Fisher Scientific

Morfometria

A proporção de área marcada pelas proteínas imunolocalizadas neste estudo foi calculada utilizando o plugin IHC Toolbox do software ImageJ de acordo com Paschoalini *et al.* (2019). A função “colourpicker” foi usada para selecionar manualmente as regiões de reação positiva para as proteínas. Então as regiões selecionadas foram ajustadas na ferramenta “threshold” para remoção do background e isolamento das regiões de marcação específica. Finalmente, as imagens foram transformadas em imagens binárias e foram analisadas e quantificadas no ImageJ. Os resultados são expressos como porcentagem de área marcada (reações imunofluorescentes positivas) em relação ao campo total amostrado. Foram analisadas secções histológicas de 3 a 5 animais e um total de 15 a 30 imagens randômicas com aumento de 400x de cada grupo experimental (*A. fasciatus*, *A. paranae* e híbridos – fêmeas e machos) foi utilizado para a quantificação de cada proteína analisada.

Análises estatísticas

O software Bioestat foi utilizado para realização do teste de normalidade de Lilliefors e o software Graphpad versão 5 foi utilizado para realização do teste Kruskal-Wallis seguido do teste post-hoc de Dunn. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão e as diferenças foram consideradas significantes com $p < 0.05$.

RESULTADOS

Análises histológicas das gônadas dos peixes híbridos mostraram que fêmeas apresentam ovogônias e alguns ovócitos perinucleolares. Machos apresentaram espermatogônias e espermatócitos. Esses resultados mostram que os híbridos não são

capazes de atingir maturação gonadal devido à completa ausência de espermatídes e espermatozoides em testículos e ovócitos pré-vitelogênicos e vitelogênicos em ovários. Além disso, o tecido gonadal dos híbridos apresentou alterações morfológicas quando comparado com as espécies parentais *A. fasciatus* e *A. paranae*.

Nos híbridos, foram observadas ampla vacuolização das células, perda da organização tecidual em cistos ou ninhos de células germinativas, grande quantidade de tecido intersticial e infiltrado inflamatório, além de ovogônias e espermatócitos em degeneração, com sinais de apoptose (**Figura 1A-D**), características ausentes nas espécies parentais. Na microscopia eletrônica de transmissão frequentemente foram observadas estruturas autofágicas como autofagossomos contendo organelas em degeneração, autofagolisossomos, e corpos multilamelares (**Figura 1E-G**). Além disso, uma quantidade marcante de fibras colágenas foi observada nas gônadas dos híbridos (**Figura 1H**).

A análise histológica das gônadas dos híbridos mostrou três padrões de organização tecidual: pouco alterado, intermediário e muito alterado. Nos indivíduos com padrão gonadal pouco alterado foram observados alguns cistos de espermatogônias e espermatócitos morfolologicamente normais em machos, enquanto em fêmeas algumas ovogônias normais e ovócitos perinucleolares foram encontrados. No padrão intermediário de alterações gonadais, fêmeas e machos apresentaram a maior parte das células germinativas alteradas, com características apoptóticas e gônadas com padrão de organização irregular, sem cistos e ninhos de células bem definidos. Por fim, os animais com padrão gonadal muito alterado apresentaram grande predominância de tecido conjuntivo, células em processo final de degeneração (sem núcleo) e regiões de espaços brancos evidenciando ausência de células do parênquima e apenas células intersticiais e matriz extracelular.

Para investigar a existência de autofagia em gônadas de híbridos, a imunolocalização de Beclin1 foi realizada. Beclin1 foi frequentemente observada em ovogônias (incluindo ovogônias em degeneração) e espermatogônias em grânulos citoplasmáticos margeando a região do núcleo; em ovócitos perinucleolares e espermatócitos em degeneração a imunofluorescência foi menos frequente (**Figura 1I-J, M-N, Q-R**). Em ovócitos perinucleolares, a marcação foi observada ao longo de todo o citoplasma. Com menor frequência, algumas células somáticas, como células foliculares, células da teca e outras células do conjuntivo também se mostraram positivas para esta proteína. A quantificação da imunomarcação para Beclin1 em gônadas de híbridos

comparada à das gônadas em repouso das espécies parentais *A. fasciatus* e *A. paranae* mostrou que híbridos apresentam maior área marcada por esta proteína autofágica ($p < 0.05$), enquanto a comparação entre as duas espécies parentais não mostrou diferença significativa para machos nem para fêmeas (**Figura 2A-B**).

Para confirmar a ocorrência de degradação autofágica de componentes celulares por meio da ação de enzimas lisossomais, a imunofluorescência para a proteína Ctsd foi realizada. O padrão de marcação para a proteína Ctsd foi muito similar ao observado para Beclin1 (**Figura 1K-L, O-P, S-T**). A área do tecido gonadal marcada foi maior em híbridos (machos e fêmeas) quando comparado às espécies parentais em repouso reprodutivo ($p < 0.0001$), enquanto as duas espécies parentais não apresentaram diferença significativa na área total marcada para esta proteína (**Figura 2C-D**).

Para constatar se as alterações morfológicas observadas nos híbridos, bem como a ocorrência de autofagia foram capazes de desencadear a morte celular no tecido gonadal, a imunomarcação para Casp3 foi realizada. Em fêmeas, ovogônias (incluindo ovogônias em degeneração), ovócitos perinucleolares iniciais e avançados e células foliculares apresentaram marcação positiva, enquanto em machos a imunorreatividade foi observada em espermatogônias, espermátocitos em degeneração e eventualmente em células do interstício (**Figura 3A-C; Figura 4A-C**). Gônadas de animais híbridos (machos e fêmeas) apresentaram área marcada para Caspase3 significativamente maior do que observado para as espécies parentais ($p < 0.0001$) (**Figura 5A-B**). A comparação da área marcada nas espécies parentais mostrou que não há diferença significativa na expressão de Casp3 nas gônadas desses animais.

Para investigar a dinâmica do tecido intersticial nas gônadas dos peixes híbridos, as proteínas marcadoras de matriz extracelular FN e Colágeno tipo I foram imunolocalizadas nesses animais, quantificadas e comparadas com as espécies parentais. O padrão de reatividade dessas proteínas foi similar entre os animais amostrados, sendo positivo para regiões de limite entre cistos e ninhos vizinhos de células germinativas, ao redor de ovócitos, no citoplasma de células do interstício e eventualmente nos espaços entre as células germinativas (**Figura 3D-I; Figura 4D-I**). A quantificação dessas proteínas mostrou que fêmeas híbridas apresentam área marcada por fibronectina significativamente maior que as fêmeas das suas espécies parentais ($p < 0.0001$) (**Figura 5C-D**). Ao comparar os tecidos dessas duas espécies, utilizados como controle nesse estudo, observou-se que *A. paranae* apresenta menor quantidade de FN imunomarcada em suas gônadas do que *A. fasciatus*. Este padrão foi exclusivamente observado para esta

proteína, uma vez que as demais proteínas analisadas não apresentaram diferenças marcantes entre as espécies parentais. Nos machos híbridos foi observada maior área gonadal marcada por FN em comparação com as espécies *A. fasciatus* e *A. paranae* ($p < 0.05$), enquanto a comparação entre essas duas espécies parentais não mostrou diferença significativa. Em relação ao Colágeno tipo I, fêmeas e machos de peixes híbridos apresentaram maior área de tecido marcada do que as espécies parentais (**Figura 4E-F**).

DISCUSSÃO

Em gônadas de peixes, as vias autofágica e apoptótica apresentam importante papel na homeostase tecidual e no desenvolvimento normal de gametas (Choi *et al.* 2010; Cassel *et al.* 2017; Ribeiro *et al.* 2017). Entretanto, alterações nessas vias, que atuam em cooperação, resultantes da exposição a fatores estressores podem levar à redução da fertilidade em algumas espécies (Xue *et al.* 1999; Bursch 2001; Sales *et al.* 2020). A infertilidade está relacionada a diversas alterações morfológicas gonadais em peixes (Shimizu *et al.* 1997; Wills *et al.* 2000; Fishelson 2003; Pinheiro *et al.* 2019). Neste estudo, nós mostramos pela primeira vez a atuação das vias autofágica, lisossomal e apoptótica nas gônadas de peixes em resposta à infertilidade causada por hibridação.

Usando uma abordagem multidisciplinar, com técnicas morfométricas, morfológicas e de biologia molecular, estudo recente detectou a presença de híbridos naturais, resultantes do cruzamento das espécies *A. fasciatus* e *A. paranae* na cabeceira do Rio Grande (sudeste do Brasil), região com boas condições de preservação ambiental (Pinheiro *et al.* 2019). Continuando este estudo, análises ultraestruturais evidenciaram a presença de autofagossomos, autofagolisossomos e corpos multilamelares em células germinativas e somáticas de híbridos, sugerindo autofagia na gônada desses animais. A imunofluorescência para a proteína Beclin1 confirmou a ocorrência de autofagia nos animais, com maior área gonadal marcada nos híbridos. A autofagia é primariamente um mecanismo de sobrevivência celular, que por meio da degradação e reciclagem de produtos da célula gera nutrientes e energia para manter a sua viabilidade (Debnath *et al.* 2005). De fato, a atuação inicial da autofagia nas gônadas dos híbridos pode ser uma tentativa de manutenção deste órgão em funcionamento, apesar das alterações causadas pela hibridação. Neste sentido a autofagia tem o papel de manter a homeostase através de *cell clearance*, remoção seletiva de agregados proteicos e organelas disfuncionais, como reportado em estudos anteriores (Ryter *et al.* 2013; Sever and Demir 2017).

Entretanto, à medida que a maioria das células germinativas dos híbridos não foi capaz de avançar no processo meiótico, tornando inviável a fertilidade da gônada, a autofagia pode ter atuado na ativação da via de morte celular por apoptose. Estudos indicam esse papel circunstancial da autofagia, ora agindo como forma de adaptação ao estresse celular, possivelmente inibindo a via apoptótica, ora agindo de forma inversa, induzindo as diferentes vias de sinalização da morte celular (Galluzzi *et al.* 2018; Denton and Kumar 2019; Chang 2020). De fato, em exposições prolongadas ao estresse metabólico, a autofagia tende a atuar contribuindo para o fornecimento de energia para execução da apoptose (Chiarelli *et al.* 2014; Kriel and Loos 2019), uma vez que uma autofagia exacerbada pode levar à clivagem de moléculas e organelas indispensáveis para a viabilidade da célula (Gómez-Sintes *et al.* 2016).

Tanto na degradação autofágica de componentes celulares, como na contribuição para a morte celular, a atuação dos lisossomos é essencial (Turk and Turk 2009; Gómez-Sintes *et al.* 2016). Dessa forma, a imunolocalização de Ctsd nesse estudo indica a participação ativa dos lisossomos no processo de alteração do tecido gonadal por hibridação. Ctsd pode ter dois modos de ação, dependendo do seu local na célula: quando localizada no interior dos lisossomos, sua atuação ocorre no processo de degradação de componentes celulares via autofagia; quando liberada no citosol, essa proteína age direcionando o processo de morte celular por apoptose (Repnik *et al.* 2012; Kavčič *et al.* 2017). A liberação de Ctsd no citosol se dá após a desestabilização da membrana lisossomal e ação dessa protease no citoplasma leva a distúrbios na membrana mitocondrial, culminando no processo de ativação de caspases e, conseqüentemente, apoptose (Repnik *et al.* 2012; Gómez-Sintes *et al.* 2016). Nesse sentido, a liberação de Ctsd no citoplasma das células germinativas dos híbridos pode ter levado ao aumento da apoptose nas gônadas.

Apoptose em gônadas está associada à exposição de peixes a diversos tipos de fatores estressores, como variações em parâmetros físico-químicos da água, salinidade, desreguladores endócrinos e restrição alimentar (Kaptaner and Ünal 2011; Thomé *et al.* 2012; Marcon *et al.* 2017; Cruz Vieira *et al.* 2019; Sales *et al.* 2020; Qiang and Cheng 2021). O processo de hibridação como fator estressor das gônadas, culminando em infertilidade e apoptose de células germinativas foi relatado por alguns autores (Neves *et al.* 2002; Fishelson 2003; Pinheiro *et al.* 2019). Neste estudo nós mostramos que a quantidade de Casp3 marcada está aumentada nas gônadas dos peixes híbridos, indicando

uma maior frequência de morte celular por apoptose nas células germinativas, o que possivelmente contribui para remodelação das gônadas.

Nas amostras histológicas dos híbridos foi observada frequentemente a modificação da estrutura tecidual, com perda do padrão de organização de células germinativas em cistos no caso dos machos ou em ninhos e lamelas no caso das fêmeas, indicando um processo de remodelação desse tecido. Os resultados deste estudo sugerem que após a morte de grande quantidade de células nas gônadas dos peixes híbridos, iniciou-se um processo de cicatrização com fibrose, ocorrendo substituição por tecido conjuntivo na área anteriormente ocupada por parênquima (Wynn 2008). Na fibrose hepática humana foi observado aumento da quantidade de vários tipos de colágeno e expressão relativa de colágeno tipo I (Aycock and Seyer 1989). Além do colágeno, a proteína fibronectina desempenha um papel fundamental durante o processo de fibrose em vários órgãos (Muro *et al.* 2008; Altrock *et al.* 2015; Valiente-Alandi *et al.* 2018). Nesse sentido, o aumento da imunolocalização das proteínas Colágeno tipo I e FN nas gônadas de peixes híbridos observadas no presente estudo sustentam a nossa hipótese de que o processo final de alterações gonadais geradas pela hibridação e infertilidade culminam em fibrose. De fato, Fishelson (2003) observou espessamento do tecido conjuntivo em gônadas de peixes híbridos com degeneração e apoptose de células germinativas. Além disso, a presença de infiltrado inflamatório nas gônadas dos híbridos foi frequentemente observada, o que possivelmente está relacionado ao processo fibrótico, uma vez que as células inflamatórias participam do desenvolvimento de fibrose (Iredale 2007; Wynn and Barron 2010).

