

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

**TESE DE DOUTORADO**

**BIOLOGIA REPRODUTIVA E ESTRUTURA POPULACIONAL DE**  
***Prochilodus lineatus* EM UM REMANESCENTE LÓTICO**  
**DA BACIA DO RIO GRANDE**

**Violeta da Rocha Perini**

Belo Horizonte-MG  
Julho de 2013

**Violeta da Rocha Perini**

**BIOLOGIA REPRODUTIVA E ESTRUTURA POPULACIONAL DE  
*Prochilodus lineatus* EM UM REMANESCENTE LÓTICO  
DA BACIA DO RIO GRANDE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular da UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências (área de concentração em Biologia Celular).

Belo Horizonte-MG  
Julho de 2013

Essa tese foi desenvolvida no Laboratório de Ictiohistologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

**ORIENTADORA:**

PROFª. DRA. ELIZETE RIZZO

**CO-ORIENTADOR:**

PROF. DR. NILO BAZZOLI

**COLABORADORES:**

PROF. DR. DANIEL CARDOSO CARVALHO

PROFª. DRA. DENISE APARECIDA ANDRADE DE OLIVEIRA

**APOIO FINANCEIRO E INSTITUCIONAL:**

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);
- Fundação de Amparo à Pesquisa de Estado de Minas Gerais (FAPEMIG);
- Furnas Centrais Elétricas;
- Laboratório de Genética Animal da Escola de Veterinária da UFMG (LGEV).

*Dedico esse trabalho aos meus avós, Dona Mandina e Seu Bimbo.*

## **AGRADECIMENTOS**

Este trabalho não seria realizado sem o apoio de diversas pessoas, por isso agradeço a (o):

- Minha orientadora Dra. Elizete Rizzo, pelos ensinamentos de alta qualidade profissional, tranquilidade nos momentos de ansiedade, paciência e parceria;
- Meu co-orientador, Dr. Nilo Bazzoli, pela parceria de sete anos e exemplo profissional;
- Dr. Daniel Carvalho, pelos ensinamentos em genética, pela paciência, competência e por acreditar no meu trabalho;
- Dirceu Marzulo pelo apoio e pela confiança depositada nesse projeto;
- À equipe de campo: Alessandro Paschoalini e Paulo Formagio pelo auxílio em campo e pela amizade; aos pescadores: Juninho, Flavinho, Eduardo e Cidinho; à Lilian, Dudu, Guilherme, Dona Norma e Seu Jair por nos receberem em sua casa, e aos funcionários da Estação de Piscicultura de Furnas;
- Dr. José Senhorini, Rita e pescadores do CEPTA, pelo auxílio técnico com as coletas em Cachoeira de Emas;
- Amigos e colegas do Labictio: Mônica, Ana Paula, Rafael, Yuri, Léo, Fabrício, Luís, Letícia e Davidson, pelo auxílio em experimentos, pela ótima convivência e pela amizade. Agradeço em especial à Paula, minha grande amiga e à Cláudia pela parceria no projeto;
- Amigos e professores da Biologia Celular da UFMG, em especial à Danielle e Luíza.
- Prof<sup>a</sup> Denise Oliveira, pela colaboração, e a todos os alunos e técnicos do LGEV;
- Agências financiadoras: CNPq, FAPEMIG, CAPES e Eletrobrás Furnas;
- Amigas do coração: Cissa, Iaci, Lara, Carol, Clara, Alice, Wanessa, Isabela, Carla, Zabeleza, obrigada por existirem e tornarem minha vida feliz, sem vocês eu nada seria!
- A família Rocha, família Perini e família David, pelo carinho;
- Mãe e Pai, por terem me dado a vida, me criado, me amado incondicionalmente e investido na minha educação como minha maior herança;
- Rogério, meu amado companheiro e incentivador, obrigada pela compreensão e por enfrentar comigo essa jornada!

*O biólogo passa a vida tentando encontrar padrões e certezas naquilo  
que há de mais entrópico: a vida*

Belo Horizonte, junho de 2013

## SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO .....	i
ABSTRACT .....	iii
LISTA DE ABREVIATURAS .....	v
LISTA DE FIGURAS .....	vii
LISTA DE TABELAS .....	ix
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA .....	01
Usinas hidrelétricas e a ictiofauna neotropical .....	01
Reprodução de peixes .....	03
Níveis de esteroides sexuais .....	04
Histopatologia hepática .....	07
Genética de populações de peixes .....	08
<i>Prochilodus lineatus</i> .....	09
Região de estudo .....	11
2. OBJETIVOS .....	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	15
Amostragem de peixes e índices biológicos .....	15
Níveis de esteroides sexuais .....	17
Maturação gonadal, diâmetro ovocitário, fecundidade e atresia folicular .....	17
Histopatologia hepática .....	18
TUNEL <i>in situ</i> .....	18
Extração de DNA e análise de microssatélites .....	19
Diversidade genética .....	20
Estrutura genética espacial .....	21
Fluxo gênico .....	21
Análise estatística .....	21
4. RESULTADOS .....	23
4.1. Biologia reprodutiva de <i>P. lineatus</i> .....	23
4.2. Genética de populações de <i>P. lineatus</i> .....	34
4.3. Histopatologia hepática e reação de TUNEL <i>in situ</i> .....	46
5. DISCUSSÃO .....	49

Biologia reprodutiva de <i>P. lineatus</i> .....	49
Genética de populações de <i>P. lineatus</i> .....	51
Histopatologia hepática de <i>P. lineatus</i> .....	56
6. CONCLUSÕES .....	58
7. REFERÊNCIAS .....	59
8. APÊNDICE: Artigo publicado na revista <i>Fish Physiology and Biochemistry</i> .....	76



## RESUMO

O rio Grande é conhecido pela alta capacidade de geração de energia elétrica, e ao longo do seu leito diversas grandes usinas foram implantadas, fragmentando seu curso, alterando o ecossistema e reduzindo a biodiversidade nativa. O presente trabalho avaliou a biologia reprodutiva e a genética populacional de *Prochilodus lineatus* no sistema de rios Grande, Pardo e Mogi-Guaçu, entre a usina de Porto Colômbia e Cachoeira de Emas. Espécimes foram capturados bimestralmente nos seguintes pontos de amostragem: (S1) localizado no rio Grande, imediatamente a jusante da represa de Porto Colômbia; (S1') no rio Grande, imediatamente a jusante da confluência com o rio Pardo; (S2) no rio Pardo, a 110 km de S1; (S3), no rio Mogi Guaçu, região de Cachoeira de Emas, cerca de 200 km de S2 e (S4) no rio Pardo, a montante da confluência com o rio Mogi Guaçu, cerca de 40 km de S2. Para avaliação da biologia reprodutiva, os seguintes parâmetros foram analisados: índice gonadossomático (GSI), estádios de maturação gonadal, diâmetro do folículo vitelogênico, atresia folicular, fecundidade e níveis plasmáticos de esteroides sexuais. Em S1, peixes em maturação apresentaram alterações nos parâmetros reprodutivos: menor GSI, diâmetro dos folículos vitelogênicos, fecundidade e índice de atresia folicular, quando comparados a S2 e S3. A frequência de peixes em maturação foi maior nos pontos S2 e S3 e, a desova foi registrada somente em S3. A fecundidade absoluta variou de  $27,55 \times 10^3$  a  $440,47 \times 10^3$ , sendo maior no ponto S2. Nos pontos S2 e S3, as concentrações séricas de testosterona e  $17\beta$ -estradiol de fêmeas e testosterona nos machos apresentaram grandes variações durante a maturação gonadal, enquanto peixes de S1 mostraram variações pouco significativas. Os níveis de  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona mantiveram-se elevados em peixes maduros nos pontos S2 e S3, onde as fêmeas alcançaram a maturação final ovocitária. Os resultados indicaram que *P. lineatus* não se reproduz no rio Grande (S1), mas provavelmente usa o rio Pardo (S2), como rota migratória em direção ao rio Mogi Guaçu (S3), onde completa sua maturação gonadal e desova. Para análise da estrutura populacional, amostras da nadadeira adiposa de 30 exemplares de *P. lineatus* foram coletadas nos pontos S1, S1', S2, S3 e S4 durante a estação reprodutiva. As amostras foram submetidas à extração de DNA, amplificação por PCR e análise de microssatélites usando-se 10 *primers* descritos para o gênero *Prochilodus*. Todos os microssatélites usados foram polimórficos, com números alelos por locus variando de 5 a 32. Dos 179 alelos detectados, 32 eram privados para o seu ponto de coleta e estavam em baixa frequência ( $\leq 0,05$ ), sendo os dois alelos privados mais frequentes detectados no ponto

S4. Peixes do ponto S1 apresentaram maior coeficiente de endogamia, o qual apresentou correlação com características abióticas dos pontos estudados. Os dados indicam que *P. lineatus* não constitui uma população genética panmítica na área de estudo, mas está subdividido em três agrupamentos que coexistem e mantêm um nível de estruturação baixo, que poderia não estar relacionada ao isolamento geográfico, mas a um comportamento de *homing*. Além disso, as populações de *P. lineatus* poderiam constituir uma metapopulação influenciada por uma dinâmica de fonte-sumidouro, em que os pontos localizados nos tributários (S2, S3 e S4) atuariam como fonte de indivíduos e os pontos localizados no rio principal (S1 e S1') como sumidouro. Para avaliar histopatologia hepática, amostras de fígado de *P. lineatus* foram coletadas nos três rios de estudo e analisados os parâmetros: ocorrência de apoptose, índice hepatossomático (HSI) e índice de lesão tecidual (IL). O IL foi calculado levando em consideração a ocorrência e importância de seis alterações teciduais: necrose, deslocamento de núcleo, infiltrado inflamatório, vacuolização citoplasmática, hiperemia e granulação citoplasmática. Diferenças significativas relacionadas ao local de coleta dos espécimes foram observadas, com peixes do ponto S1 apresentando maiores IL e ocorrência de necrose do que peixes dos pontos S2 e S3. O HSI e a ocorrência de apoptose não apresentaram diferenças significativas entre os pontos de coleta. Em conjunto, os resultados do presente estudo contribuem para a compreensão do comportamento e biologia de *P. lineatus* em ambiente natural, bem como fornecem parâmetros importantes para a conservação e manejo de suas populações e para a piscicultura.

**Palavras-chave:** Usina de Porto Colômbia, rio Pardo, rio Mogi Guaçu, esteroides sexuais, desova, fecundidade, microsatélites, genética de populações.

## **ABSTRACT**

The Grande River is known for its high capacity of power generation, and in its channel several large plants were established, fragmenting its course, changing the ecosystem and reducing native biodiversity. The present study evaluated the reproductive biology and population genetics of *Prochilodus lineatus* in the system composed by Grande River, Pardo River and Mogi Guaçu River, between Porto Colombia dam and Cachoeira de Emas. Specimens were collected bimonthly at the following sampling sites: (S1) located in the Grande River, immediately downstream from the Porto Colômbia dam, (S1') in the Grande River, immediately downstream from the confluence with the Pardo River; (S2) in the Pardo River, 110 km from S1, (S3) in the Mogi Guaçu River, region of Cachoeira de Emas, about 200 km from S2, and (S4) in the Pardo River, upstream from the confluence with the Mogi Guaçu River, about 40 km from S2. To evaluate the reproductive biology, the following parameters were analyzed: gonadosomatic index (GSI), gonadal maturation stages, vitellogenic follicle diameter (OD), follicular atresia (FA), fecundity (AF) and plasmatic levels of sex steroids. In S1, maturing fish showed changes in reproductive parameters: lower values of GSI, OD, FA and AF, compared to S2 and S3. The frequency of maturing fish was higher in sites S2 and S3, and spawning was recorded only in S3. Absolute fecundity ranged from  $27.55 \times 10^3$  to  $440.47 \times 10^3$ , being greater at site S2. In sites S2 and S3, seric concentrations of testosterone and  $17\beta$ -estradiol in females and testosterone in males showed large variations during gonadal maturation, while fish from S1 showed minor variations. The  $17\alpha$ -hydroxyprogesterone levels remained high in mature fish in sites S2 and S3, where females reached the final oocyte maturation. The results indicated that *P. lineatus* does not reproduce the Grande River (S1), but probably uses the Pardo River (S2) as migratory route towards the Mogi Guaçu River (S3), where it completes its gonadal maturation and spawning. For analysis of population structure, samples of adipose fin of 30 specimens of *P. lineatus* were collected at sites S1, S1', S2, S3 and S4 during the breeding season. Samples were subjected to DNA extraction, PCR amplification and microsatellite analysis using 10 primers described for the genus *Prochilodus*. All microsatellites used were polymorphic, with numbers of alleles per locus ranging from 5 to 32. From the 179 alleles detected, 32 were private for their sample site and were at low frequency ( $\leq 0.05$ ), and the two most frequent private alleles were detected in site S4. Fish from site S1 presented higher inbreeding coefficient, which presented correlation with abiotic characteristics of the sites studied. The

data indicate that *P. lineatus* does not constitute a panmitic genetic population in the study area, but it is divided into three clusters which coexist and maintain a low level of structuring, which could not be related to geographic isolation, but to homing behavior. Furthermore, *P. lineatus* populations could constitute a metapopulation influenced by a source-sink dynamics, in which the sites located in tributaries (S2, S3 and S4) would act as sources of individuals and the sites located in the main River (S1 and S1') as a sink area. To assess hepatic histopathology, liver fragments of *P. lineatus* were collected in the three rivers of the study and the following parameters were analyzed: occurrence of apoptosis, hepatosomatic index (HSI), and index of tecidual injury (IL). The IL was calculated considering the occurrence and the importance of six alterations: necrosis, nuclear changes, inflammatory infiltration, vacuolation, hyperemia and cytoplasmic granulation. Significant differences related to the sample site of the specimens were observed, with fish from S1 presenting higher IL and occurrence of necrosis than fish from sites S2 and S3. The HSI and the occurrence of apoptosis showed no significant differences between the sampling sites. Together, the results of this study contribute to the understanding of the behavior and biology of *P. lineatus* in its natural environment, as well as provide important parameters for the conservation and management of their populations and fish farming.

**Keywords:** Porto Colômbia dam, Pardo River, Mogi Guaçu River, sex steroids, spawning, fecundity, microsatellite, population genetics.