Nossos resultados mostraram que a dinâmica de degeneração gonadal de híbridos inférteis, resultantes do cruzamento entre as espécies *A. fasciatus* e *A. paranae* envolve um processo de subseqüentes alterações que começam com a interrupção da meiose e vacuolização das células germinativas, seguidas de ativação das vias autofágica, de degradação lisossomal dependente de Ctsd, e apoptótica, que por sua vez precedem o processo de remodelamento tecidual com fibrose por meio de deposição de proteínas de matriz extracelular como fibronectina e colágeno tipo I. Embora o processo de interrupção da meiose em híbridos gerando alterações morfológicas nas gônadas tenha sido indicado anteriormente para os *Astyanax* do presente estudo e para outras espécies de peixes (Wills *et al.*, 2000; Fishelson, 2003; Piva *et al.*, 2018; Pinheiro *et al.*, 2019), as vias de sinalização celular envolvidas nas alterações morfológicas em gônadas de híbridos não foram investigadas. Desta forma, o presente estudo contribui para o avanço do conhecimento

dos mecanismos envolvidos na infertilidade causada por hibridação interespecífica de peixes.

LEGENDAS DAS FIGURAS:

Figura 1: Morfologia gonadal dos híbridos e imunolocalização de Beclin1 e Ctsd em híbridos e suas espécies parentais – hematoxilina-eosina: A-D; microscopia eletrônica de transmissão: E-H; imunofluorescência: I-L (híbridos) e M-T (espécies parentais). **A:** gônada de macho híbrido exibindo espermatócitos em degeneração (SP*) com característica apoptótica de cromatina anexada ao envoltório nuclear (detalhe). **B:** macho híbrido apresentando gônada sem padrão de organização em cistos, com espermatogônias (Go) espalhadas pelo tecido e presença de grande quantidade de tecido intersticial (TI). **C:** fêmea híbrida apresentando ninhos de ovogônias normais (Ov) e em degeneração (Ov*), além de ovócito perinucleolar inicial (O1) e infiltrado inflamatório (IF). **D:** fêmea híbrida apresentando tecido gonadal totalmente alterado, com abundância de tecido intersticial (TI), células germinativas em processo final de degeneração - ausência de núcleos (*), além de um ovócito perinucleolar em degeneração (O1*). **E:** autofagossomo contendo mitocôndrias (Mi) em processo de degradação em célula germinativa de híbrido. **F:** autofagolisossomo (AL) – lisossomo fundido com autofagossomo apresentando regiões elétron-densas e elétron-lúcidas (contendo conteúdo do autofagossomo). **G:** Corpos multilamelares em espermatócitos de híbridos e mitocôndrias (Mi). **H:** excesso de tecido conjuntivo com fibras colágenas (Fc) e fibroblasto (Fi) em gônada de híbrido. **I:** ovário de híbrido mostrando marcação positiva para Beclin1 em ovogônias normais (Ov) e alteradas (Ov*). **J:** testículo de híbrido mostrando marcação positiva para Beclin1 em espermatogônias (Go) e espermatócitos em degeneração (SP*). **K:** ovário de híbrido mostrando marcação positiva para Ctsd em ovogônias (Ov) e células foliculares (seta). **L:** testículo de híbrido mostrando marcação positiva para Ctsd em espermatogônias (Go). **M:** ovário de *A. fasciatus* apresentando marcação positiva para Beclin1 em ovogônias (Ov). **N:** testículo de *A. fasciatus* apresentando marcação positiva para Beclin1 em espermatogônias (Go). **O:** ovário de *A. fasciatus* apresentando fraca marcação positiva para Ctsd em ovogônias (Ov) e célula da teca conjuntiva (ponta de seta). **P:** testículo de *A. fasciatus* apresentando fraca marcação positiva para Ctsd em algumas espermatogônias (Go) do cisto. **Q:** ovário de *A. paranae* apresentando marcação positiva para Beclin1 em ovócitos perinucleolares iniciais (O1) e células foliculares

(seta). **R:** testículo de *A. paranae* apresentando marcação positiva para Beclin1 em algumas espermatogônias (Go). **S:** ovário de *A. paranae* apresentando fraca marcação para Ctsd em ovócitos perinucleolares (O1) e ovogônias (Ov). **T:** testículo de *A. paranae* apresentando fraca marcação para Ctsd em espermatogônias (Go). Barras: A-D = 20 μm ; E, F e H = 1 μm ; G = 200 nm; I, J, P, Q, R e T = 3 μm ; K e S = 4 μm ; L, M e O = 7 μm ; N = 5 μm .

Figura 2: Proporção relativa de área marcada para as proteínas Beclin1 e Ctsd em reações de imunofluorescência em fêmeas (A, C) e machos (B, D) de *A. fasciatus*, *A. paranae* e híbridos interespecíficos. Valores são expressos como média \pm EP. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as áreas marcadas pelas proteínas ($p < 0,05$ - Kruskal-Wallis).

Figura 3: Imunolocalização das proteínas Caps3, FN e Colágeno tipo I em ovários de *A. fasciatus*, *A. paranae* e híbridos interespecíficos. **A:** reação positiva para Casp3 em ovócito perinucleolar inicial (O1) e células foliculares (seta) de *A. fasciatus*. **B:** marcação para Casp em células foliculares (seta) de *A. paranae*. **C:** ovogônias (Ov) e células foliculares de híbridos mostrando marcação positiva para Casp3. **D e E:** marcação positiva para FN ao redor dos ovócitos em *A. fasciatus* e *A. paranae* (células foliculares e da teca conjuntiva). **F:** intensa marcação para FN em regiões de tecido intersticial de fêmeas híbridas - entre ninhos de células germinativas e ao redor de ovócitos perinucleolares. **G:** reação positiva para Colágeno tipo I em regiões de tecido intersticial e ao redor de ovócitos de *A. fasciatus*. **H:** ovócito exibindo marcação positiva para Colágeno tipo I em suas camadas envoltórias. **I:** intensa marcação para Colágeno tipo I em região de tecido intersticial (TI) de fêmeas híbridas. Barras: A e B = 4 μm ; C e E = 5 μm ; D = 9 μm ; F e H = 10 μm ; G = 3 μm ; I = 7 μm .

Figura 4: Imunolocalização das proteínas Caps3, FN e Colágeno tipo I em testículos de *A. fasciatus*, *A. paranae* e híbridos interespecíficos. **A:** fraca marcação para Casp3 em espermatogônias (Go) e células do interstício (TI) em *A. fasciatus*. **B:** marcação positiva para Casp3 em algumas espermatogônias (Go) de *A. paranae*. **C:** híbridos apresentando forte reação imunofluorescente para Caps3 em algumas espermatogônias (Go) e espermatócitos em degeneração (SP*). **D e E:** reação positiva para FN em tecido intersticial (TI) de *A. fasciatus* e *A. paranae* entre cistos de células germinativas. **F:**

intensa reação positiva para FN em tecido intersticial (TI) de híbrido, mostrando grande quantidade desse tecido entre as células germinativas. **G e H:** reação positiva para Colágeno tipo I principalmente na periferia das gônadas de *A. fasciatus* e *A. paranae*, mostrando pequena quantidade de tecido intersticial (TI) nesses animais. **I:** intensa marcação para Colágeno tipo I em machos híbridos, mostrando região com grande quantidade de tecido intersticial (TI) e pouco parênquima gonadal com células germinativas. Barras: A, B, G e I = 4 μm ; C = 3 μm ; D = 7 μm ; E = 6 μm ; F = 10 μm ; H = 5 μm .

Figura 5: Proporção relativa de área marcada para as proteínas Casp3, FN e Colágeno tipo I em reações de imunofluorescência em fêmeas (A, C, E) e machos (B, D, F) de *A. fasciatus*, *A. paranae* e híbridos interespecíficos. Valores são expressos como média \pm EP. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as áreas marcadas pelas proteínas ($p < 0,05$ - Kruskal-Wallis).

REFERÊNCIAS

- Altrock E., Sens C., Wuerfel C., Vasel M., Kawelke N., Dooley S., Sottile J., and Nakchbandi I. A. (2015). Inhibition of fibronectin deposition improves experimental liver fibrosis. *J. Hepatol.* **62**, 625–633.
doi:10.1016/j.jhep.2014.06.010
- Aycock R. S., and Seyer J. M. (1989). Collagens of normal and cirrhotic human liver. *Connect. Tissue Res.* **23**, 19–31. doi:10.3109/03008208909103901
- Bangs P., Franc N., and White K. (2000). Molecular mechanisms of cell death and phagocytosis in *Drosophila*. *Cell Death Differ.* **7**, 1027–1034.
doi:10.1038/sj.cdd.4400754
- Bartley D. M., Rana K., and Immink A. J. (2001). The use of inter-specific hybrids in aquaculture and fisheries. *Rev. Fish Biol. Fish.* **10**, 325–337.
doi:10.1023/A:1016691725361
- Bursch W. (2001). The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death and Differentiation* **8**, 569–581. doi:10.1038/sj.cdd.4400852
- Cal R., Terrones J., Vidal S., Martínez P., and Piferrer F. (2010). Differential incidence of gonadal apoptosis in triploid-induced male and female turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* **307**, 193–200. doi:10.1016/j.aquaculture.2010.07.020

- Cao Y., and Klionsky D. J. (2007). Physiological functions of Atg6/Beclin 1: A unique autophagy-related protein. *Cell Res.* **17**, 839–849. doi:10.1038/cr.2007.78
- Cassel M., Camargo M. D. P., Jesus L. W. O., and Borella M. I. (2017). Involution processes of follicular atresia and post-ovulatory complex in a characid fish ovary : a study of apoptosis and autophagy pathways. *J. Mol. Histol.* **48**, 243–257. doi:10.1007/s10735-017-9723-6
- Chang N. C. (2020). Autophagy and Stem Cells: Self-Eating for Self-Renewal. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, 1–11. doi:10.3389/fcell.2020.00138
- Chiarelli R., Agnello M., Bosco L., and Roccheri M. C. (2014). Sea urchin embryos exposed to cadmium as an experimental model for studying the relationship between autophagy and apoptosis. *Mar. Environ. Res.* **93**, 47–55. doi:10.1016/j.marenvres.2013.06.001
- Choi J. Y., Jo M. W., Lee E. Y., Yoon B. K., and Choi D. S. (2010). The role of autophagy in follicular development and atresia in rat granulosa cells. *Fertil. Steril.* **93**, 2532–2537. doi:10.1016/j.fertnstert.2009.11.021
- Cruz Vieira A. B., Weber A. A., Ribeiro Y. M., Luz R. K., Bazzoli N., and Rizzo E. (2019). Influence of salinity on spermatogenesis in adult Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) testis. *Theriogenology* **131**, 1–8. doi:10.1016/j.theriogenology.2019.03.013
- Debnath J., Baehrecke E. H., and Kroemer G. (2005). Does autophagy contribute to cell death? *Autophagy* **1**, 66–74. doi:10.4161/auto.1.2.1738
- Denton D., and Kumar S. (2019). Autophagy-dependent cell death. *Cell Death Differ.* **26**, 605–616. doi:10.1038/s41418-018-0252-y
- Djavaheri-Mergny M., Maiuri M. C., and Kroemer G. (2010). Cross talk between apoptosis and autophagy by caspase-mediated cleavage of Beclin 1. *Oncogene* **29**, 1717–1719. doi:10.1038/onc.2009.519
- Ferguson K. A., Wong E. C., Chow V., Nigro M., and Ma S. (2007). Abnormal meiotic recombination in infertile men and its association with sperm aneuploidy. *Hum. Mol. Genet.* **16**, 2870–2879. doi:10.1093/hmg/ddm246
- Fishelson L. (2003). Comparison of testes structure, spermatogenesis, and spermatocytogenesis in young, aging, and hybrid cichlid fish (Cichlidae, Teleostei). *J. Morphol.* **256**, 285–300. doi:10.1002/jmor.10089
- Galluzzi L., Vitale I., Aaronson S. A., Abrams J. M., Adam D., Agostinis P., Alnemri E. S., Altucci L., Amelio I., Andrews D. W., Annicchiarico-Petruzzelli M., Antonov