## LISTA DE ABREVIATURAS

17 $\alpha$ -OHP = 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona

17 $\beta$ -E = 17 $\beta$ -estradiol

A = escore da lesão hepática

AF = fecundidade absoluta

AF = folículo vitelogênico atrésico

BM = massa corporal

CMM = centro melanomacrofágico

DAB = diaminobenzidina

DNA = ácido desoxirribonucléico

DP = desvio padrão

DPH = 17 $\alpha$ -20 $\beta$ -dihidroxi-4-pregnen-3-one

EP = erro padrão

FA = índice de atresia folicular

F<sub>IS</sub> = coeficiente de endogamia

FSH = hormônio folículo estimulante

GM = massa gonadal

GnRH = hormônio liberador de gonadotrofina

GSI = índice gonadossomático

H = hiperemia

He = heterozigosidade esperada

Ho = heterozigosidade observada

HWE = equilíbrio de Hardy-Weinberg

IL = índice de lesão hepática

In = infiltrado inflamatório

K = fator de condição de Fulton

L = lúmen tubular

LE = equilíbrio de ligação genotípica

LH = hormônio luteinizante

LM = massa do fígado

M = taxa de migração

MCMC = Monte Carlo cadeias de Markov

N = necrose

Na = número de alelos

Ne = número de alelos efetivos

NO = número de ovócitos vitelogênicos na amostra

OD = diâmetro ovocitário

PCR = reação em cadeia da polimerase

PF = folículo perinucleolare

POF = folículo pós-ovulatório

RF = fecundidade relativa

SC = espermátócito

SG = espermatogônia

SM = massa da amostra

ST = espermátide

T = testosterona

TL = comprimento total

UHE = usina hidroelétrica

VF = folículo vitelogênico

W = grau de importância da lesão hepática

YB = corpo amarelo

Z = espermatozoide

$\Delta K$  = número de agrupamentos

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Esquema ilustrativo do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas de teleósteos. LH = hormônio luteinizante; FSH = hormônio folículo estimulante .....	05
<b>Figura 2:</b> Exemplar de curimatá <i>Prochilodus lineatus</i> do rio Mogi Guaçu, São Paulo, Brasil .....	10
<b>Figura 3:</b> Principais reservatórios brasileiros da bacia do rio Paraná .....	12
<b>Figura 4:</b> Localização dos pontos de amostragem de <i>Prochilodus lineatus</i> na bacia do rio Grande, Brasil .....	16
<b>Figura 5:</b> Variações anuais de temperatura, transparência e condutividade da água, e índice gonadossomático de fêmeas e de machos de março/2010 a fevereiro/2011, em três pontos da bacia do rio Grande .....	29
<b>Figura 6:</b> Secções histológicas de ovários e testículos de <i>Prochilodus lineatus</i> em diferentes estádios de maturação corados com hematoxilina-eosina .....	31
<b>Figura 7:</b> Frequência relativa dos estágios de maturação gonadal de fêmeas e machos de <i>Prochilodus lineatus</i> amostrados de março/2010 a fevereiro/2011 .....	32
<b>Figura 8:</b> Concentrações séricas da testosterona, $17\beta$ -estradiol e $17\alpha$ -hidroxiprogesterona em fêmeas e machos de <i>Prochilodus lineatus</i> .....	33
<b>Figura 9:</b> Correlação pareada entre a distância genética e a distância geográfica entre populações de <i>Prochilodus lineatus</i> da bacia do rio Grande, utilizando o teste de Mantel, com a distância genética expressa pelos índices $F_{ST}$ e $D_{EST}$ .....	42
<b>Figura 10:</b> Distribuição proporcional dos espécimes de <i>Prochilodus lineatus</i> nos três clusters identificados pelo programa STRUCTURE 2.2 .....	43
<b>Figura 11:</b> Ilustração do modelo de estruturação populacional de <i>Prochilodus lineatus</i> nos pontos de amostragem na bacia do rio Grande, determinado pelo programa GENECLASS .....	44

**Figura 12:** Assimetria nas proporções médias do fluxo gênico de imigrantes e emigrantes em cinco populações de *Prochilodus lineatus* da bacia do rio Grande ..... 45

**Figura 13:** Secções histológicas de fígados de *Prochilodus lineatus* coletados no rio Grande, rio Pardo e rio Mogi Guaçu, mostrando as principais alterações histológicas detectadas ..... 48



**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1:</b> Loci dos dez microssatélites de <i>Prochilodus lineatus</i> e <i>Prochilodus argenteus</i> utilizados no estudo e agrupados em três plex .....	20
<b>Tabela 2:</b> Variáveis biológicas de fêmeas e machos de <i>Prochilodus lineatus</i> em três pontos de coleta na bacia do rio Grande, de março de 2010 a fevereiro de 2011 .....	26
<b>Tabela 3:</b> Parâmetros físico-químicos da água durante a estação reprodutiva de <i>Prochilodus lineatus</i> (setembro de 2010 a fevereiro de 2011) em três pontos de coleta da bacia do rio Grande .....	27
<b>Tabela 4:</b> Índices genéticos das cinco populações de <i>Prochilodus lineatus</i> da bacia do rio Grande .....	36
<b>Tabela 5:</b> Allelos privados de <i>Prochilodus lineatus</i> da bacia do rio Grande .....	38
<b>Tabela 6:</b> Correlação pareada entre o índice de endogamia ( $F_{IS}$ ) e a heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) versus os dados bióticos de peixes e dados abióticos de água .....	39
<b>Tabela 7:</b> Dados abióticos da água em cinco pontos de coleta na bacia do rio Grande, e dados biométricos de <i>Prochilodus lineatus</i> amostrados em cada ponto .....	40
<b>Tabela 8:</b> Valores de $F_{ST}$ e $D_{EST}$ entre pares de populações de <i>Prochilodus lineatus</i> . .....	41
<b>Tabela 9:</b> Índice hepatossomático, índice de lesão hepática e ocorrência de apoptose em fígados de <i>Prochilodus lineatus</i> de três pontos da bacia do rio Grande .....	47

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

### **Usinas hidrelétricas e a ictiofauna neotropical**

A transformação econômica e social do século XX decorrente do aumento dramático da população humana e da atividade econômica exigiu maior demanda por energia e recursos naturais. Nesse contexto, o represamento de rios tornou-se prática comum nas bacias hidrográficas sul-americanas, especialmente para a produção de energia elétrica. Atualmente, a maioria das grandes bacias brasileiras é represada ou influenciada em algum grau por usinas, e pesquisas recentes estimam haver mais de 700 grandes reservatórios no país (Agostinho *et al.* 2007; Pelicice & Agostinho 2008). Os impactos sociais e ambientais de barragens tem gerado considerável preocupação, atraindo estudos focados nos efeitos de sua implantação sobre o ecossistema fluvial. O aumento da pressão produzido por essa grande quantidade de estudos, associado à oferta de novas alternativas na matriz energética, tem sido acompanhado por um declínio global na construção de novas barragens, embora muitas ainda sejam construídas na África, Ásia e América Latina. As principais causas incluem o crescimento demográfico e econômico, o aumento da demanda por energia e as atuais políticas de planejamento que focam os benefícios das barragens e dão pouca atenção aos seus impactos (Dugan *et al.* 2010).

Reservatórios interferem em qualquer rio onde sejam construídos, alterando o fluxo de água e sistemas aquáticos e terrestres de uma forma drástica e permanente (Nilsson & Berggren 2000). Barragens podem afetar as comunidades de peixes e criar, nos segmentos imediatamente a jusante, condições térmicas e hidrodinâmicas instáveis (Baxter 1977), promovendo mudanças na conexão dos rios com as planícies de inundação (Petry *et al.* 2003; Aarts *et al.* 2004; Hirzinger *et al.* 2004; Koel 2004), interceptando rotas migratórias e reduzindo a pesca (Corbacho & Sánchez 2001; Morita & Yamamoto 2002). Ao degradar habitats de alimentação e de reprodução ao longo do rio, o represamento causa alterações na abundância e composição de espécies, com redução ou mesmo eliminação local de algumas populações, e um aumento acentuado de outras espécies que encontram condições favoráveis para se proliferar no novo ambiente (Kummu & Sarkkula 2008). Neste ambiente modificado, espécies em níveis tróficos superiores, especialistas, com alto endemismo e capacidade de dispersão limitada, tendem a desaparecer primeiro (Winemiller 1989; Sato *et al.* 2005). As espécies persistentes são geralmente generalistas em termos de requisição de habitat e alimento, tem longo tempo de geração e habitam uma grande variedade geográfica

(Winemiller 1989; Sato *et al.* 2005). Apesar de menos investigado, o impacto a jusante das barragens também é degradante para o ecossistema e sua ictiofauna, uma vez que as usinas afetam primariamente a dinâmica de fluxo de água e retêm sedimentos e nutrientes a montante, o que reduz a turbidez da água (Agostinho *et al.* 2008).

O sistema do alto rio Paraná é um exemplo de desenvolvimento hidrelétrico sem adequada preocupação com a permanência das espécies nativas de peixes. Os grandes migradores outrora abundantes, como o dourado *Salminus brasiliensis*, o curimbatá *Prochilodus lineatus*, a piracanjuba *Brycon orbignyanus*, o pintado *Pseudoplatystoma corruscans*, o jaú *Paulicea lutkeni* e o cascudo-preto *Rhinelepis aspera*, tiveram suas populações muito reduzidas ou estão virtualmente extintos no rio Grande, no rio Tietê e no rio Paranapanema, que foram os principais alvos da pesca profissional até a década de 1960 (Rosa & Lima 2008).

Diversos estudos na América do Sul analisaram o impacto de barragens sobre as comunidades de peixes (Godinho & Godinho 1994; Petrere 1996; Ponton & Vauchel 1998; De Mérona & Albert 1999; Sato *et al.* 2005; Arantes *et al.* 2010). Entretanto, a maioria dos artigos avaliou as mudanças em populações dos rios principais, onde as usinas estão instaladas, e poucos se concentraram em peixes de tributários dos rios barrados. Nesse contexto, destacam-se estudos que avaliaram as comunidades de peixes em trechos lânticos e lóticos de afluentes do reservatório de Itaipu, no rio Paraná (Oliveira *et al.* 2005), e a importância dos tributários para a manutenção da diversidade de peixes no reservatório de Capivara no rio Paranapanema (Hoffmann *et al.* 2005). A avaliação das variações espaciais e temporais na estrutura das comunidades de peixes devido à construção de represas é altamente relevante para os rios e riachos da bacia do rio Paraná e sub-bacia do rio Grande, os quais foram intensamente modificados nos últimos 50 anos. Além disso, é importante que cada rio seja estudado individualmente (Penczak *et al.* 2009) e avaliado em longo prazo, pois os efeitos sobre as comunidades de peixes podem ser evidenciados após décadas da construção de uma usina (Matthews & Marsh-Matthews 2007).

No Brasil, as autoridades estão, aparentemente, informadas das consequências do bloqueio das rotas migratórias para a pesca, haja vista que a construção de passagens de peixes, especificamente escadas de peixes, tem sido frequente com o objetivo de amenizar os problemas, ou simplesmente por formalidade burocrática (Pelicice & Agostinho 2008). Há grande pressão de agências públicas e governamentais para a instalação de novas passagens de peixes nas usinas brasileiras, sendo que em alguns estados sua instalação é obrigatória

(Agostinho *et al.* 2007; Pelicice & Agostinho 2008). Todavia, a construção de passagens de peixes na América do Sul normalmente não está baseada em conhecimentos científicos e ecológicos ou em estudos do ecossistema local, mas em estudos de espécies neárticas, como o modelo de estratégias usadas no manejo de populações de salmão na América do Norte e Europa (Larinier & Marmulla 2004). De acordo com Pelicice & Agostinho (2008) as escadas de peixes podem funcionar como verdadeiras armadilhas ecológicas em algumas barragens sul-americanas, podendo reduzir o recrutamento e o tamanho da população ao longo do tempo. A fim de evitar a criação de armadilhas ecológicas e outros efeitos negativos, decisões do porquê, onde, e como instalar uma passagem de peixe devem sempre basear-se em informações ecológicas e monitoramento de longo prazo, o que cria a necessidade de pesquisas antes e após instalação das barragens (Agostinho *et al.* 2004; Pelicice & Agostinho 2008).

Os peixes de água doce compreendem de 20 a 25% da biodiversidade de vertebrados. Existem no mundo mais 27.000 espécies de peixes descritas (Nelson 2006), sendo o Brasil, o país com a maior diversidade de peixes (2.587 espécies) (Buckup *et al.* 2007). Considerando que a região neotropical possui a mais rica ictiofauna de água doce do mundo, esta riqueza está ameaçada pelos numerosos reservatórios construídos e planejados. A escassez de dados para a maioria dos rios neotropicais impede a previsão adequada dos efeitos negativos dos reservatórios nesses sistemas e, portanto diagnósticos corretos dos fatores que influenciam a ictiofauna são necessários para que medidas de conservação possam ser tomadas com base em conhecimento científico de qualidade (Hoffmann *et al.* 2005).

### **Reprodução de peixes**

A reprodução representa um dos aspectos mais importantes da biologia dos peixes. Falhas nesse processo por anos consecutivos, causadas principalmente por modificações no habitat, podem levar à depleção ou mesmo extinção dos estoques naturais e favorecimento à introdução de novas espécies (Suzuki & Agostinho 1997; Sato & Sampaio 2005). A vulnerabilidade do sistema reprodutor faz com que ele apresente respostas morfológicas, fisiológicas e moleculares a estresses do ambiente, o que pode provocar problemas ou mesmo interrupção da reprodução (Pottinger 1999). Diversos parâmetros biológicos como a fecundidade e a atresia folicular tem sido estudados nos peixes neotropicais a fim de avaliar possíveis alterações ambientais em determinado ecossistema, já que fatores endógenos e exógenos afetam a produção de gametas (Sato *et al.* 2005; Arantes *et al.* 2010).

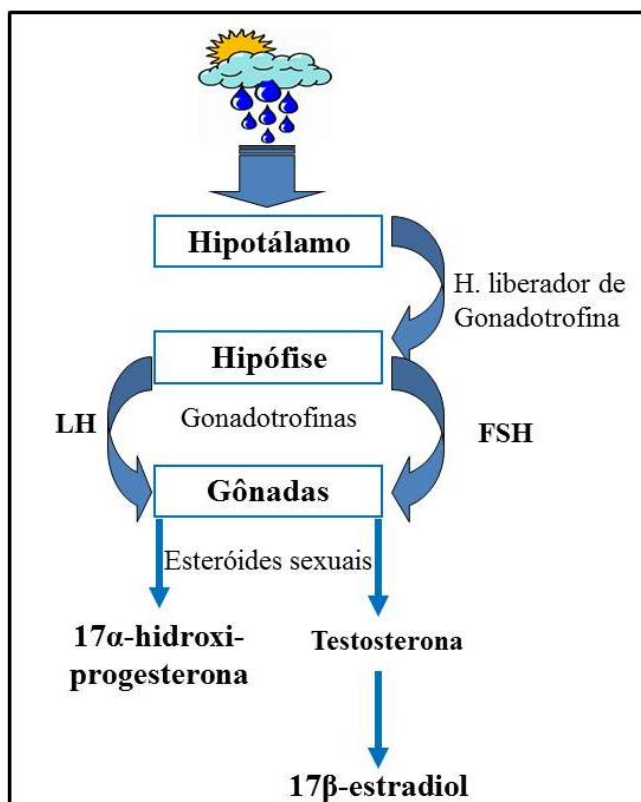
A fecundidade é uma variável que avalia o potencial reprodutivo de uma espécie por meio do número de ovócitos vitelogênicos presentes nos ovários de fêmeas maduras, e está sujeita a variações geográficas, sazonais e de disponibilidade de alimento (Bagenal & Braum 1978; Vazzoler 1996). A fecundidade relativa ao peso corporal é calculada com o objetivo de excluir a influência do peso na determinação da fecundidade. Além de auxiliar na solução de problemas relacionados com a estimativa do tamanho populacional, dinâmica de populações e nos prognósticos reprodutivos das espécies, a fecundidade em peixes também fornece subsídios importantes para a aquicultura, manejo da pesca e conservação de espécies e está relacionada com o diâmetro ovocitário e com as estratégias reprodutivas das espécies tais como: tipo de desova, tipo de ovo e cuidado parental (Suzuki *et al.* 2000).

Atresia folicular é um processo degenerativo que ocorre em ovários de todos os vertebrados, independente da idade, desenvolvimento gonadal e condições do meio ambiente (Saidapur 1978). Em teleósteos, a atresia folicular é mais frequente na fase vitelogênica, porém folículos pré-vitelogênicos e perinucleolares podem também sofrer atresia (Miranda *et al.* 1999). Quando peixes atingem a maturação ovariana, mas não desovam, seus ovários entram em intenso processo de regressão após o período reprodutivo, com muitos folículos vitelogênicos em atresia (Santos *et al.* 2008). A atresia folicular pré-ovulatória pode ser induzida por fatores endógenos e exógenos, incluindo estresse, jejum, confinamento, agentes biocidas e níveis inadequados de luz, oxigênio, temperatura e hormônios (Saidapur 1978; Rizzo & Bazzoli 1995; Nahum *et al.* 1996; Miranda *et al.* 1999). Histologicamente, a atresia folicular pode ser diagnosticada por diversos eventos, tais como: fragmentação do envelope nuclear com liberação do material genético para o ooplasma, liquefação e diminuição do volume do vitelo, formação de fendas na zona pelúcida e hipertrofia das células foliculares (Bazzoli & Rizzo 1995; Rizzo & Bazzoli 1995). A eliminação das células foliculares na atresia final de teleósteos envolve morte celular programada por apoptose (Wood & Van Der Kraak 2001; Wood & Van Der Kraak 2002; Wood & Kraak 2003; Santos *et al.* 2008; Morais *et al.* 2012).

### **Níveis de esteroides sexuais**

Em peixes, estímulos ambientais, como chuva, fotoperíodo e temperatura, são captados pelos órgãos sensoriais, convertidos em sinais eletroquímicos e transmitidos ao hipotálamo, estimulando a produção do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), que induz a adeno-hipófise a produzir e liberar gonadotrofinas na corrente sanguínea: hormônio

folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) (Kumakura *et al.* 2003; Weltzien *et al.* 2004). Estes dois hormônios agem sobre as gônadas estimulando a produção de esteróides sexuais, responsáveis pelo desenvolvimento e maturação dos gametas (Kumakura *et al.* 2003; Nagahama & Yamashita 2008) (Fig. 1).



**Fig. 1.** Esquema ilustrativo do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas de teleostes. LH = hormônio luteinizante; FSH = hormônio folículo estimulante.

Nas fêmeas, o FSH atua nas células da teca, estimulando a conversão do colesterol em testosterona. Na sequência, a testosterona é transportada às células foliculares e, sob a influência do FSH, é aromatizada em 17β-estradiol (17β-E) pela ação da enzima P450-aromatase (Nagahama *et al.* 1995). O 17β-E está envolvido na produção de vitelogenina e coreogenina pelos hepatócitos (Fausto *et al.* 2004; Senthilkumaran *et al.* 2004). A vitelogenina é uma fosfolipoglicoproteína produzida no fígado e transportada por via sanguínea ao ovário onde é endocitada e fragmentada em proteínas vitelínicas: lipovitelina e fosvitina (Matsubara & Sawano 1995). A coreogenina é precursora da proteína do envelope

do ovo de peixes, importante para proteção do ovo e embrião em desenvolvimento (Fausto *et al.* 2004). A testosterona (T) pode atuar na migração reprodutiva durante o período pré-ovulatório dos peixes (Munakata *et al.* 2001).

A queda do FSH, seguida pelo aumento do LH, induz a produção de  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona ( $17\alpha$ -OHP) pelas células da teca, que é posteriormente convertida em hormônio indutor da maturação final,  $17\alpha$ - $20\beta$ -dihidroxi-4-pregnen-3-one (DHP) ou  $17\alpha$ - $20\beta$ -trihidroxi-4-pregnen-3-one pela enzima  $20\beta$ -hidroxiesteroide-desidrogenase (Nagahama & Yamashita 2008; Lubzens *et al.* 2010). O DHP promove a maturação ovocitária final, evento essencial para ovulação e desova (Garcia-Lopez *et al.* 2007; Nagahama & Yamashita 2008).

Nos machos, o FSH induz a transformação do colesterol em pregnenolona nas células de Leydig. Esta, por meio de reações enzimáticas, é convertida em 11-ketotestosterona e T no retículo endoplasmático liso. Esses dois andrógenos tem funções semelhantes, sendo importantes no desenvolvimento do testículo e de caracteres sexuais secundários, além de influenciar também o comportamento reprodutivo (Haider 2007; Ohta *et al.* 2007). A testosterona é responsável pela maturação testicular, atuando na divisão das espermatogônias, formação de cistos de espermatócitos e início da liberação de espermatozoides no lume dos túbulos seminíferos (Weltzien *et al.* 2004; Schulz *et al.* 2010). O FSH também atua estimulando a conversão de T em estrógeno pela enzima P450-aromatase. O  $17\beta$ -E é responsável pela proliferação e auto-renovação de espermatogônias e pela diferenciação das células germinativas (Schulz & Miura 2002; Piferrer & Blazquez 2005; Miura *et al.* 2006), além de induzir a proliferação de células de Sertoli em testículos espermiados (Chaves-Pozo *et al.* 2007). Durante a maturação das células germinativas, altos níveis de T e  $17\beta$ -E inibem a liberação do FSH pela hipófise. O LH, mais ativo nas fases mais tardias da espermatogênese, estimula as células de Leydig a produzir  $17\alpha$ -OHP, a qual é convertida em DHP, responsável pela diferenciação e maturação dos espermatozoides (Yamada *et al.* 2002).

Os perfis de esteroides sexuais são variáveis importantes para a criação de peixes em pisciculturas e alguns trabalhos foram realizados com espécies neotropicais sob condições de cultivo (Gazola & Borella 1997; Barcellos *et al.* 2001; Barcellos *et al.* 2002; Arantes *et al.* 2010; Arantes *et al.* 2011). Apesar de pouco exploradas, tais informações são igualmente importantes para a reprodução na natureza, visto que, alterações ambientais podem desencadear desequilíbrios endócrinos que limitam a propagação e conservação de peixes nativos (Arantes *et al.* 2010; Domingos *et al.* 2012b).

## **Histopatologia hepática**

Além do sistema reprodutor, o tecido hepático também é conhecidamente sensível a alterações ambientais por estar envolvido em múltiplos processos fisiológicos tais como síntese de proteínas plasmáticas, secreção de bile, desintoxicação, mobilização de lipídios e síntese de vitelogenina para maturação de ovócitos (Van Dyk *et al.* 2007). Na maioria dos teleósteos o fígado é composto por dois lobos, o lobo direito que está ao lado da vesícula biliar, e o lobo esquerdo próximo ao baço (Suzuki *et al.* 1995). Histologicamente, no parênquima hepático, os hepatócitos estão arranjados em cordões celulares separados por capilares sinusoides que convergem para a veia central (Malarkey *et al.* 2005). Os hepatócitos dos peixes apresentam citoplasma compartimentado com organelas agrupadas ao redor do núcleo ou na região periférica da célula. O estado nutricional do indivíduo influencia o aspecto do citoplasma dos hepatócitos, que pode armazenar grande quantidade de glicogênio ou de lipídios (Suzuki *et al.* 1995; Rocha *et al.* 2003). O metabolismo do glicogênio está vinculado às necessidades de carboidratos de todo o organismo. Diante de distúrbios endógenos ou exógenos, as células podem sofrer alterações bioquímicas e morfológicas que provocam lesões hepáticas reversíveis ou irreversíveis (Bogliolo & Brasileiro Filho 2006). Estudos mostram alterações no fígado de peixes causadas por organoclorados e outras substâncias xenobióticas (Fishelson 2006). Em resposta a fatores de estresse ambiental, o fígado apresenta resposta peculiar dependendo do agressor externo, e sua análise histopatológica tem sido considerada uma importante ferramenta para avaliação de impactos ambientais, distúrbios em populações de peixes ou contaminação de cursos d'água (Brusle & Anadon 1996). Injúrias associadas à presença de contaminantes e agentes estressores incluem alterações histológicas e depleção de glicogênio, as quais têm sido utilizadas como biomarcadores em programas de monitoramento ambiental (Bernet *et al.* 1999; Figueiredo-Fernandes *et al.* 2007). Dentre as alterações histológicas comuns pode-se citar algumas reversíveis, como tumefação celular, esteatose, hiperemia e deslocamento do núcleo, e outras irreversíveis, como morte celular por necrose ou apoptose (Bernet *et al.* 1999). Além dessas, alterações moleculares também tem sido detectadas e utilizadas como biomarcadores, tais como aumento da síntese de vitelogenina e proteínas da zona radiata em peixes machos (Prado *et al.* 2011).



## Genética de populações de peixes

Além de alterações morfológicas e fisiológicas em peixes, ações antrópicas, como desmatamento, poluição e pesca predatória, provocam alterações no ecossistema aquático e comprometem a diversidade da ictiofauna. A interrupção da migração de peixes entre os ambientes acima e abaixo de usinas hidrelétricas isola populações, podendo provocar redução do tamanho populacional e alterar a diversidade genética de uma comunidade (Gehrke *et al.* 2002; Gosset *et al.* 2006; Heggenes & Røed 2006; Kitanishi *et al.* 2012).

Diversidade genética corresponde à variedade de alelos e genótipos dentro de uma população (Frankham *et al.* 2002). Entender a distribuição dessa variação dentro e entre populações é importante para estudos e práticas de preservação de recursos genéticos e esclarecimento de relações filogenéticas entre espécies (Spruell *et al.* 2003; Ramella *et al.* 2006). O manejo dos recursos pesqueiros também requer algum conhecimento da estrutura populacional, incluindo a existência de populações geneticamente distintas (Allendorf & Utter 1979; Allendorf *et al.* 1987) e assim, o manejo genético gera subsídios para a exploração econômica, garantindo a produção de alimento (Foresti *et al.* 1992). A avaliação da estrutura genética populacional define o número de populações distintas de uma espécie e a diferença entre elas, sendo importante para conservação e práticas de manejo, já que uma população com baixa diversidade genética tem menos capacidade de se adaptar a alterações no ambiente e são mais vulneráveis à extinção (Frankham *et al.* 2008).

Os peixes podem estar distribuídos em grandes populações panmíticas, nas quais todos os indivíduos são potencialmente parceiros e não há nenhuma limitação genética ou comportamental para o acasalamento, ou constituírem populações genéticas diferenciadas mantidas por fluxo gênico em uma bacia hidrográfica (Revaldaves *et al.* 1997; Wasko & Galetti 2002). Estudos sobre a genética de populações tem revelado que peixes migradores de água doce, sem nenhuma barreira evidente separando estoques, podem apresentar estruturação populacional, com duas ou mais populações genéticas coexistentes em um único sistema hidrográfico (Wirth & Bernatchez 2001; Narum *et al.* 2006).

Diversas técnicas são utilizadas em estudos de genética de populações de peixes, como análise de microssatélites, DNA mitocondrial e RAPD. Microssatélites são repetições de sequências simples de DNA que tipicamente apresentam entre 1 a 6 pares de bases presentes em todos os genomas procarióticos e eucarióticos já estudados (Tautz 1989). Os microssatélites são regiões extremamente polimórficas e com elevada taxa de mutação, que vem sendo analisados em muitos trabalhos desde sua descrição e tem sido úteis na

caracterização de populações de peixes introduzidas e nativas para detecção de estrutura genética populacional, fluxo gênico, efeito gargalo, efeito fundador, população fonte, entre outros já que é capaz de detectar mutações ocorridas em curto espaço de tempo com uma grande sensibilidade (Hatanaka *et al.* 2006; Brown & Stepien 2009; Carvalho *et al.* 2009).

Alguns estudos foram conduzidos em rios com a presença de barragens hidrelétricas para analisar o impacto da construção de usinas sobre a diferenciação genética de peixes e o fluxo genético entre diferentes trechos de rio (Wasko & Galetti 2002; Hatanaka & Galetti Jr. 2003). Estudo conduzido no rio São Francisco com a espécie *Prochilodus marggravii* (Hatanaka & Galetti Jr. 2003) mostraram que peixes coletados na região imediatamente a jusante da hidrelétrica de Três Marias, tinham um maior coeficiente de similaridade genética do que os coletados em trecho localizado após a confluência com o rio Abaeté. Os autores associaram essa distinção às diferentes características ambientais de cada um desses trechos e sugeriram que esses dois grupos formariam duas populações distintas.

Alguns estudos avaliaram a variabilidade genética de *P. lineatus* (Revaldaves *et al.* 1997; Ramella *et al.* 2006), entretanto estes estudos usaram a técnica de RAPD (*random amplification of polymorphic DNA*), pouco recomendada visto que apresenta baixa reprodutibilidade. Garcez *et al.* (2011) também estudaram *P. lineatus* da bacia do rio Grande, por meio de análise de PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorfism*), porém não encontraram estruturação populacional nessa área.

### ***Prochilodus lineatus***

Espécies do gênero *Prochilodus* são conhecidas no Brasil pelos nomes populares de curimatá, curimba, curimatã, curimatã-pacu, curimatã-pioa, papa-terra e corimatá (Fig. 2). *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1847) (Characiformes, Prochilodontidae) é um peixe de médio porte, nativo da América do Sul e comumente encontrado nas bacias dos rios Paraná-Paraguai e Paraíba do Sul (Viveiros & Godinho 2009). *P. lineatus* representa 60% da ictiomassa total do rio Paraná (Parma *et al.* 2007). Trata-se de espécie reofílica e migradora por excelência, sendo capaz de percorrer grandes distâncias rio acima para concluir seu ciclo reprodutivo. As fêmeas apresentam desova total, desenvolvimento ovocitário tipo grupo-sincrônico, fecundação externa, ovos livres e não apresentam comportamento de cuidado parental (Agostinho *et al.* 2003).