A. V., Arama E., Baehrecke E. H., Barlev N. A., Bazan N. G., Bernassola F., Bertrand M. J. M., Bianchi K., Blagosklonny M. V., Blomgren K., Borner C., Boya P., Brenner C., Campanella M., Candi E., Carmona-Gutierrez D., Cecconi F., Chan F. K. M., Chandel N. S., Cheng E. H., Chipuk J. E., Cidlowski J. A., Ciechanover A., Cohen G. M., Conrad M., Cubillos-Ruiz J. R., Czabotar P. E., D'Angiolella V., Dawson T. M., Dawson V. L., De Laurenzi V., De Maria R., Debatin K. M., Deberardinis R. J., Deshmukh M., Di Daniele N., Di Virgilio F., Dixit V. M., Dixon S. J., Duckett C. S., Dynlacht B. D., El-Deiry W. S., Elrod J. W., Fimia G. M., Fulda S., García-Sáez A. J., Garg A. D., Garrido C., Gavathiotis E., Golstein P., Gottlieb E., Green D. R., Greene L. A., Gronemeyer H., Gross A., Hajnoczky G., Hardwick J. M., Harris I. S., Hengartner M. O., Hetz C., Ichijo H., Jäättelä M., Joseph B., Jost P. J., Juin P. P., Kaiser W. J., Karin M., Kaufmann T., Kepp O., Kimchi A., Kitsis R. N., Klionsky D. J., Knight R. A., Kumar S., Lee S. W., Lemasters J. J., Levine B., Linkermann A., Lipton S. A., Lockshin R. A., López-Otín C., Lowe S. W., Luedde T., Lugli E., MacFarlane M., Madeo F., Malewicz M., Malorni W., Manic G., Marine J. C., Martin S. J., Martinou J. C., Medema J. P., Mehlen P., Meier P., Melino S., Miao E. A., Molkentin J. D., Moll U. M., Muñoz-Pinedo C., Nagata S., Nuñez G., Oberst A., Oren M., Overholtzer M., Pagano M., Panaretakis T., Pasparakis M., Penninger J. M., Pereira D. M., Pervaiz S., Peter M. E., Piacentini M., Pinton P., Prehn J. H. M., Puthalakath H., Rabinovich G. A., Rehm M., Rizzuto R., Rodrigues C. M. P., Rubinsztein D. C., Rudel T., Ryan K. M., Sayan E., Scorrano L., Shao F., Shi Y., Silke J., Simon H. U., Sistigu A., Stockwell B. R., Strasser A., Szabadkai G., Tait S. W. G., Tang D., Tavernarakis N., Thorburn A., Tsujimoto Y., Turk B., Vanden Berghe T., Vandenabeele P., Vander Heiden M. G., Villunger A., Virgin H. W., Vousden K. H., Vucic D., Wagner E. F., Walczak H., Wallach D., Wang Y., Wells J. A., Wood W., Yuan J., Zakeri Z., Zhivotovsky B., Zitvogel L., Melino G., and Kroemer G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* **25**, 486–541. doi:10.1038/s41418-017-0012-4

Gómez-Sintes R., Ledesma M. D., and Boya P. (2016). Lysosomal cell death mechanisms in aging. *Ageing Res. Rev.* **32**, 150–168. doi:10.1016/j.arr.2016.02.009

Iredale J. P. (2007). Models of liver fibrosis: Exploring the dynamic nature of

- inflammation and repair in a solid organ. *Journal of Clinical Investigation* 117, 539–548. doi:10.1172/JCI30542
- Jalabert B. (2005). Particularities of reproduction and oogenesis in teleost fish compared to mammals. *Reproduction Nutrition Development*. 45, 261-279. doi:10.1051/rnd:2005019
- Jenkins V. K., Timmons A. K., and McCall K. (2013). Diversity of cell death pathways: Insight from the fly ovary. *Trends in Cell Biology* 23, 567–574. doi:10.1016/j.tcb.2013.07.005
- Kang R., Zeh H. J., Lotze M. T., and Tang D. (2011). The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ.* **18**, 571–580. doi:10.1038/cdd.2010.191
- Kaptaner B., and Ünal G. (2011). Effects of 17 α -ethynylestradiol and nonylphenol on liver and gonadal apoptosis and histopathology in *Chalcalburnus tarichi*. *Environ. Toxicol.* **26**, 610–622. doi:10.1002/tox.20585
- Kavčič N., Pegan K., and Turk B. (2017). Lysosomes in programmed cell death pathways: from initiators to amplifiers. *Biol. Chem.* **398**, 289–301. doi:10.1515/hsz-2016-0252
- Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., Currie, A. R. C. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *J. Intern. Med.* **258**, 479–517. doi:10.1111/j.1365-2796.2005.01570.x
- Kourtis N., and Tavernarakis N. (2009). Autophagy and cell death in model organisms. *Cell Death and Differentiation* **16**, 21–30. doi:10.1038/cdd.2008.120
- Kriel J., and Loos B. (2019). The good, the bad and the autophagosome: exploring unanswered questions of autophagy-dependent cell death. *Cell Death Differ.* **26**, 640–652. doi:10.1038/s41418-018-0267-4
- Ma S., Arsovska S., Moens P., Nigro M., and Chow V. (2006). Analysis of early meiotic events and aneuploidy in nonobstructive azoospermic men: A preliminary report. *Fertil. Steril.* **85**, 646–652. doi:10.1016/j.fertnstert.2005.08.055
- Marcon L., Thomé R. G., Mounteer A. H., Bazzoli N., Rizzo E., and Benjamin L. dos A. (2017). Immunohistochemical, morphological and histometrical analyses of follicular development in *Astyanax bimaculatus* (Teleostei: Characidae) exposed to an organochlorine insecticide. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **143**, 249–258. doi:10.1016/j.ecoenv.2017.05.029
- Martin R. H. (2006). Meiotic chromosome abnormalities in human spermatogenesis.

- Reprod. Toxicol.* **22**, 142–147. doi:10.1016/j.reprotox.2006.03.013
- Melo R. M. C., Martins Y. S., Luz R. K., Rizzo E., and Bazzoli N. (2015). PCNA and apoptosis during post-spawning ovarian remodeling in the teleost *Oreochromis niloticus*. *Tissue Cell* **47**, 541–549. doi:10.1016/j.tice.2015.10.002
- Miura T., and Miura C. I. (2003). Molecular control mechanisms of fish spermatogenesis. *Fish Physiol. Biochem.* **28**, 181–186. doi:10.1023/B:FISH.0000030522.71779.47
- Morais R. D. V. S., Thomé R. G., Lemos F. S., Bazzoli N., and Rizzo E. (2012). Autophagy and apoptosis interplay during follicular atresia in fish ovary : a morphological and immunocytochemical study. *Cell Tissue Res* **347**, 467–478. doi:10.1007/s00441-012-1327-6
- Muro A. F., Moretti F. A., Moore B. B., Yan M., Atrasz R. G., Wilke C. A., Flaherty K. R., Martinez F. J., Tsui J. L., Sheppard D., Baralle F. E., Toews G. B., and White E. S. (2008). An essential role for fibronectin extra type III domain A in pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **177**, 638–645. doi:10.1164/rccm.200708-1291OC
- Neves E. S., Chiarini-Garcia H., and França L. R. (2002). Comparative testis morphometry and seminiferous epithelium cycle length in donkeys and mules. *Biol. Reprod.* **67**, 247–55. doi:10.1095/biolreprod67.1.247
- Nikoletopoulou V., Markaki M., Palikaras K., and Tavernarakis N. (2013). Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1833**, 3448–3459. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.06.001
- Park I. S., Nam Y. K., Douglas S. E., Johnson S. C., and Kim D. S. (2003). Genetic characterization, morphometrics and gonad development of induced interspecific hybrids between yellowtail flounder, *Pleuronectes ferrugineus* (Storer) and winter flounder, *Pleuronectes americanus* (Walbaum). *Aquac. Res.* **34**, 389–396. doi:10.1046/j.1365-2109.2003.00816.x
- Paschoalini A. L., Savassi L. A., Arantes F. P., Rizzo E., and Bazzoli N. (2019). Heavy metals accumulation and endocrine disruption in *Prochilodus argenteus* from a polluted neotropical river. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **169**, 539–550. doi:10.1016/j.ecoenv.2018.11.047
- Patiño R., and Sullivan C. V. (2002). Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. *Fish Physiology and Biochemistry* **26**, 57–70. doi:10.1023/A:1023311613987

- Pinheiro A. P. B., Melo R. M. C., Teixeira D. F., Birindelli J. L. O., Carvalho D. C., and Rizzo E. (2019). Integrative approach detects natural hybridization of sympatric lambaris species and emergence of infertile hybrids. *Sci. Rep.* **9**, 1–12.
doi:10.1038/s41598-019-40856-4
- Piva L. H., de Siqueira-Silva D. H., Goes C. A. G., Fujimoto T., Saito T., Dragone L. V., Senhorini J. A., Porto-Foresti F., Ferraz J. B. S., and Yasui G. S. (2018). Triploid or hybrid tetra: Which is the ideal sterile host for surrogate technology? *Theriogenology* **108**, 239–244. doi:10.1016/j.theriogenology.2017.12.013
- Qiang L., and Cheng J. (2021). Exposure to polystyrene microplastics impairs gonads of zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* **263**, 128–161.
doi:10.1016/j.chemosphere.2020.128161
- Repnik U., Stoka V., Turk V., and Turk B. (2012). Lysosomes and lysosomal cathepsins in cell death. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* **1824**, 22–33. doi:10.1016/j.bbapap.2011.08.016
- Ribeiro Y. M., Matos S. A. de, Domingos F. F. T., Santos H. B. dos, Cruz Vieira A. B., Bazzoli N., and Rizzo E. (2017). Germ cell proliferation and apoptosis during testicular regression in a seasonal breeding fish kept in captivity. *Tissue Cell* **49**, 664–671. doi:10.1016/j.tice.2017.09.003
- Rodgers R. J., Irving-Rodgers H. F., and Russell D. L. (2003). Extracellular matrix of the developing ovarian follicle. *Reproduction* **126**, 415–424.
doi:10.1530/rep.0.1260415
- Ryter S. W., Cloonan S. M., and Choi A. M. K. (2013). Autophagy: A critical regulator of cellular metabolism and homeostasis. *Mol. Cells* **36**, 7–16. doi:10.1007/s10059-013-0140-8
- Sales C. F., Barbosa Pinheiro A. P., Ribeiro Y. M., Weber A. A., Paes-Leme F. de O., Luz R. K., Bazzoli N., Rizzo E., and Melo R. M. C. (2020). Effects of starvation and refeeding cycles on spermatogenesis and sex steroids in the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Mol. Cell. Endocrinol.* **500**, 110643.
doi:10.1016/j.mce.2019.110643
- Sales C. F., Melo R. M. C., Pinheiro A. P. B., Luz R. K., Bazzoli N., and Rizzo E. (2019). Autophagy and Cathepsin D mediated apoptosis contributing to ovarian follicular atresia in the Nile tilapia. *Mol. Reprod. Dev.* **86**, 1592–1602.
doi:10.1002/mrd.23245
- Schulz R. W., de França L. R., Lareyre J. J., LeGac F., Chiarini-Garcia H., Nobrega R.

- H., and Miura T. (2010). Spermatogenesis in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* **165**, 390–411. doi:10.1016/j.ygcen.2009.02.013
- Serrano-Puebla A., and Boya P. (2018). Lysosomal membrane permeabilization as a cell death mechanism in cancer cells. *Biochem. Soc. Trans.* **46**, 207–215. doi:10.1042/BST20170130
- Sever O. N., and Demir O. G. (2017). Autophagy: Cell death or survive mechanism. *J. Oncol. Sci.* **3**, 37–44. doi:10.1016/j.jons.2017.07.001
- Shimizu Y., Shibata N., and Yamashita M. (1997). Spermiogenesis without preceding meiosis in the hybrid medaka between *Oryzias latipes* and *O. curvinotus*. *J. Exp. Zool.* **279**, 102–112. doi:10.1002/(SICI)1097-010X(19970901)279:1<102::AID-JEZ10>3.0.CO;2-A
- Sottile J., and Hocking D. C. (2002). Fibronectin polymerization regulates the composition and stability of extracellular matrix fibrils and cell-matrix adhesions. *Mol. Biol. Cell* **13**, 3546–3559. doi:10.1091/mbc.E02-01-0048
- Thomé R. G., Domingos F. F. T., Santos H. B., Martinelli P. M., Sato Y., Rizzo E., and Bazzoli N. (2012). Apoptosis, cell proliferation and vitellogenesis during the folliculogenesis and follicular growth in teleost fish. *Tissue Cell* **44**, 54–62. doi:10.1016/j.tice.2011.11.002
- Thomé R., Dos Santos H. B., Sato Y., Rizzo E., and Bazzoli N. (2010). Distribution of laminin β 2, collagen type IV, fibronectin and MMP-9 in ovaries of the teleost fish. *J. Mol. Histol.* **41**, 215–224. doi:10.1007/s10735-010-9281-7
- Turk B., and Turk V. (2009). Lysosomes as ‘suicide bags’ in cell death: Myth or reality? *J. Biol. Chem.* **284**, 21783–21787. doi:10.1074/jbc.R109.023820
- Valiente-Alandi I., Potter S. J., Salvador A. M., Schafer A. E., Schips T., Carrillo-Salinas F., Gibson A. M., Nieman M. L., Perkins C., Sargent M. A., Huo J., Lorenz J. N., DeFalco T., Molkentin J. D., Alcaide P., and Blaxall B. C. (2018). Inhibiting fibronectin attenuates fibrosis and improves cardiac function in a model of heart failure. *Circulation* **138**, 1236–1252. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.118.034609
- Vendrell J. M., García F., Veiga A., Calderón G., Egozcue S., Egozcue J., and Barri P. N. (1999). Meiotic abnormalities and spermatogenic parameters in severe oligoasthenozoospermia. *Hum. Reprod.* **14**, 375–378. doi:10.1093/humrep/14.2.375
- de Waal P. P., Leal M. C., García-López Á., Liarte S., de Jonge H., Hinfrey N., Brion