**Fig. 2.** Exemplar de curimatá *Prochilodus lineatus* do rio Mogi Guaçu, São Paulo, Brasil. Foto de Violeta Perini.

*P. lineatus* é espécie detritívora com importante função na cadeia trófica, sendo seus ovos, larvas, juvenis e adultos importantes alimentos de muitas espécies de peixes predadores e de numerosas espécies de aves aquáticas. Além disso, o curimatá possui grande importância na região dos rios Grande, Pardo e Mogi Guaçu por sua utilização na pesca comercial e de subsistência. Os habitats naturais do curimatá na bacia do rio Paraná encontram-se atualmente subdivididas por diversas barragens, o que interrompe os ciclos reprodutivos naturais dessa população. Esta espécie tem sido drasticamente afetada pela urbanização, desmatamento da vegetação ciliar, poluição, represamento dos rios e pesca intensiva nas últimas décadas, com diminuição das áreas de desova e rotas migratórias e, em consequência, vem sofrendo redução na sua densidade populacional (Agostinho *et al.* 2007; Viveiros & Godinho 2009).

Adultos de *P. lineatus* geralmente migram rio acima durante a estação reprodutiva (novembro-fevereiro), deixando as áreas de alimentação para locais mais apropriados para a reprodução. Depois da reprodução, migram rio abaixo rumo às áreas de alimentação, onde os cardumes permanecem até a próxima estação reprodutiva (Godoy 1972).

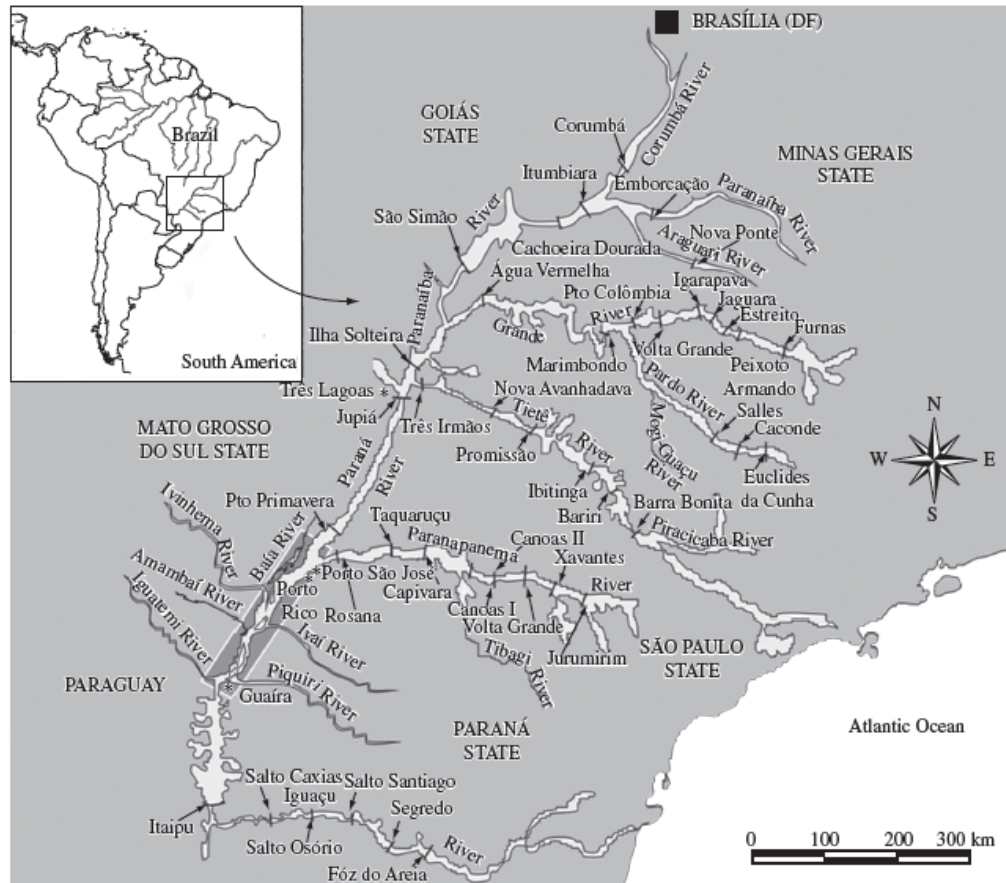
Devido a sua grande importância comercial em toda a bacia do rio Paraná-Paraguai, *P. lineatus* é bastante cultivada em estações de piscicultura para programas de repovoamento ou comercialização de juvenis. Estudos abrangendo dados de desova, desenvolvimento embrionário, reprodução induzida, alimentação e preservação de gametas (Ninhaus-Silveira *et al.* 2006; Furuya *et al.* 2008; Viveiros & Godinho 2009; Zaniboni-Filho *et al.* 2009; Romagosa *et al.* 2010) trouxeram diversas informações importantes acerca de sua biologia

reprodutiva, todavia a maioria deles é conduzida em cativeiro e poucos enfocam a reprodução dessa espécie em seu habitat natural.

### **Região de estudo**

A bacia do alto Paraná abriga 310 espécies de peixes, contribuindo com cerca de 8% do número de espécies estimada para a região neotropical (Agostinho *et al.* 2008). É constituída de uma área de drenagem de 891.000 km<sup>2</sup>, ou 10,5% da área total do Brasil, seu clima é tropical/sub-tropical, com uma temperatura média anual de 15°C e mais de 150 cm de precipitação anual. Os grandes centros urbanos e industriais da América do Sul tem severos impactos na quantidade e qualidade da água que retorna para o rio. Além da crescente demanda de água para consumo, agricultura e pecuária (principalmente pelo manejo incorreto do uso do solo) o intenso uso de agrotóxicos e a eliminação da mata ciliar tem degradado a qualidade da água dos principais tributários da bacia do alto Paraná (Agostinho *et al.* 1994; Agostinho *et al.* 2008). Mais de 145 grandes barragens estão construídas na bacia do Alto Paraná e elas inundam uma área de 16.700 km<sup>2</sup>, que fornece cerca de 70% da eletricidade consumida no Brasil. A maioria dos grandes tributários (Paranaíba, Grande, Tietê, Paranapanema) e o principal canal do rio Paraná foram transformados numa cascata de reservatórios (Agostinho *et al.* 2007; Agostinho *et al.* 2008) (Fig. 3).

O rio Grande possui cerca de 145.000 km<sup>2</sup> de área de drenagem e, em conjunto com seus afluentes, forma uma sub-bacia (CEMIG 2012). Ele é reconhecido nacionalmente pela geração de 7.640 MW, cerca de 13% do total da bacia do rio Paraná, que tem uma capacidade instalada de geração de energia de 38.660 MW, equivalendo a quase 64% do total do país. O rio Grande nasce na Serra da Mantiqueira, próximo ao município de Bocaina de Minas, estado de Minas Gerais, cerca de 1.900m acima do nível do mar. O rio encontra-se na divisa entre os estados de Minas Gerais e São Paulo, e possui o mais longo percurso dentro do estado mineiro.



**Fig. 3.** Principais reservatórios brasileiros da bacia do rio Paraná. Retirado de Agostinho et al. (2008).

O rio Grande possui grande número de espécies nativas e algumas exóticas, como a carpa *Cyprinus carpio* e a tilápia *Oreochromis niloticus* (Vaz 2000). Dentre as espécies nativas destacam-se espécies de importância comercial como os da ordem Characiformes curimatá *P. lineatus*, pacu *Piaractus mesopotamicus* e piracanjuba *Brycon orbignyanus*. Estas espécies são reofílicas e dependem da dinâmica da correnteza fluvial e de fatores ambientais para a maturação e a liberação de seus gametas (Godoy 1975; Baldissertotto 2002; Oyakama *et al.* 2006). Em sua extensão está implantada a maioria das hidrelétricas do estado de Minas Gerais, totalizando 5.344 km<sup>2</sup> de área inundada, sendo elas: Camargos, Funil, Itutinga, Furnas, Peixoto, Estreito, Jaguará, Igarapava, Volta Grande, Porto Colômbia, Marimbondo e Água Vermelha. Localizada entre os municípios de Planura (MG) e Colômbia (SP) a Usina de Porto Colômbia teve suas atividades iniciadas em junho de 1973 e está a cerca de 100 km de distância do reservatório seguinte, a represa Marimbondo. Usinas hidrelétricas de baixa queda são raras no Brasil, sendo Porto Colômbia a única no sistema

Furnas. Seu reservatório ocupa uma área de 143 km<sup>2</sup>, com volume total de 1525 bilhões de m<sup>3</sup> de água e nível de armazenamento máximo de 467,2 m (FURNAS 2011).

O rio Grande tem como principal tributário o rio Pardo, com 529 km de comprimento e uma profundidade média de 120 cm (Godoy 1972). Este, por sua vez, tem como afluente o rio Mogi Guaçu, com 473 km de comprimento e uma profundidade média de 60 cm (Godoy 1972). A temperatura no rio Mogi Guaçu varia entre 12°C no inverno e 28°C no verão. Os rios Pardo (porção baixa) e Grande (porção média) são em média 5°C mais quentes do que o rio Mogi Guaçu durante todo o ano (Godoy 1972). Apesar do grande número de reservatórios que fragmentam os rios da região, o rio Grande (entre as usinas de Porto Colômbia e Marimbondo), o rio Pardo (entre os rios Grande e Mogi Guaçu) e o rio Mogi Guaçu formam um ecossistema lótico, livre da presença de usinas hidrelétricas.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Avaliar a influência de afluentes e da Usina Hidrelétrica de Porto Colômbia sobre a morfofisiologia e estrutura populacional de *Prochilodus lineatus* na bacia do rio Grande.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Investigar a presença de alterações morfológicas e fisiológicas no sistema reprodutor de peixes coletados a jusante da UHE-PC;
- Avaliar alterações histopatológicas do tecido hepático;
- Avaliar a influência da UHE-PC na estruturação populacional de *P. lineatus*;
- Testar a hipótese de existência de uma população residente de *P. lineatus* a jusante da UHE-PC;
- Investigar a existência de uma dinâmica populacional fonte-sumidouro entre os rios da área de estudo.

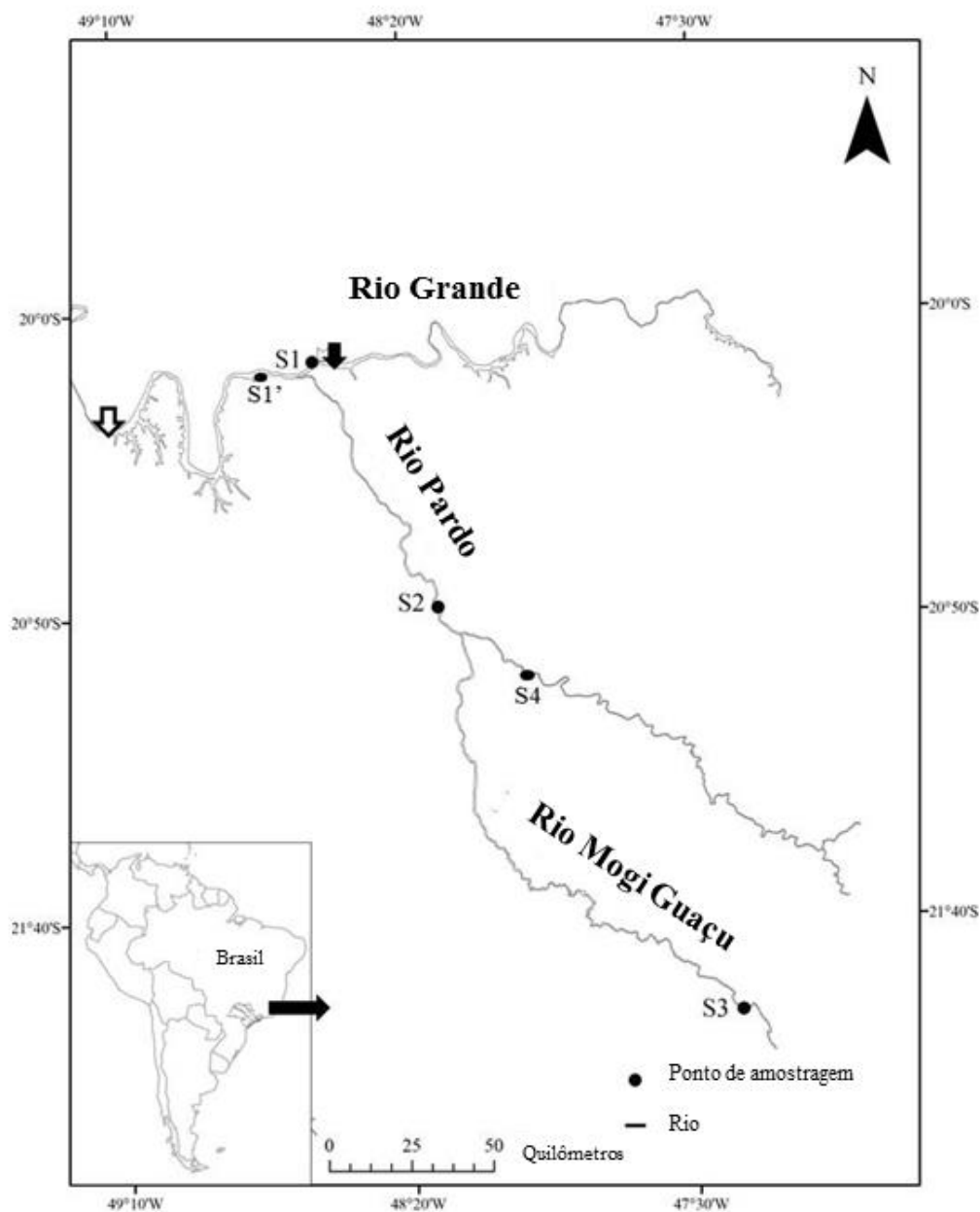
### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### Amostragem de peixes e índices biológicos

Para esse estudo, 544 fêmeas e 571 machos de *P. lineatus* (0,10-5,07 kg e 20-67 cm de comprimento total) foram coletados de março de 2010 a fevereiro de 2011 nos seguintes pontos de coleta: (S1) localizado no rio Grande imediatamente a jusante da represa de Porto Colômbia (20°08'04" S e 48°35'35" O); (S1') no rio Grande imediatamente a jusante da confluência com o rio Pardo (20°09'47" S e 48°39'30" O); (S2), localizado no rio Pardo a 110 km de S1 (20°48'43" S e 48°14'32" O); (S3), localizado no rio Mogi Guaçu, na região de Cachoeira de Emas, a cerca de 200 km de S2 (21°55'34" S e 47°22'03" O) e (S4) no rio Pardo a montante da confluência com o rio Mogi Guaçu (20°53'27" S e 48°08'20" O) (Figura 4). Embora esses rios possuam usinas hidrelétricas construídas, não há nenhuma localizada na área de estudo, que se trata de um remanescente lótico. Para estudo da biologia reprodutiva e análise histopatológica, foram considerados os exemplares dos pontos S1, S2 e S3. Para estudo de genética de populações considerou-se 30 exemplares dos cinco pontos de amostragem coletados durante a estação reprodutiva.