- F., Schulz R. W., and Bogerd J. (2009). Oestrogen-induced androgen insufficiency results in a reduction of proliferation and differentiation of spermatogonia in the zebrafish testis. *J. Endocrinol.* **202**, 287–297. doi:10.1677/JOE-09-0050
- Whitaker M. (1996). Control of meiotic arrest. *Rev. Reprod.* **1**, 127–135. doi:10.1530/ror.0.0010127
- Wills P. S., Sheehan R. J., and Jr S. K. A. (2000). Reduced Reproductive Capacity in Diploid and Triploid Hybrid Sunfish. *Trans. Am. Fish. Soc.* **129**, 30–40. doi:10.1577/1548-8659(2000)129<0030
- Wynn, T. A. (2008). Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. **214**, 231–241. doi:10.1002/path
- Wynn T. A., and Barron L. (2010). Macrophages: Master regulators of inflammation and fibrosis. *Seminars in Liver Disease* **30**, 245–257. doi:10.1055/s-0030-1255354
- Xue L., Fletcher G. C., and Tolkovsky A. M. (1999). Autophagy is activated by apoptotic signalling in sympathetic neurons: An alternative mechanism of death execution. *Mol. Cell. Neurosci.* **14**, 180–198. doi:10.1006/mcne.1999.0780
- Yue Z., Jin S., Yang C., Levine A. J., and Heintz N. (2003). Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 15077–15085. doi:10.1073/pnas.2436255100

Figura 1:

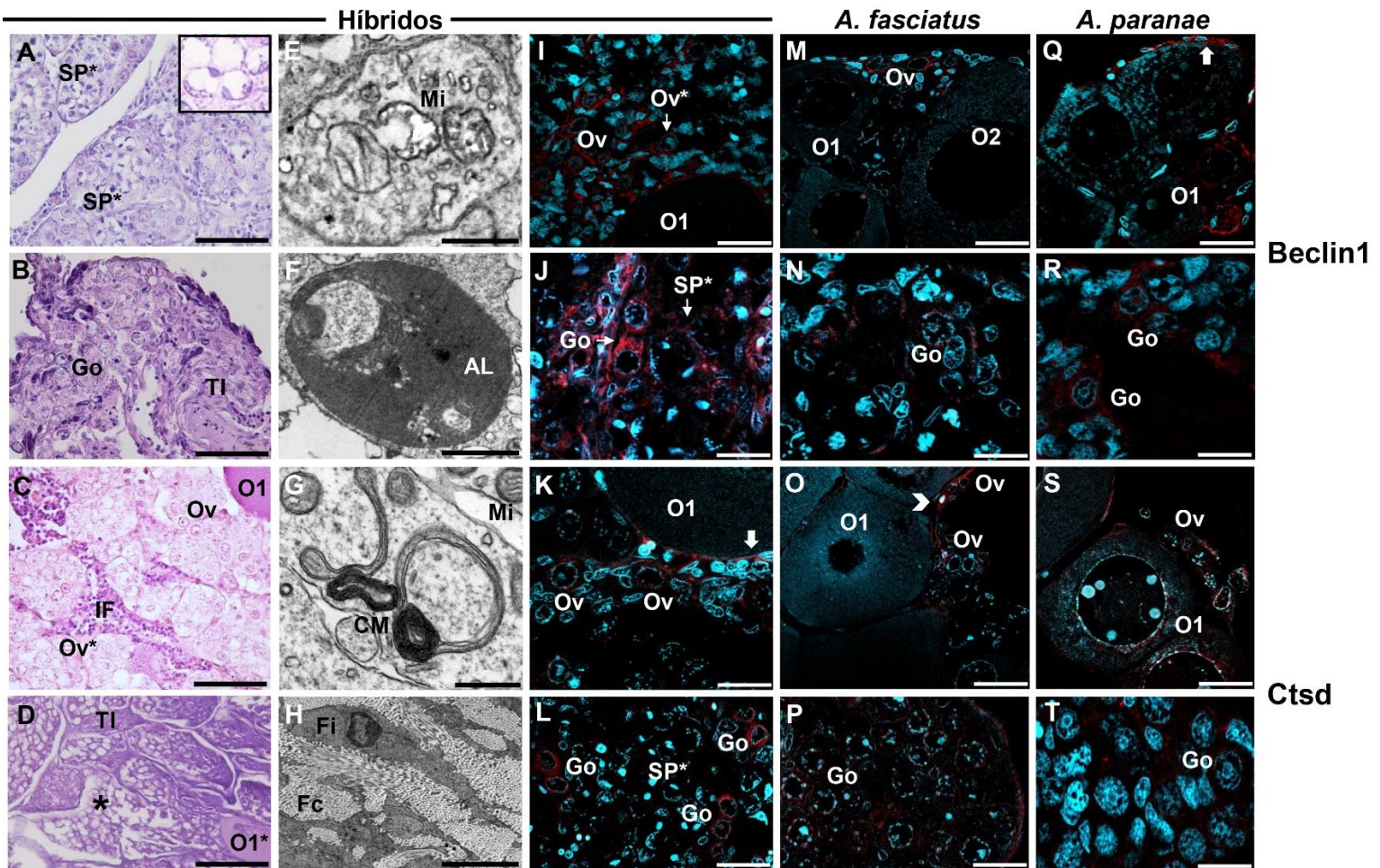


Figura 2:

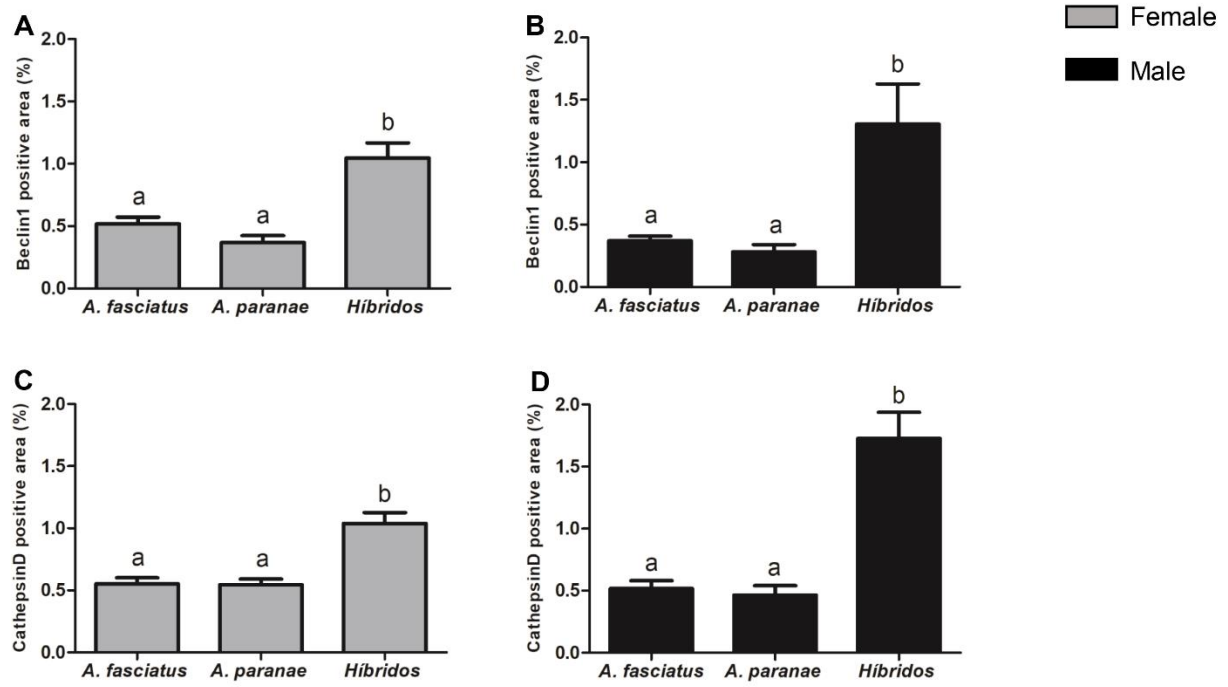


Figura 3:

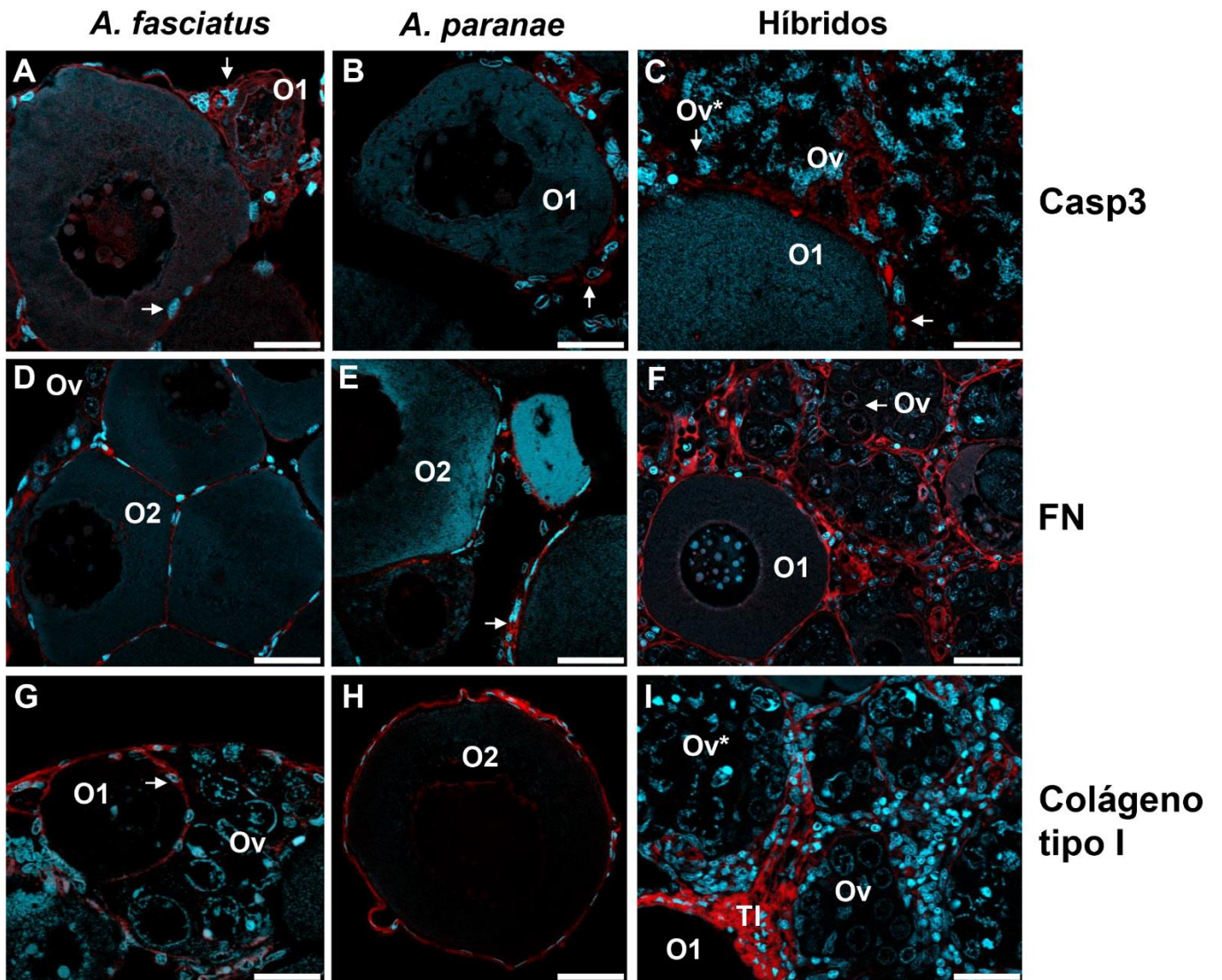


Figura 4:

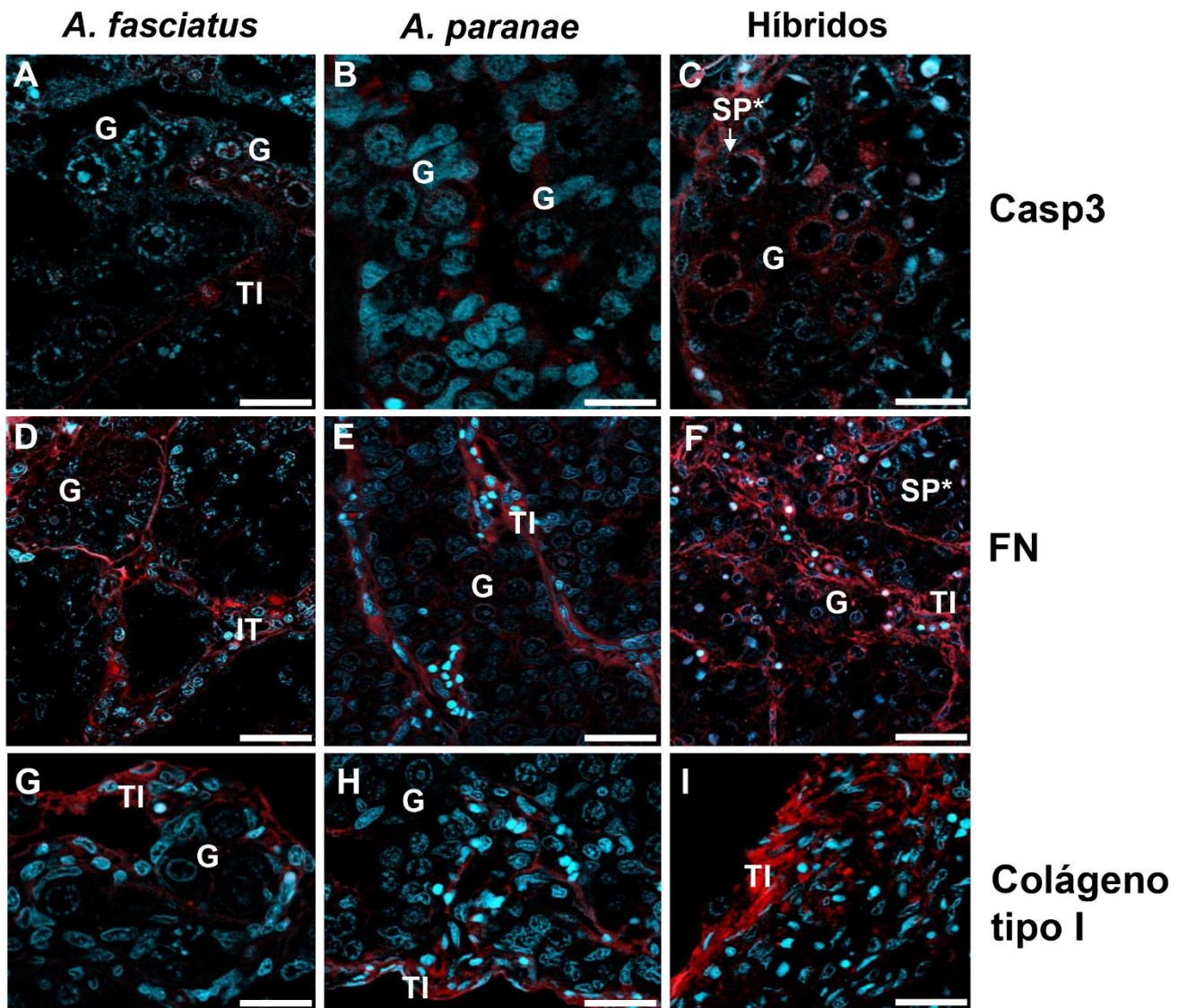
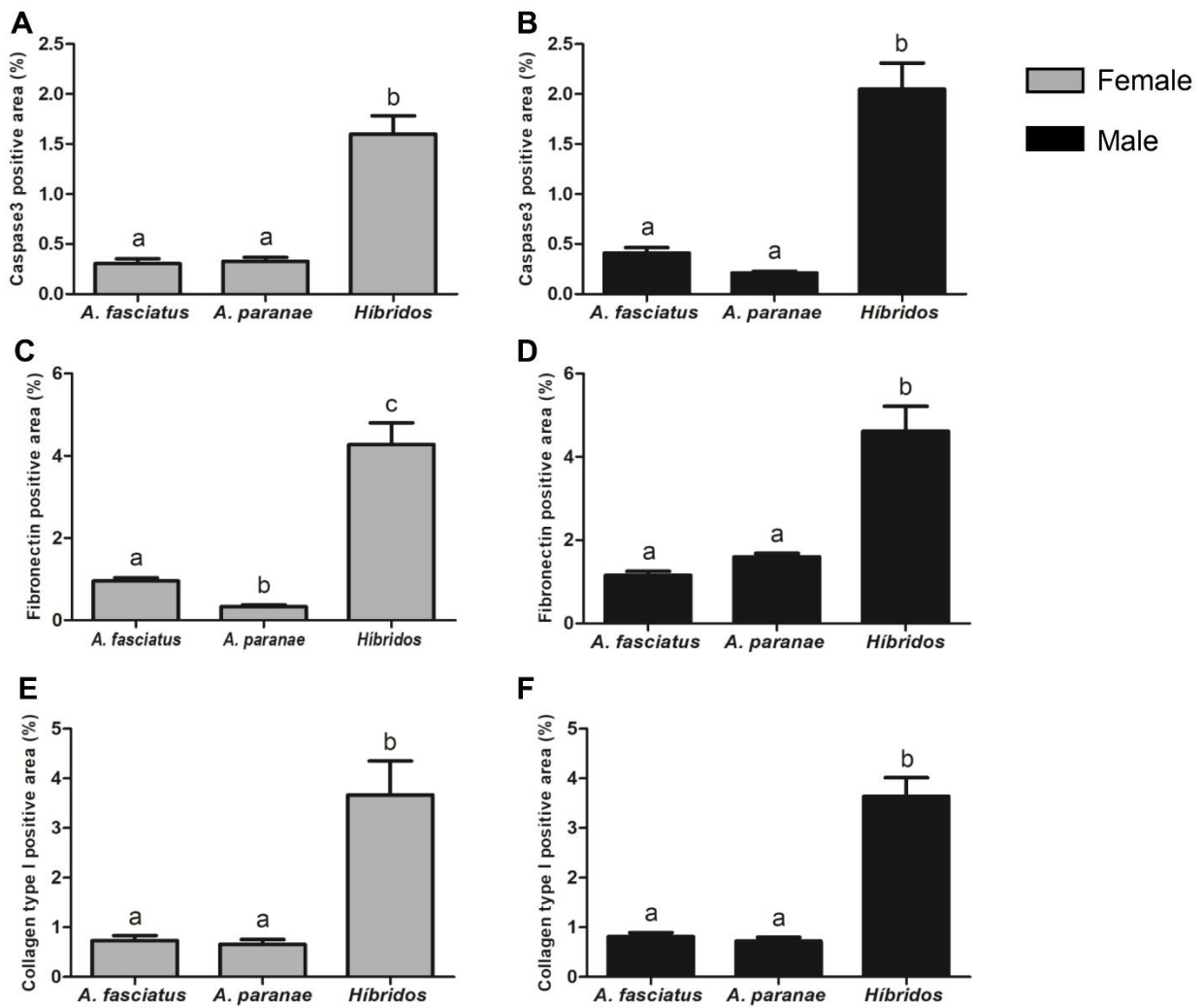


Figura 5:



4. DISCUSSÃO GERAL

A hibridação é um processo complexo, com consequências ecológicas e evolutivas para os animais envolvidos e frequentemente leva a alterações morfológicas nos híbridos (Shimizu et al. 1997; Wills et al. 2000; Fishelson 2003; Piva et al. 2018). Além disso, os eventos de hibridação natural ainda deixam muitas perguntas a serem respondidas, especialmente sobre a sua ocorrência, predisposição de grupos zoológicos ou regiões biogeográficas, influência das mudanças climáticas, bem como sobre os mecanismos celulares e fisiológicos envolvidos na biologia dos híbridos (Trigo et al., 2008; Yoshikawa et al., 2018; Larson et al., 2019). A principal consequência morfológica da hibridação está relacionada à gametogênese, que muitas vezes é interrompida nesses animais, gerando infertilidade. Embora seja bem aceito que a interrupção da meiose seja o principal causador da infertilidade de híbridos (Bartley et al., 2001; Fishelson, 2003; Yoshikawa et al., 2018), as vias de sinalização celular envolvidas no processo de infertilidade ainda não foram totalmente elucidadas. Neste sentido, o presente trabalho foi dividido em duas etapas: na primeira nós investigamos a ocorrência de um processo de hibridação natural entre as espécies de lambaris *A. fasciatus* e *A. paranae* na cabeceira do Rio Grande utilizando uma abordagem multidisciplinar. Na segunda etapa nós investigamos as consequências da hibridação sobre a morfologia gonadal dos híbridos, utilizando as vias autofágica, lisossomal e apoptótica, além da dinâmica de remodelamento tecidual influenciada pelas proteínas de matriz extracelular Fibronectina e Colágeno tipo I.

No primeiro capítulo, nós reportamos a ocorrência de hibridação natural entre as espécies de lambaris *A. fasciatus* e *A. paranae*. Primeiramente, a análise de PCA com dados anatômicos dos animais mostrou que as espécies utilizadas neste estudo são grupos distintos, que não se sobrepõem, enquanto a população dos potenciais híbridos apresentou caracteres morfológicos intermediários entre estas duas espécies, como demonstrado anteriormente para peixes híbridos (Hubbs, 1955; Scribner et al., 2001). As análises genéticas, por sua vez, também confirmaram *A. fasciatus* e *A. paranae* deste estudo como espécies distintas, com divergência genética maior que 2%, conforme definido para peixes (Ward, 2009). Além disso, essas análises mostraram que os lambaris com morfótipo intermediário não apresentaram variação nas sequências de DNA suficientes para serem definidos como uma terceira espécie de peixe. Ao contrário, foi observado que esses animais apresentaram sequências de DNA mitocondrial e nuclear específicas de cada uma das espécies, sugerindo a ocorrência de hibridação.

Com as sequências obtidas pela técnica de DNA *barcoding*, uma rede de haplótipos foi construída. Um haplótipo é uma sequência única de DNA, que se distingue dos demais pela mutação de pelo menos um par de base (sítios polimórficos), e que pode ser compartilhado por diferentes indivíduos (indivíduos com sequências ou parte do DNA idênticas). A rede de haplótipos apresentada neste estudo (Figura 5, capítulo I) considera os passos mutacionais (pares de bases distintos em uma mesma posição) acumulados pelos haplótipos amostrados separando-os de acordo com essa característica. Dessa forma, quanto mais geneticamente distantes são as amostras, mais longe estarão na rede de haplótipos. Nesta rede, cada círculo representa um haplótipo e as cores indicam qual morfótipo, dos três estabelecidos pela análise morfométrica e merística, compartilha este haplótipo. O tamanho do círculo é proporcional ao número de amostras que compartilham o mesmo haplótipo. Os pontos pretos representam haplótipos não amostrados que foram utilizados pelo programa para conectar os dois grupos genéticos distintos observados. O fato de um morfótipo único (morfótipo intermediário neste estudo) compartilhar haplótipos de duas espécies distintas é indício de hibridação, uma vez que os haplótipos apresentam herança uniparental (Yu et al., 2014). Esses dados sugeriram que os exemplares com morfótipo intermediário definido pelas análises anatômicas são híbridos resultantes do cruzamento entre as espécies de lambari *A. paranae* e *A. fasciatus*. Considerando que o COI é um gene mitocondrial e sua herança é materna, esse cruzamento pode ser do tipo: fêmeas de *A. paranae* x machos de *A. fasciatus* ou machos de *A. paranae* x fêmeas de *A. fasciatus*, uma vez que a herança mitocondrial observada foi associada a ambas as espécies neste estudo. A confirmação final do processo de hibridação ocorreu com o sequenciamento de um fragmento do gene da proteína ribossomal S7, utilizada em estudos anteriores para confirmação das contribuições de cada espécie parental em estudos de hibridação (Yaakub et al., 2006; Wallis, et al., 2017). Neste estudo, este marcador se mostrou efetivo para diagnóstico da hibridação, uma vez que ele não mostrou variações dentro de cada espécie, mas apresentou diferenças fixas entre as duas espécies de lambaris, permitindo a observação de heterozigose nos híbridos, através dos picos duplos evidenciados nos cromatogramas desses animais.

Além das análises genéticas, que foram necessárias para confirmação do processo de hibridação, o estudo da biologia e morfologia reprodutivas dos lambaris forneceu evidências da ocorrência natural desse processo na cabeceira do Rio Grande. Os lambaris foram observados coabitando um poço de cachoeira, com sobreposição de período reprodutivo, semelhanças morfológicas de gametas, gônadas e estratégias reprodutivas.

Esses dados compõem o conjunto de características ecofisiológicas reportadas como favorecedoras do processo de hibridação (Bassin et al., 2011). Além disso a análise dos híbridos mostrou que mesmo com grandes tamanhos, nos quais as outras espécies já apresentavam atividade reprodutiva, os híbridos não apresentaram sinais macro e microscópicos de maturação gonadal. A infertilidade de animais híbridos é comumente reportada na literatura (Shimizu et al. 1997; Wills et al. 2000; Fishelson 2003; Piva et al. 2018) e essas características nos levaram a hipotetizar que os animais deste estudo são híbridos inférteis resultantes do cruzamento das espécies *A. fasciatus* e *A. paranae*. Corroborando esta hipótese, a análise microscópica qualitativa e quantitativa das gônadas dos híbridos mostrou diversas alterações como: vacuolização e degeneração e células germinativas, aumento do tecido intersticial, presença de infiltrado inflamatório, células com características morfológicas de apoptose, além da ausência de espermatídes e espermatozoides e ovócitos pré-vitelogênicos e vitelogênicos nas análises morfométricas.