Durante as amostragens, temperatura, concentração de oxigênio dissolvido, pH e condutividade elétrica da água foram avaliados utilizando uma sonda Horiba (modelo 6600, YSI, EUA). A transparência da água foi medida por disco de Secchi. Os peixes foram mortos por secção transversal da medula, seguindo os princípios éticos estabelecidos pelo Guia de Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, <http://www.cobea.org.br>). Para cada amostra, os seguintes dados biométricos foram obtidos: comprimento total (TL), massa corporal (BM), massa das gônadas (GM), massa do fígado (LM) além disso, calculou-se o fator de condição de Fulton ( $K = 100 \times BM / TL^3$ ), o índice gonadossomático ( $GSI = 100 \times GM / BM$ ) e o índice hepatossomático ( $HSI = GSI = 100 \times LM / BM$ ). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil (protocolo 092/10).





**Fig. 4.** Localização dos pontos de amostragem de *P. lineatus* na bacia do rio Grande, Brasil. (S1) rio Grande imediatamente a jusante da barragem de Porto Colômbia; (S1') rio Grande a jusante da confluência com o rio Pardo; (S2) rio Pardo a jusante da confluência com o rio Mogi Guaçu; (S3) Mogi Guaçu, na região de Cachoeira de Emas; (S4) rio Pardo a montante da confluência com o rio Mogi Guaçu. Seta preta = Usina de Porto Colômbia; seta branca = Usina de Marimbondo.

### **Níveis de esteroides sexuais**

Amostras de 1,0 a 5,0 ml de sangue foram puncionadas com seringas não heparinizadas a partir da veia caudal de 62 fêmeas e 64 machos, todos espécimes vivos, e centrifugadas à temperatura ambiente durante 30 min a 755 G. As amostras de soro sanguíneo foram armazenadas a -20°C até a determinação dos níveis séricos de esteroides sexuais. Cinco a sete espécimes de cada ponto e estágio de maturação gonadal foram analisados. As concentrações séricas de T foram determinadas por quimioluminescência utilizando-se o kit ADVIA Centaur testosterona da Bayer Corporation (Nova Iorque, EUA). Os níveis de 17β-E foram determinados por imunofluorimetria usando-se o teste estradiol Auto-DELFI A da Perkin Elmer (Massachusetts, EUA). Concentrações de 17α-OHP foram determinados por radioimunoensaio em fase sólida, utilizando-se o kit Coat-a-Count 17α-OH progesterone da DPC *Diagnostic Products Corporation* (Califórnia, EUA). A sensibilidade dos ensaios foi de 5 pg / ml e os coeficientes de variação inter e intra-ensaios variou de 5 a 10%. A reatividade cruzada dos ensaios foi inferior a 6% (T e outros andrógenos), 4% (7β-E e outros estrógenos) e 1% (17 α-OHP e 17α-dihidroxi-20β-4-pregnen-3-ona, DHP).

### **Maturação gonadal, diâmetro ovocitário, fecundidade e atresia folicular**

Para determinar os estádios de maturação gonadal, fragmentos de gônadas foram fixados em líquido de Bouin por 8-12 h, embebidos em parafina, seccionados a 5 μm de espessura, corados com hematoxilina-eosina e observados em microscópio de luz. Os estádios de maturação gonadal e tipo de desova foram determinados com base nas características macro e microscópicas das gônadas em associação às variações do GSI (Arantes *et al.* 2010; Martins *et al.* 2012). A frequência dos estádios de maturação foi avaliada por bimestre em cada ponto de coleta.

O diâmetro dos folículos vitelogênicos (média ± DP) foi determinado em cortes histológicos, utilizando ocular micrométrica acoplada a microscópio de luz, sendo medidos pelo menos 100 folículos de cerca de 10 fêmeas de cada ponto de coleta. Para determinar a fecundidade, amostras (~1 g) da região medial de ovários em maturação avançada de 7 a 10 fêmeas de cada ponto de coleta foram mantidas em solução de Gilson modificada (100 ml de álcool etílico 60%, 880 ml de água destilada, 15 ml de ácido nítrico 80%, 18 ml de ácido acético glacial e 20 g de cloreto de mercúrio) até que os ovócitos fossem completamente dissociados. Fecundidade absoluta (AF) e fecundidade relativa (RF) foram calculadas pelas fórmulas:  $AF = NO \times GM/SM$  e  $RF = AF/BM$ , na qual, NO é o número de ovócitos

vitelogênicos na amostra; GM é a massa do ovário; SM é a massa da amostra; e BM é a massa corporal. O índice de atresia folicular foi determinado pela proporção de folículos vitelogênicos atrésicos em relação ao número total de folículos vitelogênicos de cada secção histológica.

### **Histopatologia hepática**

Fragmentos de fígado (32 a 53 exemplares de cada ponto de coleta) foram fixados em líquido de Bouin por 8-12 h, embebidos em parafina, seccionados a 5 µm, corados com hematoxilina-eosina e examinados em microscópio de luz. As alterações histopatológicas foram avaliadas semi-quantitativamente seguindo a metodologia proposta por Bernet et al (1999). Seis alterações patológicas foram analisadas: hiperemia, necrose, alteração nuclear, vacuolização citoplasmática, infiltrado inflamatório e granulações citoplasmáticas. Os danos hepáticos foram medidos de acordo com o índice de lesão hepática (IL), considerando o grau de importância (w) e a ocorrência ou score (a). As alterações foram classificadas em quatro scores: inalterada (a = 0), ocorrência leve (a = 2); ocorrência moderada (a = 4) e ocorrência grave (a = 6) e em três graus de importância patológica: mínima, facilmente reversível (w = 1); moderada, reversível na maioria dos casos se o agente estressor for neutralizado (w = 2); e acentuada, geralmente irreversível levando a perda de função total ou parcial do órgão (w = 3). Hiperemia, vacuolização do citoplasma e grânulos citoplasmáticos foram classificadas como lesões de importância mínima, deslocamento do núcleo e infiltrado inflamatório como lesões de importância moderada e necrose como lesão de importância acentuada. Os índices de lesão tecidual foram obtidos pela aplicação de uma equação matemática:  $IL = \sum_{alt} (a \times w)$ , em que **alt** representa cada uma das seis alterações avaliadas.

### **TUNEL *in situ***

Para análise da ocorrência de apoptose nas células hepáticas, amostras de fígado de seis espécimes de cada ponto de coleta foram fixadas em solução de paraformaldeído a 4% em PBS 0,1 M pH 7,3 durante 24 horas, embebidas em parafina, seccionadas a 5 µm e submetidas a reação de TUNEL (do inglês, *Terminal transferase-mediated dUTP nick end labeling*) utilizando o kit comercial ApopTag Plus Peroxidase *In Situ* da Millipore (Massachusetts, EUA) e seguindo o protocolo do fabricante. As lâminas foram lavadas em PBS e tratadas com uma solução (5 µl / ml) de proteinase K em tampão Tris 1M pH 8,0 durante 15 min, à temperatura ambiente, e com peróxido de hidrogênio 3% em PBS para

inativar a peroxidase endógena. As lâminas foram então incubadas com a mistura da enzima terminal desoxinucleotidil-transferase (TdT) e deoxinucleotídeos conjugados com biotina durante 1h 30 min a 37°C, seguido por estreptavidina conjugada com peroxidase durante 45 min em câmara úmida à temperatura ambiente. Finalmente, a reação foi revelada com diaminobenzidina (DAB) durante 3 min e contra-corada com hematoxilina. Para controle negativo, foi omitido o tratamento com TdT. Células TUNEL-positivas foram quantificadas utilizando-se microscópio de luz com ocular de 100X equipada com graticula de 100 mm<sup>2</sup> e os resultados foram apresentados em número de células marcadas/área.

### **Extração de DNA e análise de microssatélites**

Para análise da estrutura populacional e variabilidade genética de *P. lineatus* na região de estudo, amostras da nadadeira adiposa de cada espécime foram preservadas em etanol 95%. O DNA genômico foi extraído usando-se protocolo baseado em solução salina de acordo com Aljanabi & Martinez (1997). Cinco locus microssatélites espécie-específicos para *P. lineatus* (Yazbeck & Kalapothakis 2007) e cinco locus heterólogos para o gênero *Prochilodus* (Barbosa *et al.* 2008) foram selecionados (Tabela 1) e o programa MULTIPLEX MANAGER (Holleley & Geerts 2009) foi usado para agrupá-los em três multiplex. Reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada em três corridas separadas, para cada multiplex, de acordo com Beheregaray *et al.* (2004) e Carvalho *et al.* (2009), utilizando-se *primers* específicos para cada locus (Applied Biosystems, EUA). Formamida e *size standard* LIZ (Applied Biosystems) foram combinados com o produto amplificado e submetidos à análise de microssatélites utilizando-se um sequenciador automático da Applied Biosystems ABI 3130. Os perfis dos microssatélites foram analisados manualmente utilizando-se o programa GENEMAPPER 4.0 (Applied Biosystems).

**Tabela 1.** Loci dos dez microssatélites de *Prochilodus lineatus* e *Prochilodus argenteus* utilizados no estudo e agrupados em três plex.

Plex / Locus	Sequência (5' → 3')	Amplitude (pb)
Plex 1		
Par 86 <sup>a</sup>	F: ATCCGCTCTATGTGTGTC <sup>VIC</sup> R: TCTACAGTACTTGGAGGAC	91-137
Pli 61 <sup>b</sup>	F: ACCAAGGTGGGATTCTTGGTC <sup>6-FAM</sup> R: TTCTCCATCTCTGGCTGCGCA	208-218
Pli 30 <sup>b</sup>	F: GATGTCGGTTCTTGTACAGTGGTG <sup>NED</sup> R: AGCTGCTGAGGATTCTGGGTCAC	194-366
Pli 43 <sup>b</sup>	F: AGTCCACTCCTTAGGCGAGTGAG <sup>PET</sup> R: ATAGACGGGCATGTGTCACAGCT	190-246
Plex 2		
Par 83 <sup>a</sup>	F: CATTTTCTAACAGCACTCC <sup>NED</sup> R: TTCTTGTTCTCCTGTGTAAC	228-292
Par 85 <sup>a</sup>	F: CCACTTAATGAGACCACAC <sup>PET</sup> R: TTTCATTAGACTCGGTGAG	195-261
Pli 60 <sup>b</sup>	F: GCTAGGACGGTTAGCGTCCACTG <sup>VIC</sup> R: CGACACGTACATCATTACCTCGG	174-226
Pli 34 <sup>b</sup>	F: TGTTGGATGTAAAAAGTGC <sup>6-FAM</sup> R: GCTCGCTGGCATGTAAAGATCC	180-212
Plex 3		
Par 80 <sup>a</sup>	F: CTAACCTACAAACCTCATT <sup>VIC</sup> R: CTGTAAAAGCTCCACTTATC	193-267
Par 66 <sup>a</sup>	F: TCTATAACTGTGGTTCGTATG <sup>NED</sup> R: GAGGTTTTGAGATCAGTTG	133-165

<sup>a</sup> Barbosa et al., 2008; <sup>b</sup> Yazbeck & Kalapotakis, 2007. Fluorescências: NED = amarelo, PET = vermelho, 6-FAM = azul, VIC = verde.

## Diversidade Genética

O programa MICROCHECKER (Van Oosterhout *et al.* 2004) foi utilizado para detectar a presença de alelos nulos e possíveis erros de leitura. GENEPOP v4 (Rousset 2008) foi utilizado para estimar desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) pelo método de Markov, para obter o coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) e para estimar desvios do equilíbrio de ligação genotípica (LE) em toda a população. Estimativas do HWE e LE foram realizadas seguidas por correções de Bonferroni (Rice 1989). GENALEX 6.5 (Peakall & Smouse 2012) foi usado para estimar os parâmetros genéticos das populações, tais como: heterozigosidade esperada e observada ( $H_e$ ,  $H_o$ ), número de alelos em cada população ( $N_a$ ), número de alelos efetivos ( $N_e$ ) e número de alelos privados.

### **Estrutura genética espacial**

Para investigar a ocorrência de estruturação genética em *P. lineatus* na área de estudo, índices de diferenciação genética  $F_{ST}$  e  $D_{EST}$  (Jost 2008) foram calculados utilizando-se GENALEX 6.5. Para testar se os valores  $F_{ST}$  e  $D_{EST}$  tinham correlação com a distância geográfica entre os cinco pontos de coleta, o teste de Mantel (Mantel 1967) foi realizado com uso do GENALEX 6.5. As distâncias geográficas entre as localidades foram obtidas no GOOGLE EARTH. Análise Bayesiana de agrupamento foi utilizada para avaliar a existência de estrutura populacional utilizando-se o programa STRUCTURE 2.2 (Pritchard *et al.* 2000). O número de agrupamentos ( $\Delta K$ ) foi estimado utilizando-se o modelo "*admixture*" com alelos correlacionados, permitindo máxima resolução populacional, com  $\Delta K$  variando de 1 a 10. Cinco corridas independentes de 10 mil gerações de cadeias de Monte Carlo de Markov (MCMC) e 1000 gerações de "*burn-in*" foram usadas para cada valor de  $\Delta K$ . O número de agrupamentos foi estimado utilizando a fórmula  $\Delta K = \text{média} (|L'(\Delta K)|) / dp (L(\Delta K))$  implementado no programa HAVESTER (Earl & vonHoldt 2012). Após avaliar a presença de estrutura populacional, cada espécime foi designada a um dos três agrupamentos (nomeados Cluster A, Cluster B e Cluster C) usando o programa GENECLASS 2.0 (Piry *et al.* 2004).

### **Fluxo gênico**

Para estimar a taxa de migração (M) entre cada ponto amostral utilizou-se o programa MIGRATE 3.5.1 (Beerli & Felsenstein 2001), utilizando o método de máxima verossimilhança com abordagem coalescente (Beerli & Felsenstein 1999) e as configurações padrão do programa (dez cadeias curtas de Markov com 10 000 *trees*, três cadeias longas de Markov com 100 000 *trees* e *burn-in* de 10 000 *trees*). As análises foram conduzidas seguindo o modelo *Brownian* como uma aproximação ao modelo de mutação *stepwise*. Todas as corridas foram repetidas cinco vezes e os dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão das cinco corridas repetidas.

### **Análise Estatística**

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa GRAPHPAD INSTAT 3 (versão 3.00, GRAPHPAD INSTAT, Inc, San Diego, Califórnia, EUA). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP) ou erro padrão (EP) e foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ . As comparações dos índices biológicos, diâmetro ovocitário, fecundidade e atresia folicular foram realizadas utilizando-se o teste não paramétrico de

Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. A comparação dos parâmetros físico-químicos da água e dos níveis hormonais foi realizada utilizando-se ANOVA com pós-teste de Tukey. Correlações entre as fecundidades e BM foram obtidas por teste de correlação de Pearson. A correlação entre as variáveis genéticas (coeficiente de endogamia e heterozigosidade) *versus* variáveis ambientais (temperatura, pH, condutividade elétrica, transparência e concentração de oxigênio) e os dados bióticos dos peixes (IGS, K, TL, BM) foi realizada utilizando-se teste de correlação de Pearson.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. BIOLOGIA REPRODUTIVA DE *P. LINEATUS*

(Resultados publicados no artigo 1, apêndice 1):

Peixes do ponto S1 apresentaram TL e BM significativamente maiores ( $p < 0,001$ ) do que peixes dos pontos S2 e S3 (Tabela 2). Os valores de K foram significativamente maiores nos pontos S1 e S2 para as fêmeas e em S3 para machos.

#### GSI e parâmetros físico-químicos da água

O GSI de fêmeas e machos foi significativamente menor em S1 ( $2,80 \pm 1,90$  para fêmeas e  $0,22 \pm 0,13$  para machos) e maior em S3 ( $10,01 \pm 4,57$  para fêmeas e  $0,63 \pm 0,32$  para machos) (Tabela 2). Nos pontos S2 e S3, o GSI acompanhou as flutuações dos parâmetros físico-químicos da água durante os períodos de amostragem: aumentou em setembro-outubro, mostrou um pico em novembro e dezembro, coincidindo com o aumento da temperatura e redução da condutividade e transparência da água, e, em seguida, voltou a cair em janeiro-fevereiro (Fig. 5). Durante o período reprodutivo (setembro a fevereiro), nenhuma diferença significativa foi obtida para as medidas de pH entre os pontos (Tabela 3). Nesse mesmo período, condutividade elétrica significativamente menor ( $40,20 \pm 1,52 \mu\text{S/cm}$ ) e maiores temperatura ( $27,30 \pm 1,20 \text{ }^\circ\text{C}$ ) e transparência ( $2,46 \pm 0,05 \text{ m}$ ) foram detectadas em S1, enquanto que a menor concentração de oxigênio dissolvido ( $5,30 \pm 1,40 \text{ mg/L}$ ) foi observada em S2.

#### Estádios de maturação gonadal

De acordo com as características morfológicas das células germinativas, foram estabelecidos quatro estádios de maturação gonadal para fêmeas e machos: (1) repouso, (2) maturação, (3) desova e (4) regressão (Fig. 6). A distribuição de frequência dos estádios (%) no ponto S1, logo abaixo da barragem, mostrou predomínio de fêmeas em repouso (estádio 1) durante todo o ano, o que representou 76% do total de amostragem (Fig. 7A). No ponto S1, fêmeas em maturação (estádio 2) foram registradas (5%) de setembro a fevereiro, nenhuma fêmea desovada (estádio 3) foi coletada e fêmeas em regressão (estádio 4) representaram 19% do total da amostra, ocorrendo de novembro a abril (Fig. 7A). No ponto S2, rio Pardo, foi observada uma maior frequência de fêmeas em maturação durante novembro-dezembro



(45%), fêmeas desovadas não foram registradas e fêmeas em regressão ocorreram em proporção menor (10%) do que em S1 (Fig. 7A). Em S3, rio Mogi Guaçu, as fêmeas em maturação foram predominantes em setembro-outubro (60%) e novembro-dezembro (41%). Fêmeas desovadas ocorreram apenas no S3 durante novembro-dezembro (15%) e janeiro-fevereiro (8%) e uma baixa frequência de fêmeas de regressão (1%) também foi detectada (Fig. 7A) nesse ponto.

Em relação aos machos, altas proporções de machos em maturação (estádio 2) foram registrados no ponto S3 em setembro-outubro (86%) e novembro-dezembro (73%). Durante esses períodos, as proporções de machos em maturação foram menores em S1 (24% e 43%, respectivamente) e em S2 (33% e 80%). Machos no estágio 3 (desova) ocorreram nos três locais estudados e machos em estágio 4 (regressão) foram menos frequentes no ponto S3 (Fig. 7B). Machos em repouso foram coletados durante todo o período de amostragem, sendo mais frequentes de março a agosto e no ponto S1.

### **Diâmetro ovocitário, fecundidade e atresia folicular**

O diâmetro dos folículos vitelogênicos variou de 443,90 a 984,30  $\mu\text{m}$ , sendo significativamente menor em fêmeas do ponto S1 ( $657,95 \pm 70,20 \mu\text{m}$ ) do que em fêmeas dos pontos S2 e S3 ( $692,89 \pm 56,17$  e  $722,77 \pm 125,16 \mu\text{m}$ , respectivamente) ( $p < 0,05$ ) (Tabela 2). A fecundidade absoluta (AF) variou de 27,55 a 440,47 sendo significativamente maior no ponto S2 e a fecundidade relativa à massa corporal foram menores em S1 ( $p < 0,001$ ). Alta correlação foi obtida entre AF e BM nos pontos S1 ( $R^2 = 0,92$ ), S2 ( $R^2 = 0,73$ ) e S3 ( $R^2 = 0,92$ ) ( $p < 0,05$ ). A atresia folicular foi significativamente maior nos peixes do ponto S1 (~20%), quando comparado aos peixes dos pontos S2 (~6%) e S3 (~7%) ( $p < 0,05$ ).

### **Concentrações de esteroides sexuais**

Em fêmeas do ponto S1, as concentrações séricas de  $17\beta$ -estradiol ( $17\beta$ -E) mostraram um aumento significativo no estágio 2 em comparação ao estágio 1 (Fig. 8A). Além disso, nesse ponto, as concentrações de testosterona (T) e de  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona ( $17\alpha$ -OHP) não flutuaram com os dos estádios de maturação. Fêmeas dos pontos S2 e S3 apresentaram variações acentuadas das concentrações de T e  $17\beta$ -E: aumento no estágio 2, diminuição no estágio 3 (apenas em S3), e retorno às condições basais no estágio 4. No ponto S3, os níveis  $17\alpha$ -OHP aumentaram no estágio 2 (exceto S3), permanecendo elevado no estágio 3 e

retornando às condições basais no estágio 4 (Fig. 8A). Nos pontos S1 e S2, não foram capturadas fêmeas no estágio 3 (desova).

Machos dos pontos S2 e S3 mostraram valores significativamente mais elevados de T no estágio 2, apresentando um decréscimo no estágio 3 (em S3) e retornando às condições basais no estágio 4. Em comparação às fêmeas, os níveis de  $17\beta$ -E dos machos foram muito baixos em todas os estágios e pontos, com valores significativamente mais elevados apenas nos estágios 3 e 4 dos peixes do rio Pardo (S2). Machos coletados no rio Mogi Guaçu (S3) apresentaram valores mais elevados de  $17\alpha$ -OHP no estágio 3 (Fig. 8B). Comparando-se os pontos, valores significativamente menores de  $17\alpha$ -OHP foram detectados no rio Grande (S1).

**Tabela 2.** Variáveis biológicas de fêmeas e machos de *Prochilodus lineatus* em três pontos de coleta na bacia do rio Grande, de março de 2010 a fevereiro de 2011. (S1) rio Grande imediatamente a jusante da barragem de Porto Colômbia; (S2) rio Pardo a jusante da confluência com o rio Mogi Guaçu; (S3) rio Mogi Guaçu, na região da Cachoeira de Emas.

	S1 - rio Grande		S2 – rio Pardo		S3 – rio Mogi Guaçu	
	Média ± DP	Amplitude	Média ± DP	Amplitude	Média ± DP	Amplitude
Fêmeas (n = 544)						
TL (cm)	38,23 ± 9,92 <sup>a</sup>	20,00-67,0	35,41 ± 7,22 <sup>b</sup>	23,80-54,00	34,23 ± 4,04 <sup>b</sup>	26,00-53,00
BM (kg)	1,11 ± 0,80 <sup>a</sup>	0,11-5,07	0,88 ± 0,64 <sup>b</sup>	0,19-3,19	0,61 ± 0,25 <sup>c</sup>	0,12-2,28
GSI (%)	2,80 ± 1,90 <sup>a</sup>	0,20-4,7	7,55 ± 2,24 <sup>b</sup>	5,39-10,73	10,01 ± 4,57 <sup>b</sup>	5,34-19,27
K	2,89 ± 0,41 <sup>a</sup>	1,04-5,36	2,94 ± 0,42 <sup>a</sup>	2,20-4,01	2,65 ± 0,41 <sup>b</sup>	1,32-3,70
OD (µm)	657,95 ± 70,20 <sup>a</sup>	443,90-791,3	692,89 ± 56,17 <sup>b</sup>	540,40-810,6	722,77 ± 125,16 <sup>b</sup>	530,70-984,30
FA (%)	20,81 ± 13,85 <sup>a</sup>	8,77-40,54	5,84 ± 3,12 <sup>b</sup>	3,64-11,88	6,98 ± 1,88 <sup>c</sup>	5,08-9,52
AF (10 <sup>3</sup> )	70,46 ± 36,56 <sup>a</sup>	27,55-104,53	289,76 ± 86,53 <sup>b</sup>	201,92-440,47	117,09 ± 4,15 <sup>ab</sup>	114,07-121,83
RF	34,12 ± 23,61 <sup>a</sup>	13,44-57,50	130,71 ± 43,23 <sup>b</sup>	82,16-195,16	151,27 ± 31,76 <sup>b</sup>	121,35-184,59
Machos (n = 571)						
TL (cm)	36,86 ± 9,52 <sup>a</sup>	19,00-62,00	33,28 ± 6,61 <sup>b</sup>	22,20-53,00	34,16 ± 4,21 <sup>b</sup>	26,50-50,00
BM (kg)	0,98 ± 0,66 <sup>a</sup>	0,10-3,48	0,71 ± 0,51 <sup>b</sup>	0,13-2,87	0,60 ± 0,26 <sup>b</sup>	0,18-1,90
GSI (%)	0,22 ± 0,13 <sup>a</sup>	0,10-0,56	0,59 ± 0,33 <sup>b</sup>	0,22-1,37	0,63 ± 0,32 <sup>b</sup>	0,11-1,46
K	2,94 ± 0,42 <sup>a</sup>	1,44-4,74	2,90 ± 0,37 <sup>a</sup>	1,90-4,11	3,39 ± 0,62 <sup>b</sup>	1,96-5,59

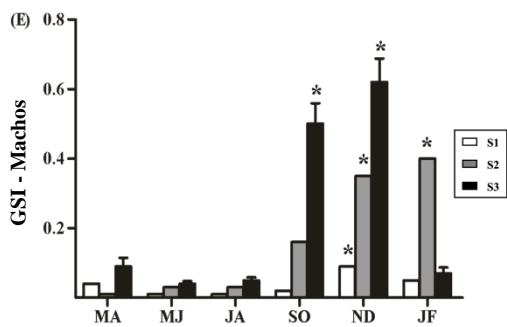
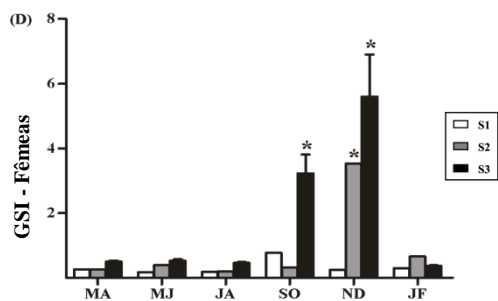
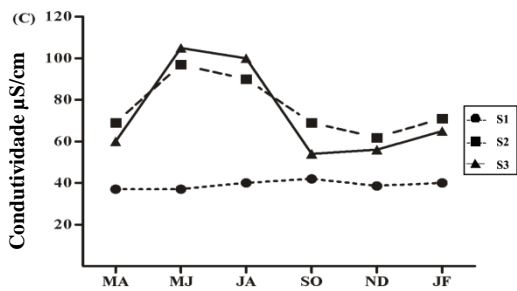
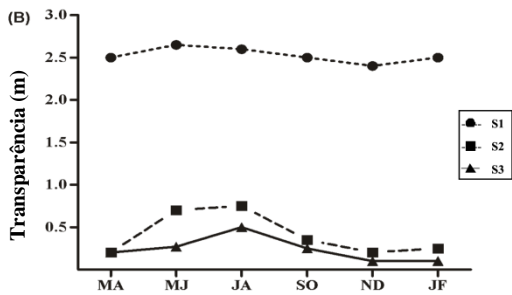
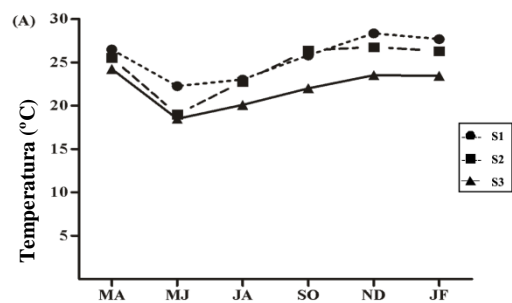
Comprimento total (TL), massa corporal (BM), índice gonadossomático dos peixes em maturação (GSI), fator de condição de Fulton (K), diâmetro ovocitário (OD), índice de atresia folicular (FA), fecundidade absoluta (AF), fecundidade relativa à massa corporal (RF). Valores representados em média ± DP. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os pontos de coleta ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 3.** Parâmetros físico-químicos da água durante a estação reprodutiva de *Prochilodus lineatus* (setembro de 2010 a fevereiro de 2011) em três pontos de coleta: (S1) rio Grande imediatamente a jusante da barragem de Porto Colômbia; (S2) rio Pardo a jusante da confluência com o rio Mogi Guaçu; (S3) rio Mogi Guaçu, na região da Cachoeira de Emas.