A infertilidade de híbridos é frequentemente associada à interrupção da meiose, devido à presença de cromossomos extras provenientes de espécies parentais com número total de cromossomos diferentes. Embora as espécies *A. fasciatus* e *A. paranae* sejam reconhecidas por serem filogeneticamente próximas, apresentando baixos valores de distância genética e radiação recente (Rossini et al., 2016), essas espécies provavelmente apresentam cariótipos com diferentes quantidades de cromossomos. De fato, estudos mostram que *A. paranae* apresenta $2n = 50$ cromossomos, enquanto *A. fasciatus* apresenta variação de $2n = 46-48$ (Morelli et al., 1983; Pazza et al., 2006; Nishiyama et al., 2016), o que indica que neste estudo a infertilidade dos híbridos é causada por incompatibilidade genética, impedindo a progressão da meiose. Frequentemente, a interrupção da meiose é acompanhada por várias alterações morfológicas gonadais. Neste sentido, no segundo capítulo desta tese, buscamos investigar as vias de sinalização celular nas gônadas dos híbridos capazes de justificar a intensa degeneração tecidual observada nesses animais. Os dados mostraram a presença de autofagossomos, autolisossomos e corpos multilamelares, principais estruturas utilizadas no diagnóstico morfológico de autofagia (Hariri et al., 2000; Kishi-Itakura et al., 2014). Além disso, a imunolocalização de Beclin1, CatepsinaD e Caspase3 nas gônadas dos peixes, com aumento dessas proteínas nos híbridos em comparação com as espécies parentais, mostrou relação das vias autofágica e apoptótica com as alterações morfológicas previamente observadas nas gônadas dos híbridos. De fato, alterações das vias autofágica e apoptótica, que aparentemente atuam em cooperação, já foram associadas à redução da fertilidade em

camundongos e peixes (Xue et al. 1999; Bursch 2001; Sales et al. 2020), o que parece também estar acontecendo com os híbridos do presente estudo. Embora alguns estudos tenham buscado avaliar a interação entre essas duas vias (Morais et al., 2012; Cassel et al., 2017; Sales et al., 2019), o conhecimento sobre a via autofágica de morte celular ainda é limitado, mas indica que degradação proteolítica do volume celular ou a alta degradação de fatores de sobrevivência celular causadas pela autofagia podem promover a indução de um programa alternativo de morte celular (Nezis et al., 2010; Nikolettou et al., 2013; Denton & Kumar, 2019). Uma vez que a autofagia é um processo catabólico de degradação lisossomal, a CatepsinaD, que é uma enzima hidrolítica dos lisossomos, também apresenta papel importante nesta via, atuando na degradação de componentes celulares (Yue et al. 2003; Kourtis e Tavernarakis 2009). Além deste papel na autofagia, a CatepsinaD pode influenciar o processo de morte celular, por meio da degradação de proteínas anti-apoptóticas e permeabilização da membrana mitocondrial quando esta hidrolase ácida é liberada no citosol (Gómez-Sintes et al. 2016).

A análise histológica das gônadas dos híbridos mostrou que alguns indivíduos apresentam a gônada morfológicamente mais alterada do que outros, assim como demonstrado por Wills et al. (2000) em híbridos de peixe-sol (*Lepomis cyanellus* x *Lepomis macrochirus*). Isso pode indicar que as alterações morfológicas observadas seguem uma dinâmica, onde o indivíduo aparentemente menos alterado possivelmente teria algumas células capazes de progredir ligeiramente na meiose. Assim, algumas fêmeas híbridas apresentaram estrutura gonadal contendo poucos ninhos de ovogônias normais e escassos ovócitos perinucleolares. Outros indivíduos apresentaram uma condição intermediária de alterações gonadais, na qual a maior parte das células observadas apresentaram características apoptóticas e a gônada não apresenta o padrão de organização de células germinativas em cistos em machos e ninhos em fêmeas. Por fim, os animais mais alterados apresentaram grande predominância de tecido conjuntivo, células em processo final de degeneração (sem núcleo) e regiões de espaços brancos mostrando ausência de células do parênquima e apenas células intersticiais e matriz extracelular. Neste sentido, a correlação da expressão das proteínas autofágica (Beclin1), lisossomal (CatepsinaD) e apoptótica (Caspase3) com as alterações morfológicas observadas nas gônadas dos híbridos sugere que em um primeiro momento a autofagia pode estar agindo a favor da sobrevivência das células para manutenção da gônada em funcionamento. Em um segundo momento, com muitas células germinativas em processo de interrupção da meiose, configurando o estado de infertilidade das gônadas dos

híbridos, a autofagia pode ter atuado na ativação da apoptose, com participação dos lisossomos neste processo. Finalmente, nossos achados em relação à expressão de proteínas da matriz extracelular Fibronectina e Colágeno tipo I indicam que após grande quantidade de células germinativas passarem pelo processo de morte por apoptose, uma remodelação do tecido gonadal é feita para substituição da área de parênquima por tecido conjuntivo, em um processo de cicatrização fibrótica.

Juntos, os dados do presente trabalho contribuem para o avanço no entendimento do processo de hibridação natural, mostrando que as evidências desse processo refletem em diferentes níveis de organização gonadal e em alterações de parâmetros reprodutivos; e que a autofagia e apoptose podem estar envolvidas na degeneração das gônadas, remodelação e fibrose decorrentes da infertilidade em peixes híbridos.

Além disso, este estudo explora indiretamente o potencial evolutivo e ecológico do processo de hibridação entre os lambaris. Considerando que o gênero *Astyanax* é muito diversificado e pouco compreendido, principalmente do ponto de vista da identificação de espécies e relação filogenética entre elas, os dados desta tese contribuem para a Biologia da Conservação, a qual deve considerar o nível de incerteza taxonômica devido à hibridação, para proteger a biodiversidade como um sistema dinâmico. A visão da Biologia da Conservação sobre o contexto deste trabalho é de grande importância, devido ao impacto antrópico causado pelo grande número de barramentos na bacia do Rio Grande, que possui grande potencial hidrelétrico. Ademais, outras influências antrópicas, como introdução intencional ou acidental de espécies e mudanças climáticas que alteram a dinâmica hídrica dos rios, podem interferir nos processos de hibridação e consequentemente afetar a diversidade de lambaris, que apresentam importância comercial e ecológica no Rio Grande.

Considerando, ainda, a visão da Aquacultura sobre o contexto deste trabalho, é importante citar o potencial de utilização do híbrido resultante do cruzamento entre as espécies *A. fasciatus* e *A. paranae* como ferramenta para fins comerciais em processos de hibridação induzida artificialmente, uma vez que lambaris são peixes de interesse econômico e as características de comprimento e peso dos híbridos, e/ou sua infertilidade podem ser vantajosas na piscicultura.

5. CONCLUSÕES

- As espécies *A. fasciatus* e *A. paranae* apresentam várias similaridades em suas características ecofisiológicas reprodutivas, favorecendo a ocorrência de hibridação;
- As espécies *A. fasciatus* e *A. paranae* são capazes de se inter cruzar na cabeceira do Rio Grande, gerando híbridos;
- *A. fasciatus* e *A. paranae* são geneticamente distintas e os exemplares híbridos compartilham similaridades com ambas espécies; porém, não apresentam divergências suficientes para serem considerados uma outra espécie pela abordagem taxonômica filogenética;
- Os híbridos são inférteis e a infertilidade provavelmente é causada pela interrupção da meiose no momento do pareamento de cromossomos homólogos;
- Os híbridos apresentam várias alterações morfológicas gonadais;
- As alterações gonadais observadas nos híbridos são influenciadas pela ativação das vias autofágica e apoptótica, com participação lisossomal;
- Nas gônadas dos híbridos, a ativação da apoptose culmina em intenso processo de morte de células germinativas;
- A fibrose é uma alteração observada nas gônadas dos híbridos, que ocorre devido ao remodelamento do tecido, com deposição das proteínas de matriz extracelular Fibronectina e Colágeno tipo I.

6. REFERÊNCIAS

- Abilhoa, V. (2007). Aspectos da história natural de *Astyanax scabripinnis* Jenyns (Teleostei, Characidae) em um riacho de floresta com araucária no sul do Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*. 24(4), 997-1005.
- Agnello M., Bosco L., Chiarelli R., Martino C., and Roccheri M. C. (2015). The Role of Autophagy and Apoptosis During Embryo Development. 'Cell Death - Autophagy, Apoptosis and Necrosis' (ed. Ntuli, T.M.), pp. 83–112. Rijeka: Croatia: INTECH.
- Alberto, A., Camargo, A. F. M., Verani, J. R.; Costa, O. F. T., Fernandes, M. N. (2005). Health variables and gill morphology in the tropical fish *Astyanax fasciatus* from a sewage-contaminated river. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 61, 247-255.
- Alerting, E. (2007). Autophagy: process and function. *Genes and Development*. 21, 2861–2873.
- Allendorf, F. W., Waples, R. S. (1996). Conservation and genetics of salmonid fishes. In: Avise, J. C., Hamrick, J. L. (Ed.). *Conservation Genetics: Case Histories from Nature*. Chapman and Hall, New York, USA. 238–280.
- Andrade, P. M., Braga, F. M. S. (2005). Reproductive seasonality of fishes from a lotic stretch of the Grande River, High Paraná River Basin, Brasil. *Brazilian Journal of Biology*. 65(3), 387-394.
- Arnold, M. L., Martin, N. H. (2009). Adaptation by introgression. *Journal of Biology*. 8, 82.
- Bangs P., Franc N., and White K. (2000). Molecular mechanisms of cell death and phagocytosis in *Drosophila*. *Cell Death and Differentiation*. 7, 1027–1034.
- Bartley, D. M., Rana, K., Immink, A. J. (2001). The use of hybrids in aquaculture and fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 10, 325-337.
- Bassin, L., Alvarez, N., Pellissier, L., Triponez, Y. (2011). Ecological niche overlap in sister species: how do oil-collecting bees *Macropis europaea* and *Macropis fulvipes* (Hymenoptera: Melittidae) avoid hybridization and competition? *Apidologie*. 42, 579–595.
- Blanco, J, Egozcue, J., Vidal, F. (2001). Meiotic behaviour of the sex chromosomes in three patients with sex chromosome anomalies (47,XXY, mosaic 46,XY/ 47,XXY and 47,XYY) assessed by fluorescent in situ hybridization. *Human Reproduction*. 16, 887–892.

- Borges, G. C., Abjaudi, G. A. (2016). Caracterização ambiental da bacia do Rio Grande. In: Melo, R. M. C. & Borges, G. C. (Eds.). *Rio Grande: Ambiente, Peixes e Pessoas*. Belo Horizonte: Instituto de Estudos Pró-Cidadania. Cap.1, p.8-101.
- Brentnall, M., Rodriguez-Menocal, L., De Guevara, R. L., Cepero, E., and Boise L. H. (2013). Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC Cell Biology*. 14, 32.
- Britski, H. A. (1972). Peixes de água doce do Estado de São Paulo: sistemática. In: Comissão Interestadual da Bacia Paraná-Uruguai (Ed). *Poluição e Piscicultura: notas sobre ictiologia, poluição e piscicultura*. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo e Instituto de Pesca. Cap.2, p. 79-108.
- Burcea, A., Florescu, J. E., Dudu, A., Georgescu, S. E., Costache, M. (2014). Molecular methods for the detection of natural hybrids in sturgeon populations. *Transylvanian Review of Systematical and Ecological Research*. 16(1), 65-72.
- Bursch W. (2001). The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death and Differentiation*. 8, 569–581.
- Câmara, J. J. C., Rodrigues, A. M., Campos, E. C., Santos, R. A., Mandelli, J. (1991). Pesca seletiva do tambuí, *Astyanax bimaculatus* Linnaeus, 1758 (Characiformes, Characidae), com utilização de redes de emalhar, na represa de Ibitinga, rio Tietê, Estado de São Paulo, Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo. 18, 51-60.
- Cao, Y., Klionsky, D. J. (2007). Physiological functions of Atg6/Beclin 1: A unique autophagy-related protein. *Cell Research*. 17, 839–849.
- Carrasco-Letelier, L., Eguren, G., Mello, F. T., Groves, P. A. (2006). Preliminary field study of hepatic porphyrin profiles of *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characiformes) to define anthropogenic pollution. *Chemosphere*. 62, 1245-1252.
- Carvalho, D. C., Seerig, A. S., Brasil, B. S. A. F., Crepaldi, D. V., Oliveria, D. A. A. (2013). Molecular identification of the hybrid between the catfish species *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum* using a set of eight microsatellite markers. *Journal of Fish Biology*. 83(3), 671–6.
- Carvalho, P. A., Paschoalini, A. L., Santos, G.B., Rizzo, E, Bazzoli, N. (2009). Reproductive biology of *Astyanax fasciatus* (Pisces: Characiformes) in a reservoir in Southeastern Brazil. *Journal of Applied Ichthyology*. 25, 306–313.
- Cassel M., Camargo M. D. P., Jesus L. W. O., and Borella M. I. (2017). Involution processes of follicular atresia and post-ovulatory complex in a characid fish ovary : a study of apoptosis and autophagy pathways. *Journal of Molecular Histology*. 48, 243–

257.