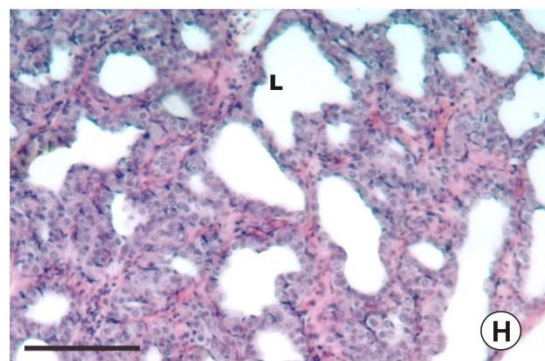
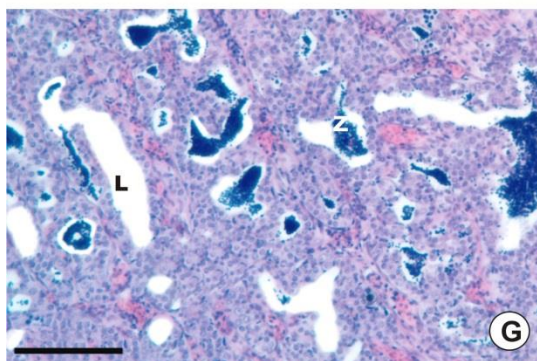
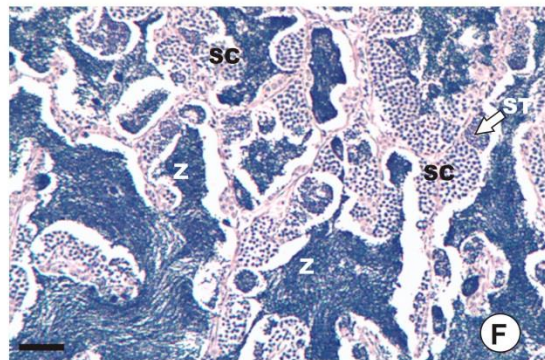
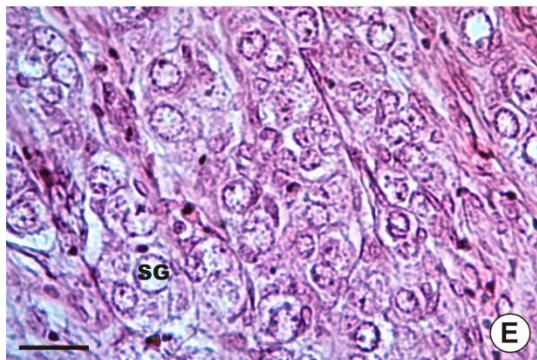
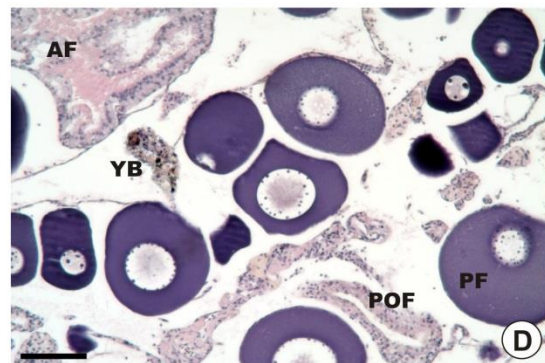
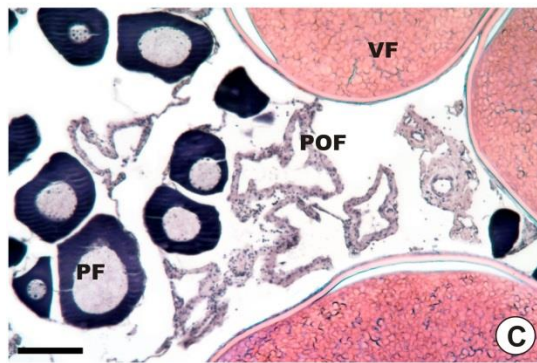
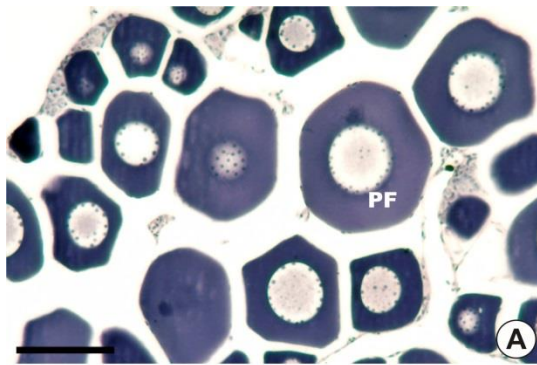
	S1 - rio Grande		S2 – rio Pardo		S3 – rio Mogi Guaçu	
	Média ± DP	Amplitude	Média ± DP	Amplitude	Média ± DP	Amplitude
Temperatura (°C)	27,30 ± 1,20 <sup>a</sup>	25,80-28,30	26,50 ± 0,22 <sup>a</sup>	26,30-26,80	23,00 ± 0,77 <sup>b</sup>	22,00-23,50
Oxigênio (mg/L)	7,30 ± 0,90 <sup>a</sup>	6,30-8,40	5,30 ± 1,40 <sup>b</sup>	3,70-6,80	7,50 ± 0,80 <sup>a</sup>	6,50-8,30
pH	7,41 ± 0,80 <sup>a</sup>	6,80-8,50	7,60 ± 0,60 <sup>a</sup>	6,80-8,10	7,20 ± 0,10 <sup>a</sup>	7,00-7,30
Condutividade (µS/cm)	40,20 ± 1,52 <sup>a</sup>	38,60-42,00	67,30 ± 4,30 <sup>b</sup>	61,80-71,00	58,30 ± 5,24 <sup>c</sup>	54,00-65,00
Transparência (m)	2,46 ± 0,05 <sup>a</sup>	2,40-2,50	0,26 ± 0,07 <sup>b</sup>	0,20-0,30	0,15 ± 0,07 <sup>b</sup>	0,10-0,20

Valores representados em média ± DP. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os pontos de coleta ( $p < 0,05$ ).

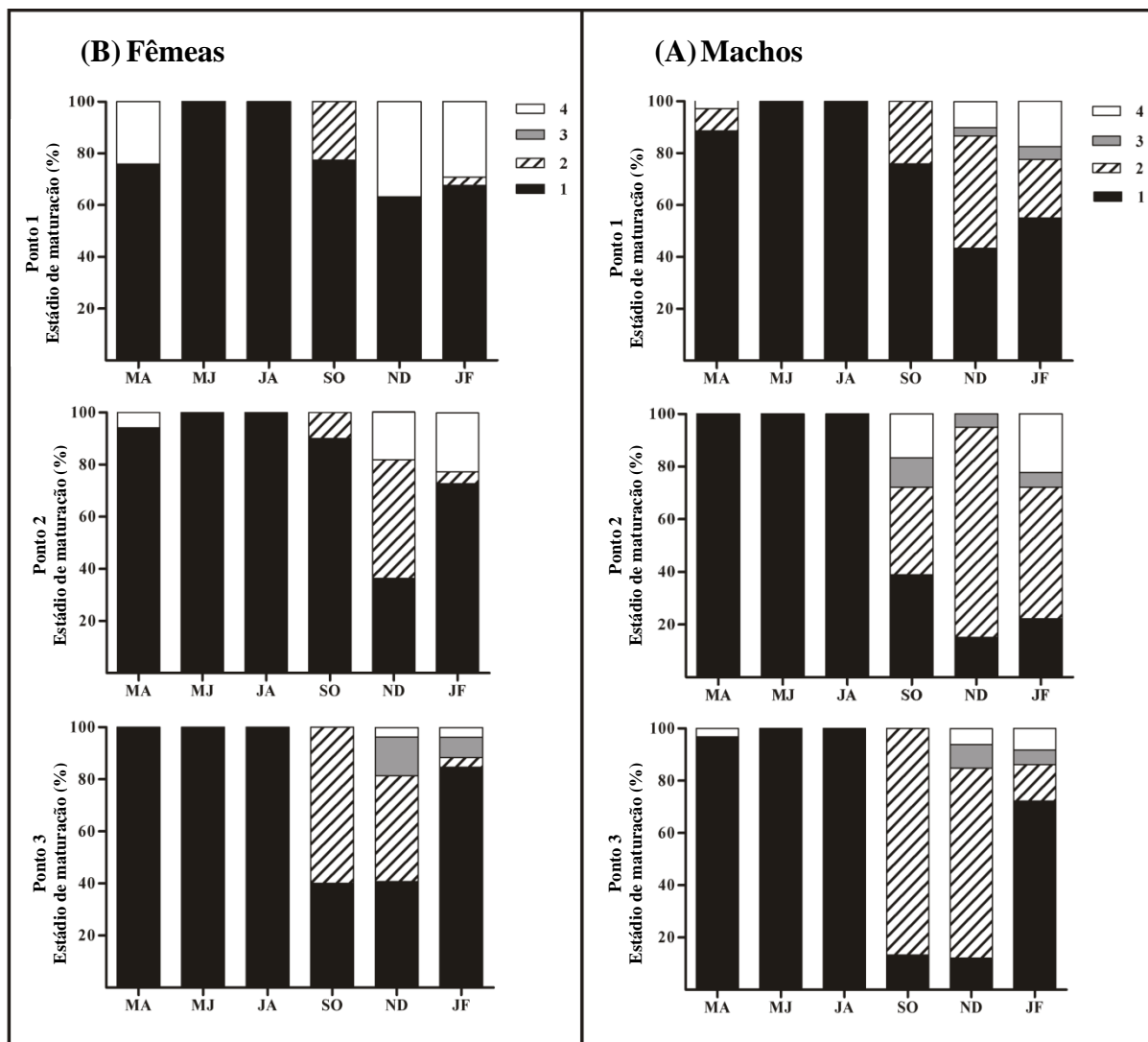
**Fig. 5.** Variações anuais de temperatura (A), transparência (B) e condutividade (C) da água, e índice gonadossomático de fêmeas (D) e de machos (E) de março/2010 a fevereiro/2011, em três pontos da bacia do rio Grande. M-A (março-abril), M-J (maio-junho), J-A (julho-agosto), S-O (setembro-outubro), N-D (novembro-dezembro), J-F (janeiro-fevereiro). Em (D) e (E), os valores são expressos como média  $\pm$  EP e os asteriscos indicam diferenças significativas entre os períodos ( $p < 0,05$ ).



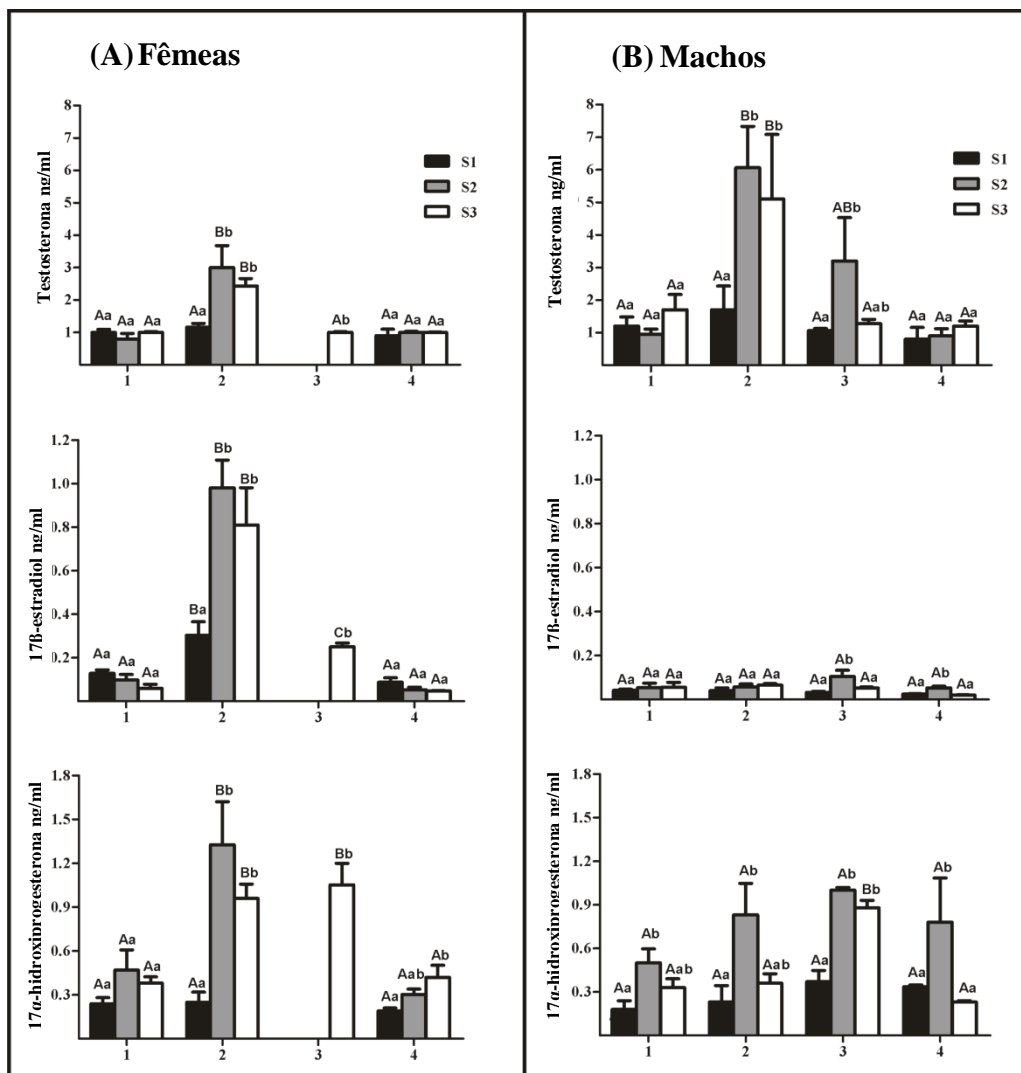
**Fig. 6.** Cortes histológicos de ovários (A-D) e testículos (E-H) de *Prochilodus lineatus* em diferentes estádios de maturação corados com hematoxilina-eosina. **A** Repouso, com folículos perinucleolares (PF); **B** Em maturação, com folículos perinucleolares e vitelogênicos (VF); **C** Desovando, com folículos vitelogênicos remanescentes e folículos pós-ovulatórios (POF); **D** Regressão, com folículos vitelogênicos atrésicos (AF), folículos pós-ovulatórios e corpos amarelos (YB), **E** Repouso, com túbulos seminíferos contendo apenas espermatogônias (SG) e lúmen ocluído; **F** Em maturação, com cistos de espermatogônias, espermatócitos (SC) e espermatídes (ST) e espermatozóides (Z) no lúmen tubular (L); **G** Desovando, túbulos seminíferos com espermatogônias e espermatozóides residuais no lúmen tubular; **H** Regressão, lumen tubular e ducto espermático abertos e com poucos espermatozóides residuais. Barra de escala = 100  $\mu$ m (A-D, G, H), 20  $\mu$ m (E) e 50  $\mu$ m (F).







**Fig. 7.** Frequência relativa (%) dos estágios de maturação gonadal de fêmeas (A) e machos (B) de *Prochilodus lineatus* amostrados de março/2010 a fevereiro/2011. Coluna preta, repouso; coluna com linhas oblíquas, em maturação; coluna cinza, desovando; coluna branca, regressão. M-A (março a abril/2010), M-J (maio a junho/2010), J-A (julho a agosto/2010), S-O (Setembro a Outubro/2010), N-D (novembro a dezembro/2010), J-F (janeiro-fevereiro/2011).