- Chan, W. Y., Hoffmann, A. A., van Oppen M. J. H. (2019). Hybridization as a conservation management tool. *Conservation Letters*. 12, 1–11.
- Cruz Vieira, A. B., Weber, A. A., Ribeiro, Y. M., Luz, R. K., Bazzoli, N., Rizzo, E. (2019). Influence of salinity on spermatogenesis in adult Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) testis. *Theriogenology* 131, 1–8.
- Denton, D., Kumar, S. (2019). Autophagy-dependent cell death. *Cell Death and Differentiation*. 26, 605–616.
- Djavaheri-Mergny, M., Maiuri, M. C., Kroemer, G. (2010). Cross talk between apoptosis and autophagy by caspase-mediated cleavage of Beclin 1. *Oncogene*. 29, 1717–1719.
- Drummond, G. M., Martins, C. S., Machado, A. B. M., Sebaio, F. A., Antonini, Y. (2005) Peixes. In: Machado, A. B. M., Martins, C. S., Sebaio, F., Drummond, G. M., Antonini, Y. (Ed.). *Biodiversidade em Minas Gerais: um atlas para conservação sua conservação*. 2^o. ed. Belo Horizonte: Ed. Fundação Biodiversitas, vol. 1.
- Egozcue, J., Sarrate, Z., Codina-Pascual, M., Egozcue, S., Oliver-Bonet, M., Blanco, J., Navarro, J., Benet, J., Vidal, F. (2005). Meiotic abnormalities in infertile males. *Cytogenetic and Genome Research*. 111, 337-342.
- Ferguson, K. A., Wong, E. C., Chow, V., Nigro, M, Ma, S. (2007). Abnormal meiotic recombination in infertile men and its association with sperm aneuploidy. *Human Molecular Genetics*. 16(23), 2870-2879.
- Ferreira, M. E., Grattapaglia, D. (1998). Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3^a ed, Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. Documento 20. 220 p.
- Fishelson, L. (2003). Comparison of Testes Structure, Spermatogenesis, and Spermatocytogenesis in Young, Aging, and Hybrid Cichlid Fish (Cichlidae, Teleostei). *Journal of Morphology*. 256, 285-300.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E. S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D. W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A. V., Arama, E., Baehrecke, E. H., Barlev, N. A., Bazan, N. G., Bernassola, F., Bertrand, M. J. M., Bianchi, K., Blagosklonny, M. V., Blomgren, K., Borner, C., Boya, P., Brenner, C., Campanella, M., Candi, E., Carmona-Gutierrez, D., Cecconi, F., Chan, F. K. M., Chandel, N. S., Cheng, E. H., Chipuk, J. E., Cidlowski, J. A., Ciechanover, A., Cohen, G. M., Conrad, M., Cubillos-Ruiz, J. R., Czabotar, P. E., D'Angiolella, V., Dawson, T. M., Dawson, V. L., De Laurenzi, V., De Maria, R., Debatin, K. M., Deberardinis, R. J., Deshmukh, M., Di Daniele, N., Di Virgilio, F.,

- Dixit, V. M., Dixon, S. J., Duckett, C. S., Dynlacht, B. D., El-Deiry, W. S., Elrod, J. W., Fimia, G. M., Fulda, S., García-Sáez, A. J., Garg, A. D., Garrido, C., Gavathiotis, E., Golstein, P., Gottlieb, E., Green, D. R., Greene, L. A., Gronemeyer, H., Gross, A., Hajnoczky, G., Hardwick, J. M., Harris, I. S., Hengartner, M. O., Hetz, C., Ichijo, H., Jäättelä, M., Joseph, B., Jost, P. J., Juin, P. P., Kaiser, W. J., Karin, M., Kaufmann, T., Kepp, O., Kimchi, A., Kitsis, R. N., Klionsky, D. J., Knight, R. A., Kumar, S., Lee, S. W., Lemasters, J. J., Levine, B., Linkermann, A., Lipton, S. A., Lockshin, R. A., López-Otín, C., Lowe, S. W., Luedde, T., Lugli, E., MacFarlane, M., Madeo, F., Malewicz, M., Malorni, W., Manic, G., Marine, J. C., Martin, S. J., Martinou, J. C., Medema, J. P., Mehlen, P., Meier, P., Melino, S., Miao, E. A., Molkentin, J. D., Moll, U. M., Muñoz-Pinedo, C., Nagata, S., Nuñez, G., Oberst, A., Oren, M., Overholtzer, M., Pagano, M., Panaretakis, T., Pasparakis, M., Penninger, J. M., Pereira, D. M., Pervaiz, S., Peter, M. E., Piacentini, M., Pinton, P., Prehn, J. H. M., Puthalakath, H., Rabinovich, G. A., Rehm, M., Rizzuto, R., Rodrigues, C. M. P., Rubinsztein, D. C., Rudel, T., Ryan, K. M., Sayan, E., Scorrano, L., Shao, F., Shi, Y., Silke, J., Simon, H. U., Sistigu, A., Stockwell, B. R., Strasser, A., Szabadkai, G., Tait, S. W. G., Tang, D., Tavernarakis, N., Thorburn, A., Tsujimoto, Y., Turk, B., Vanden Berghe, T., Vandenabeele, P., Vander Heiden, M. G., Villunger, A., Virgin, H. W., Vousden, K. H., Vucic, D., Wagner, E. F., Walczak, H., Wallach, D., Wang, Y., Wells, J. A., Wood, W., Yuan, J., Zakeri, Z., Zhivotovsky, B., Zitvogel, L., Melino, G., Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death and Differentiation*. 25, 486–541.
- Garutti, V., Britski, H. A. (2000). Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. *Comunicação do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS*, Porto Alegre. 13, 65-88.
- Géry, J. (1977). Characoids of the world. T.F.H. Publications Inc. Ltd., Neptune City. 672 p.
- Gómez-Sintes, R., Ledesma, M. D., Boya P. (2016). Lysosomal cell death mechanisms in aging. *Ageing Research Reviews*. 32, 150–168.
- Graça, W. J.; Pavanelli, C. S. (2007). Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes. Maringá: EDUEM. 241 p.
- Grier, H. J., Uribe, M. C., Parenti, L. R. (2007) Germinal epithelium, folliculogenesis, and postovulatory follicles in ovaries of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*

- (Walbaum, 1792) (Teleostei, Protacanthopterygii, Salmoniformes). *Journal of Morphology*. 268, 293–310.
- Hariri, M., Millane, G., Guimond, M. P., Guay, G., Dennis, J. W., Nabi, I. R. (2000). Biogenesis of multilamellar bodies via autophagy. *Molecular Biology of the Cell* 11, 255-268.
- Hashimoto, D. T., Senhorini, J. A., Foresti, F., Martinez, P., Porto-Foresti, F. (2014). Genetic Identification of F1 and Post-F1 Serrasalmid juvenile hybrids in brazilian aquaculture. *PlosOne*. 9(3), 1-9.
- He, C., Klionsky, D. J. (2009). Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annual Review of Genetics* 43, 67–93.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., deWaard, J. R. (2003). Biological identification through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Biological Sciences*. 270, 313-321.
- Hebert, P. D. N., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H., Hallwachs, W. (2004). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of National Academy of Sciences. USA*, 101, 14812-14817.
- Hoe, M. L., Buck, D. H., Wahl D. H. (1994). Growth, Survival, and Recruitment of Hybrid Crappies Stocked in Small Impoundments. *North America Journal of Fisheries Management*. 13, 137–142.
- Hubbs, C. L. (1955). Hybridization between fish species in nature. *Systematic Zoology*, 4, 1-20.
- Huettenbrenner, S., Maier, S., Leisser, C., Polgar, D., Strasser, S., Grusch, M., Krupitza, G. (2003). The evolution of cell death programs as prerequisites of multicellularity. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* 543, 235–249.
- IGAM (Instituto Mineiro de Gestão das Águas). (2012). *Plano Diretor de Recursos Hídricos da Bacia do Alto Rio Grande*. Belo Horizonte: IGAM/Consórcio Ecoplan-Lume-Skill. 57p.
- Jalabert, B. (2005). Particularities of reproduction and oogenesis in teleost fish compared to mammals. *Reproduction Nutrition Development*. 45, 261-279.
- Janz, D. M., McMaster, M. E., Munkittrick, K. R., Van Der Kraak, G. (1997). Elevated ovarian follicular apoptosis and heat shock protein-70 expression in white sucker exposed to bleached kraft pulp mill effluent. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 147, 391–398.

- Jenkins, V. K., Timmons, A. K., McCall, K. (2013). Diversity of cell death pathways: Insight from the fly ovary. *Trends in Cell Biology* 23, 567–574.
- Kang, R., Zeh, H. J., Lotze, M. T., Tang D. (2011). The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death and Differentiation*. 18, 571–580.
- Kaptaner, B., Ünal, G. (2011). Effects of 17 α -ethynylestradiol and nonylphenol on liver and gonadal apoptosis and histopathology in *Chalcalburnus tarichi*. *Environmental Toxicology*. 26, 610–622.
- Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide- ranging implications in tissue kinetics. *Journal of Internal Medicine*. 258, 479–517.
- Kishi-Itakura, C., Koyama-Honda, I., Itakura, E., Mizushima, N. (2014). Ultrastructural analysis of autophagosome organization using mammalian autophagy-deficient cells. *Journal of Cell Science*. 127, 4984–4984.
- Kourtis, N., Tavernarakis, N. (2009). Autophagy and cell death in model organisms. *Cell Death and Differentiation*. 16, 21–30.
- Larson, E. L., Tinghitella, R. M., Taylor S. A. (2019). Insect hybridization and climate change. *Frontiers in Ecology and Evolution*. 7, 1–11.
- Lima, F. C. T., Malabarba, L. R., Buckup, P. A., Pezzi da Silva, J. F., Vari, R., Harold, P. A., et al. (2003). Genera Incertae Sedis in Characidae. In: Reis, R. E., Kullander, S. O., Ferraris Jr, C. J. (Eds): Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America, pp. 106–168. EDIPUCRS, Porto Alegre.
- Ma, S., Arsovska, S., Moens, P., Nigro, M., Chow, V. (2006). Analysis of early meiotic events and aneuploidy in nonobstructive azoospermic men: a preliminary report. *Fertility and Sterility*. 85(3), 646-652.
- Maistro, E. L., Oliveira, C., Foresti, F. (2000). Sympatric occurrence of two cytotypes of *Astyanax scabripinnis* (Characiformes, Characidae). *Genetics and Molecular Biology*. 23(2), 365-369.
- Maiuri, M. C., Zalckvar, E., Kimchi, A., Kroemer, G. (2007). Self-eating and self-killing: Crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, 741–752.
- Marcon, L., Thomé, R. G., Mounteer, A. H., Bazzoli, N., Rizzo, E., Benjamin, L. A. (2017). Immunohistochemical, morphological and histometrical analyses of follicular development in *Astyanax bimaculatus* (Teleostei: Characidae) exposed to an organochlorine insecticide. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 143, 249–258.

- Martin, R. H. (2006). Meiotic chromosome abnormalities in human spermatogenesis. *Reproductive Toxicology*. 22, 142-147.
- Martins, Y. S., Arantes, F. P., Sato, Y., Santos, J. E., Rizzo, E., Bazzoli, N. (2012). Comparative analysis of gonadal morphology in six fish species of the Incertae Sedis genera in Characidae of occurrence in the São Francisco River Basin, Brazil. *Acta Zoologica (Stockholm)*. 93, 48–56.
- Melo, F. A. G. (2001). Revisão taxonômica das espécies do gênero *Astyanax* Baird e Girard, 1854, (Teleostei: Characiformes, Characidae) da região da Serra dos Órgãos. *Arquivo do Museu Nacional*, Rio de Janeiro. 59, 1-46.
- Mizushima, N., Komatsu, M. (2011) Autophagy: Renovation of cells and tissues. *Cell*. 147, 728–741.
- Morais, R. D. V. S., Thomé, R. G., Lemos, F. S., Bazzoli, N., Rizzo, E. (2012). Autophagy and apoptosis interplay during follicular atresia in fish ovary: a morphological and immunocytochemical study. *Cell and Tissue Research*. 347, 467–478.
- Morais, R. D. V. S., Thomé, R. G., Santos, H. B., Bazzoli, N., Rizzo, E. (2016). Relationship between bcl-2, bax, beclin-1, and cathepsin-D proteins during postovulatory follicular regression in fish ovary. *Theriogenology*. 85, 1118–1131.
- Moreau, K., Luo, S., Rubinsztein, D. C. (2010). Cytoprotective roles for autophagy. *Current Opinion in Cell Biology*. 206–211.
- Morelli, S., Bertollo, L. A. C., Foresti F., Moreira Filho, O., Toledo Filho, S. A. (1983). Cytogenetic Considerations on the Genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). I. Karyotypic Variability. *International Journal of Cytology Cytosystematics and Cytogenetics*. 36, 235–244.
- Nagahama, Y. (1994). Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *The International Journal of Developmental Biology*. 38, 217–229.
- Nakamura, S., Kobayashi, K., Nishimura, T., Higashijima, S. I., Tanaka, M. (2010). Identification of germline stem cells in the ovary of the teleost medaka. *Science*. 328, 1561–1563.
- Nezis, I. P., Shrivage, B. V., Sagona, A. P., Johansen, T., Baehrecke, E. H., Stenmark, H. (2010). Autophagy as a trigger for cell death: Autophagic degradation of inhibitor of apoptosis dBruce controls DNA fragmentation during late oogenesis in *Drosophila*. *Autophagy*. 6, 1214–1215.
- Nikoletopoulou, V., Markaki, M., Palikaras, K., Tavernarakis, N. (2013). Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta* -

- Molecular Cell Research*. 1833, 3448–3459.
- Nishiyama, P. B., Vieira, M. M. R., Porto, F. E., Borin, L. A., Portela-Castro, A. L. B., Santos, I. C. M. (2016). Karyotypic diversity among three species of the genus *Astyanax* (Characiformes: Characidae). *Brazilian Journal of Biology*. 76, 360–366.
- Ortiz, M. F. (2010). Validação do DNA *barcoding* como identificador de espécies: um estudo de ampla amostragem com o gênero *Pseudoplatystoma* (Siluriformes; Pimelodidae) na Amazônia. Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia - INPA, Manaus, 59p.
- Paiva, M. P.; Andrade-Tubino, M. F.; Godoy, M. P. (2002). *As Represas e os Peixes Nativos do Rio Grande*. Rio de Janeiro. Editor Interciência. 78p
- Pazza, R., Kavalco, K. F., Bertollo, L. A. C. (2006). Chromosome Polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). I - Karyotypic analysis, Ag-NORs and mapping of the 18S and 5S ribosomal genes in sympatric karyotypes and their possible hybrid forms. *Cytogenetic and Genome Research*. 112, 313–319.
- Pazza, R., Kavalco, S. A. F., Penteado, P. R., Kavalco, K. F., Almeida-Toledo, L. F. (2008). The species complex *Astyanax fasciatus* Cuvier (Teleostei, Characiformes) – a multidisciplinary approach. *Journal of Fish Biology*. 72, 2002–2010.
- Peres, W. A. M., Bertollo, L. A. C., Buckup, P. A., Blanco, D. R., Kantek, D. L. Z., Moreira-Filho, O. (2012). Invasion, dispersion and hybridization of fish associated to river transposition: karyotypic evidence in *Astyanax* “*bimaculatus* group” (Characiformes: Characidae). *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 22, 519–526.
- Piva, L. H., de Siqueira-Silva, D. H., Goes, C. A. G., Fujimoto, T., Saito, T., Dragone, L. V., Senhorini, J. A., Porto-Foresti, F., Ferraz, J. B. S., Yasui, G. S. (2018). Triploid or hybrid tetra: Which is the ideal sterile host for surrogate technology? *Theriogenology* 108, 239–244.
- Prado, F. D., Hashimoto, D. T., Senhorini, J. A., Foresti, F., Porto-Foresti, F. (2012). Detection of hybrids and genetic introgression in wild stocks of two catfish species (Siluriformes: Pimelodidae): The impact of hatcheries in Brazil. *Journal of Fish Research*. 125-126, 300–305.
- Prado, P. S., Pinheiro, A. P. B, Bazzoli, N., Rizzo, E. (2014). Reproductive biomarkers response induced by xenoestrogens in the characid fish *Astyanax fasciatus* inhabiting a South American reservoir: An integrated field and laboratory approach. *Environmental Research*. 131, 165–173.

- Prado, P. S., Souza, C. C., Bazzoli, N., Rizzo, E. (2011). Reproductive disruption in lambari *Astyanax fasciatus* from a Southeastern Brazilian reservoir. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 74, 1879–87.
- Qiang, L., Cheng, J. (2021). Exposure to polystyrene microplastics impairs gonads of zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 263, 128–161.
- Quagio-Grassiotto, I., Grier, H., Mazzoni, T. S., Nóbrega, R. H., De Arruda Amorim, J. P. (2011). Activity of the ovarian germinal epithelium in the freshwater catfish, *Pimelodus maculatus* (Teleostei: Ostariophysi: Siluriformes): Germline cysts, follicle formation and oocyte development. *Journal of Morphology*. 272, 1290–1306.
- Reis, R. E., Kullander, S. O., Ferraris Jr, C. J. (2003). Check list of freshwater fishes of South and Central América. Edipucrs, Porto Alegre, Brazil. 742 p.
- Roeder, G. S. (1997). Meiotic chromosomes: it takes two to tango. *Genes and Development*. 11, 2600-2621.
- Rossini, B. C., Oliveira, C. A. M., Melo, F. A. G., Bertaco, V. A., Astarloa, J. M. D., Rosso, J. J., Foresti, F., Oliveira, C. (2016). Highlighting *Astyanax* Species Diversity through DNA Barcoding. *PlosOne*. 11(12), e0167203.
- Russo, C. A. M., Miyaki, C Y., Pereira, S. L. (2004). Reconstrução filogenética: métodos geométricos. In Matioli, R. S. (Ed.) *Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto: Holos Editora.
- Ryter, S. W., Cloonan, S. M., Choi, A. M. K. (2013). Autophagy: A critical regulator of cellular metabolism and homeostasis. *Molecules and Cells*. 36, 7–16.
- Ryter, S. W., Mizumura, K., Choi, A. M. K. (2014) The impact of autophagy on cell death modalities. *International Journal of Cell Biology* 2014, 502676.
- Sales, C. F., Barbosa Pinheiro, A. P., Ribeiro, Y. M., Weber, A. A., Paes-Leme F. O., Luz, R. K., Bazzoli, N., Rizzo, E., Melo, R. M. C. (2020). Effects of starvation and refeeding cycles on spermatogenesis and sex steroids in the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 500, 110643.
- Sales, C. F., Melo, R. M. C., Pinheiro, A. P. B., Luz, R. K., Bazzoli, N., Rizzo, E. (2019). Autophagy and Cathepsin D mediated apoptosis contributing to ovarian follicular atresia in the Nile tilapia. *Molecular Reproduction and Development*. 86, 1592–1602.
- Santos, G. B. (2010). A ictiofauna da bacia do Alto Paraná (rio Grande e rio Paranaíba). *MG Biota*. Belo Horizonte. 2(6), 5-25.

- Santos, G. B., Formagio, P. S. (2000). Estrutura da ictiofauna dos reservatórios do rio Grande, com ênfase no estabelecimento de peixes piscívoros. *Inf. Agrop.*, Belo Horizonte, 21(2), 98-106.
- Sato, Y., Verani, N. F., Nuñez, A. P. O., Godinho, H. P., Verani, J. R. (2003). Padrões reprodutivos de peixes da bacia do São Francisco. In: Godinho, H.P. & Godinho, A. L. (Ed.) *Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais*. Ed. PUC Minas, Belo Horizonte, Brasil, pp. 229–274.
- Schulz, R. W., de França, L. R., Lareyre, J. J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R. H., Miura, T. (2010). Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology*. 165, 390–411.
- Schulz, U. H., Martins-Júnior, H. (2001). *Astyanax fasciatus* as bioindicator of water pollution of Rio dos Sinos, RS, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*. 61, 615-622.
- Scribner, K. T., Page, K. S., Bartron, M. L. (2001). Hybridization in freshwater fishes: a review of case studies and cytonuclear methods of biological inference. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 10, 293–323.
- Shimizu, Y., Shibata, N., Yamashita, M. (1997). Spermiogenesis without preceding meiosis in the hybrid medaka between *Oryzias latipes* and *O. curvinotus*. *The Journal of Experimental Zoology*. 279, 102-112.
- Torgasheva, A. A., Borodin, P. M. (2016). Cytological basis of sterility in male and female hybrids between sibling species of grey voles *Microtus arvalis* and *M. levis*. *Scientific Reports*. 6, 36564.
- Thomé, R. G., Domingos, F. F. T., Santos, H. B., Martinelli, P. M., Sato, Y., Rizzo, E., Bazzoli, N. (2012). Apoptosis, cell proliferation and vitellogenesis during the folliculogenesis and follicular growth in teleost fish. *Tissue and Cell* 44, 54–62.
- Trigo, T. C., Freitas, T. R. O., Kunzler, G., Cardoso, L., Silva, J. C. R., Johnson, W. E., O'Brien, S. J., Bonatto, S. L., Eizirik, E. (2008). Inter-species hybridization among Neotropical cats of the genus *Leopardus*, and evidence for an introgressive hybrid zone between *L. geoffroyi* and *L. tigrinus* in southern Brazil. *Molecular Ecology*. 17: 4317–4333.
- Vedrell, J. M., García, F., Veiga, A., Calderón, G., Egozcue, S, Egozcue, J., Barri, P.N. (1999). Meiotic abnormalities and spermatogenic parameters in severe oligoasthenozoospermia. *Human Reproduction*. 14 (2), 375-378.

- Veregue, A. M. L, Orsi, M. L. (2003). Biología reproductiva de *Astyanax scabripinnis paranae* (Eigenmann) (Osteichthyes, Characidae), do ribeirão Marrecas, bacia do rio Tibagi, Paraná. *Revista Brasileira de Zoologia*. 20 (1), 97-105.
- de Waal, P. P., Leal, M. C., García-López, Á., Liarte, S., de Jonge, H., Hinfray, N., Brion, F., Schulz, R. W., Bogerd, J. (2009). Oestrogen-induced androgen insufficiency results in a reduction of proliferation and differentiation of spermatogonia in the zebrafish testis. *Journal of Endocrinology*. 202, 287–297.
- Wallis, G. P., Cameron-Christie, S. R., Kennedy, H. L., Palmer, G., Sanders, T. R., Winter, D. J. (2017). Interspecific hybridization causes long-term phylogenetic discordance between nuclear and mitochondrial genomes in freshwater fishes. *Molecular Ecology*. 26, 3116–3127.
- Ward, R. D. (2009). DNA barcode divergence among species and genera of birds and fishes. *Molecular Ecology Resources*. 9, 1077-1085.
- Whitaker, M. (1996). Control of meiotic arrest. *Reviews of Reproduction*. 1, 127-135.
- Wills, P. S., Sheehan, R. J., Allen Jr, S. K. (2000). Reduced Reproductive Capacity in Diploid and Triploid Hybrid Sunfish. *Transactions of the American Fisheries Society* 129, 30–40.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F. R., Currie, A. R. (1980) Cell Death: The Significance of Apoptosis. *International Review of Cytology*. 68, 251–306.
- Xue, L., Fletcher, G. C., Tolkovsky, A. M. (1999). Autophagy is activated by apoptotic signalling in sympathetic neurons: An alternative mechanism of death execution. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 14, 180–198.
- Yaakub, S. M., Bellwood, D. R., van Herwerden, L., Walsh, F. M. (2006). Hybridization in coral reef fishes: Introgression and bi-directional gene exchange in *Thalassoma* (family Labridae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 40, 84–100.
- Yaron, Z.; Levavi-Sivan, B. (2011). Endocrine regulation of fish reproduction. In: Farrel, A. P. (Ed). *Encyclopedia of fish physiology: from genome to environment*. Elsevier p. 15001508.
- Yoshikawa, H., Xu, D., Ino, Y., Yoshino, T., Hayashida, T., Wang, J., Yazawa, R., Yoshizaki, G., Takeuchi, Y. (2018). Hybrid sterility in fish caused by mitotic arrest of primordial germ cells. *Genetics*. 209, 507–521.
- Yu, J., Kuroda, C., Gong, X. (2014) Natural hybridization and introgression between *Lingularia cymbulifera* and *L. tongolensis* (Asteraceae, Senecioneae) in four different locations. *PlosOne*. 9(12), e115167.

Yue, Z., Jin, S., Yang, C., Levine, A. J., Heintz, N. (2003). Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100, 15077–15085.

7. APÊNDICE: PRODUÇÃO CIENTÍFICA

1) Sales, Camila Ferreira ; **Pinheiro, Ana Paula Barbosa** ; Ribeiro, Yves Moreira ; Weber, André Alberto ; Paes-Leme, Fabíola de Oliveira ; Luz, Ronald Kennedy ; Bazzoli, Nilo ; Rizzo, Elizete ; Melo, Rafael Magno Costa. **2020**. Effects of starvation and refeeding cycles on spermatogenesis and sex steroids in the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 500, 110643.

2) **Pinheiro, Ana Paula Barbosa** ; Melo, Rafael Magno Costa ; Teixeira, Daniel Fonseca ; Birindelli, José Luís Oliván ; Carvalho, Daniel Cardoso ; Rizzo, Elizete. **2019**. Integrative approach detects natural hybridization of sympatric lambaris species and emergence of infertile hybrids. *Scientific Reports*: 9, 1-12.

3) Sales, C. F. ; Melo, R. M. C. ; **Pinheiro, Ana Paula B.** ; Luz, R. K. ; Bazzoli, N. ; Rizzo, E. **2019**. Autophagy and Cathepsin D mediated apoptosis contributing to ovarian follicular atresia in the Nile tilapia. *Molecular Reproduction and Development*: 86, 1592-1602.

4) Sales, C. F. ; Lemos, F. S. ; Morais, R. D. V. S. ; Thomé, R. G. ; Santos, H. B. ; **Pinheiro, A. P. B.** ; Bazzoli, N. ; Rizzo, E. **2018**. Thermal stress induces heat shock protein 70 and apoptosis during embryo development in a Neotropical freshwater fish. *Reproduction Fertility and Development*. 31, 547-556.

5) Prado, Paula Suzanna ; **Pinheiro, Ana Paula Barbosa** ; WEBER, ANDRÉ ALBERTO ; BAZZOLI, NILO ; RIZZO, ELIZETE. **2018**. Expression patterns and immunolocalisation of IGF-I and IGF-II in male and female gonads of the Neotropical characid fish *Astyanax fasciatus*. *FISH PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY*. 45, 167-176.