**Fig. 8.** Concentrações séricas da testosterona, 17β-estradiol e 17α-hidroxiprogesterona em (A) fêmeas (n = 20 em S1, 20 em S2 e 22 no S3) e (B) machos (n = 22 em S1, 22 em S2 e 20 em S3) de *Prochilodus lineatus*. Coluna preta, ponto S1, rio Grande a jusante da barragem de Porto Colômbia; coluna cinza, ponto S2, rio Pardo; coluna branca, ponto S3, rio Mogi Guaçu. (1) repouso, (2) em maturação, (3) desovando e (4) regressão. Valores expressos como média ± EP. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os estádios de maturação e letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os locais (P < 0,05).

## 4.2. GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *P. LINEATUS*

(Resultados a serem submetidos para a publicação na revista *Molecular Ecology*)

### Diversidade genética e índice de endogamia

Dez microssatélites descritos para o gênero *Prochilodus* foram testados em *P. lineatus* utilizando um sistema de multiplex marcado com fluorescência (Tabela 1). Testes de equilíbrio de ligação genotípica não foram significativos ( $P < 0,05$ ). Todos os microssatélites foram polimórficos, com números alelos por locus variando de 5 (Pli61) a 32 (Pli30) (Tabela 4). Em toda amostragem, 179 alelos foram detectados, sendo que 32 deles eram privados para o seu ponto de coleta e estavam em baixa frequência ( $\leq 0,05$ ). Os dois alelos privados mais frequentes foram detectadas no ponto S4: alelo 346 (0,050 - Pli30) e alelo 224 (0,054 - Par83) (Tabela 5).

O número de alelos ( $N_a$ ) por locus em cada população variou de  $9,30 \pm 1,37$  (ponto S4) para  $13,50 \pm 2,09$  (ponto S2) e o número de alelos efetivos ( $N_e$ ) variou de  $5,71 \pm 1,05$  (ponto S4) para  $8,11 \pm 1,74$  (ponto S1') (Tabela 4). As heterozigosidades esperada e observada ( $H_e$  e  $H_o$ ) variaram de  $0,74 \pm 0,05$  (ponto S4) para  $0,81 \pm 0,04$  (ponto S3) e de  $0,62 \pm 0,05$  (ponto S1) para  $0,73 \pm 0,04$  (ponto S3), respectivamente (Tabela 4).

Desvios do equilíbrio de Hardy Weinberg (HWE) foram identificados em três loci no ponto S1; dois loci no ponto S1'; três loci no ponto S2; um locus no ponto S3 e oito loci no ponto S4. Nenhum locus apresentou desvio do HWE em todas as cinco localidades estudadas (Tabela 4).

Os valores médios do índice de endogamia ( $F_{IS}$ ) variaram de  $0,119 \pm 0,093$  (ponto S3) a  $0,206 \pm 0,132$  (ponto S1) (Tabela 4), e mostraram correlação significativa com dois dos parâmetros abióticos mensurados: transparência da água ( $r^2 = 0,85$ ,  $p < 0,05$ ) e condutividade ( $r^2 = 0,84$ ,  $p < 0,05$ ) (Tabela 6), sendo que nos pontos S1 e S1', onde a transparência é maior e a condutividade menor, o  $F_{IS}$  é mais elevado. Todos os outros parâmetros abióticos e bióticos não apresentaram correlações com os valores  $F_{IS}$  e a  $H_e$  (Tabela 6). Os pontos S1 e S1' apresentaram valores significativamente mais elevados para transparência e menores para condutividade do que os pontos S2, S3 e S4. Os peixes de S1 mostraram maiores valores de comprimento total, massa corporal e fator de condição de Fulton e menores valores de GSI (Tabela 7).

### **Estrutura genética espacial**

A diferenciação genética entre as populações de *P. lineatus* estimada para todos os loci pelos índices  $F_{ST}$  e  $D_{EST}$  apresentou valores baixos. O índice  $F_{ST}$  variou 0,009-0,016, com diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) observadas para 5 das 10 comparações pareadas, e os valores de índice  $D_{EST}$  variaram de -0,009 a 0,095, com diferença significativa ( $P < 0,05$ ) observada para os mesmos 5 das 10 comparações pareadas. Os valores desses índices indicam o ponto S4 como uma população geneticamente diferenciada das demais quatro populações geográficas (Tabela 8). Os índices também evidenciam diferença significativa entre os peixes de S1 e S3.

Isolamento por distância não foi observado pelo teste de Mantel, que não detectou nenhuma associação significativa entre a distância geográfica entre os pontos e a divergência genética estimada pelo  $F_{ST}$  ( $r^2 = 0,1454$ ,  $P > 0,05$ ) e pelo  $D_{EST}$  ( $r^2 = 0,1437$ ,  $P > 0,05$ ) (Fig. 9).

A análise de agrupamento Bayesiano indicou a presença de três grupos genéticos nessa amostra de *P. lineatus*, denominados: Cluster A (em azul), Cluster B (em verde) e Cluster C (em vermelho) (Fig. 10). A população do ponto S4 foi a mais diferenciada, composta quase inteiramente por espécimes atribuídos ao Cluster C (91%). Os peixes de S3 e uma maior parcela dos peixes de S1' e S2 apresentaram maior probabilidade de pertencer ao Cluster B. Espécimes do ponto S1 mostraram probabilidade de pertencer aos três clusters (Fig. 10B).

Depois de atribuir cada indivíduo à sua mais provável população de origem usando-se o GENECLASS, observou-se uma diferença marcante entre indivíduos do ponto S3 (composto inteiramente pelo Cluster B), e os indivíduos do ponto S4 (composto inteiramente pelo Cluster C) (Figura 11). Os pontos S1, S1' e S2 mostraram peixes dos três clusters. O ponto S1 foi o que apresentou uma maior igualdade na divisão de clusters.

### **Fluxo gênico**

Estimativa das taxas de imigração e emigração proveram evidências claras para a dinâmica populacional fonte-sumidouro (Fig. 12). Populações S1 e S1', ambas do rio Grande tendem a ser recipientes (sumidouros), apresentando taxas de migração positivas ( $2,80 \pm 0,75$  e  $4,29 \pm 0,84$ , respectivamente), o que indica que a imigração é maior do que a emigração nessas áreas. Por outro lado, as populações S2, S3 e S4, todas localizadas nos afluentes estudados, tendem a ser doadoras (fonte) e mostraram taxas de migração negativas ( $-1,65 \pm 0,06$ ,  $-1,29 \pm 0,04$  e  $-4,16 \pm 0,23$ , respectivamente).

**Tabela 4.** Índices genéticos de cinco populações de *P. lineatus* da bacia do rio Grande.

Loci	S1	S1'	S2	S3	S4
<b>Par 80</b>					
N	29	30	30	30	28
Na	17	17	16	14	11
Ne	11,681	12,500	9,574	10,056	8,167
Ho	0,862	0,867	0,967	0,833	0,821
He	0,914	0,920	0,896	0,901	0,878
F <sub>IS</sub>	0,0747	0,0748	-0,0625	0,0915	0,082
HWE	0,2434	0,1884	0,9672	0,3586	0,000*
<b>Par 86</b>					
N	29	26	29	29	30
Na	9	10	15	12	7
Ne	2,137	3,087	4,083	5,741	1,967
Ho	0,414	0,462	0,517	0,586	0,400
He	0,532	0,676	0,755	0,826	0,492
F <sub>IS</sub>	0,239	0,3348	0,3307	0,3061	0,2027
HWE	0,0197	0,000*	0,000*	0,001*	0,000*
<b>Pli 30</b>					
N	29	30	30	30	30
Na	22	23	22	20	14
Ne	13,141	16,364	12,414	14,063	11,180
Ho	0,690	0,867	0,833	0,833	0,933
He	0,924	0,939	0,919	0,929	0,911
F <sub>IS</sub>	0,2699	0,0938	0,1104	0,1196	-0,0081
HWE	0,000*	0,4118	0,0386	0,0123	0,000*
<b>Pli 43</b>					
N	29	30	30	30	30
Na	16	20	21	19	14
Ne	8,205	13,953	14,876	10,909	8,451
Ho	0,690	0,800	0,800	0,867	0,733
He	0,878	0,928	0,933	0,908	0,882
F <sub>IS</sub>	0,2313	0,1548	0,1589	0,0628	0,1847
HWE	0,0044*	0,0936	0,000*	0,6521	0,000*
<b>Pli 61</b>					
N	29	30	30	30	30
Na	4	4	4	3	3
Ne	2,526	2,332	2,110	2,187	1,998
Ho	0,655	0,567	0,633	0,567	0,433
He	0,604	0,571	0,526	0,543	0,499
F <sub>IS</sub>	-0,0672	0,0247	-0,1875	-0,0271	0,149
HWE	0,2417	0,3043	0,0968	0,8304	0,1726
<b>Par 66</b>					
N	29	28	30	30	28
Na	8	7	8	10	6
Ne	3,235	4,308	3,719	5,325	3,588

<i>Ho</i>	0,448	0,571	0,600	0,733	0,679
<i>He</i>	0,691	0,768	0,731	0,812	0,721
<i>F<sub>IS</sub></i>	0,3664	0,2727	0,1957	0,1139	0,0773
<b>HWE</b>	0,0002*	0,0053*	0,2741	0,0161	0,000*
<b>Par 83</b>					
<b>N</b>	28	27	29	26	28
<i>Na</i>	9	13	13	13	11
<i>Ne</i>	6,701	8,055	8,410	7,682	7,193
<i>Ho</i>	0,714	0,889	0,828	0,769	1,000
<i>He</i>	0,851	0,876	0,881	0,870	0,861
<i>F<sub>IS</sub></i>	0,1781	0,004	0,0782	0,1349	-0,1437
<b>HWE</b>	0,1845	0,5482	0,0334	0,0977	0,000*
<b>Par 85</b>					
<b>N</b>	29	30	30	30	30
<i>Na</i>	20	20	20	19	14
<i>Ne</i>	12,647	13,846	14,754	13,740	8,257
<i>Ho</i>	0,759	0,767	0,967	0,900	0,900
<i>He</i>	0,921	0,928	0,932	0,927	0,879
<i>F<sub>IS</sub></i>	0,1932	0,19	-0,02	0,0463	-0,0071
<b>HWE</b>	0,0236	0,0465	0,5714	0,3849	0,000*
<b>Pli 34</b>					
<b>N</b>	29	29	30	30	30
<i>Na</i>	3	4	4	6	3
<i>Ne</i>	2,925	2,709	2,936	3,523	2,228
<i>Ho</i>	0,414	0,483	0,467	0,567	0,367
<i>He</i>	0,658	0,631	0,659	0,716	0,551
<i>F<sub>IS</sub></i>	0,3863	0,2512	0,3078	0,2248	0,3496
<b>HWE</b>	0,0192	0,1507	0,1051	0,041	0,038
<b>Pli 60</b>					
<b>N</b>	29	30	30	30	30
<i>Na</i>	11	11	12	12	10
<i>Ne</i>	3,447	3,956	3,742	3,383	4,119
<i>Ho</i>	0,586	0,600	0,500	0,633	0,533
<i>He</i>	0,710	0,747	0,733	0,704	0,757
<i>F<sub>IS</sub></i>	0,1912	0,2133	0,3328	0,1177	0,3111
<b>HWE</b>	0,268	0,130	0,002*	0,118	0,000*
<b>Total</b>					
<b>N</b>	28,9 ± 0,1	29,00 ± 0,47	29,80 ± 0,13	29,50 ± 0,40	29,40 ± 0,31
<i>Na</i>	11,9 ± 2,07	12,90 ± 2,17	13,50 ± 2,09	12,80 ± 1,77	9,30 ± 1,37
<i>Ne</i>	6,66 ± 1,41	8,11 ± 1,74	7,66 ± 1,58	7,66 ± 1,37	5,71 ± 1,05
<i>Ho</i>	0,62 ± 0,05	0,69 ± 0,05	0,71 ± 0,06	0,73 ± 0,04	0,68 ± 0,07
<i>He</i>	0,77 ± 0,05	0,80 ± 0,04	0,80 ± 0,04	0,81 ± 0,04	0,74 ± 0,05
<i>F<sub>IS</sub></i>	0,20629 ± 0,132	0,16141 ± 0,110	0,12445 ± 0,177	0,11905 ± 0,093	0,11975 ± 0,151

Número de indivíduos (N), alelos (*Na*) e alelos efetivos (*Ne*), heterozigosidades esperada e observada (*He*, *Ho*), coeficiente de endogamia (*F<sub>IS</sub>*) e teste de probabilidade de desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) com valor de P = 0,05 (\* significativo após correções de Bonferroni P = 0,0071; K = 7).

**Tabela 5.** Alelos privados de *Prochilodus lineatus* da bacia do rio Grande.

<b>Loci</b>	<b>S1</b>	<b>S1'</b>	<b>S2</b>	<b>S3</b>	<b>S4</b>	<b>Total</b>
<b>Par 80</b>	217 (0,017)		267 (0,050)	73 (0,017)		3
<b>Par 86</b>			103 (0,017)			2
			111 (0,017)			
<b>Pli 30</b>	318 (0,017)	222 (0,017)	194 (0,017)	322 (0,017)	346 (0,050)	7
		298 (0,017)	366 (0,017)			
<b>Pli 43</b>		188 (0,017)	244 (0,017)	232 (0,017)		4
		230 (0,017)				
<b>Pli 61</b>		206 (0,033)				1
<b>Par 66</b>				173 (0,033)		1
<b>Par 83</b>					224 (0,054)	1
<b>Par 85</b>	199 (0,017)	241 (0,017)	195 (0,017)	253 (0,017)		9
		243 (0,017)	245 (0,017)			
		247 (0,033)	261 (0,017)			
		265 (0,017)				
<b>Pli 34</b>				176 (0,017)		2
				212 (0,033)		
<b>Pli 60</b>			224 (0,017)	226 (0,017)		2
<b>Total</b>	3	9	10	8	2	32

**Tabela 6.** Correlação pareada entre o índice de endogamia ( $F_{IS}$ ) e a heterozigosidade esperada ( $He$ ) *versus* os dados bióticos de peixes e dados abióticos de água. TL = comprimento total; K = fator de condição de Fulton; GSI = índice gonadossomático. \* Valores significativos.

	$F_{IS}$		$He$	
	$r^2$	<b>P</b>	$r^2$	<b>P</b>
<b>TL</b>	0,02	0,78	0,02	0,80
<b>K</b>	0,01	0,83	0,07	0,65
<b>GSI Fêmeas</b>	0,65	0,09	0,03	0,77
<b>GSI Machos</b>	0,75	0,05	0,004	0,91
<b>Condutividade</b>	0,84	0,02 *	0,01	0,87
<b>Transparência</b>	0,85	0,02 *	0,00007	0,96
<b>pH</b>	0,14	0,52	0,58	0,13
<b>Temperatura</b>	0,32	0,31	0,25	0,38
<b>Oxigênio dissolvido</b>	0,56	0,14	0,02	0,79



**Tabela 7:** Dados abióticos da água em cinco pontos de coleta na bacia do rio Grande, e dados biométricos de *Prochilodus lineatus* amostrados em cada ponto.

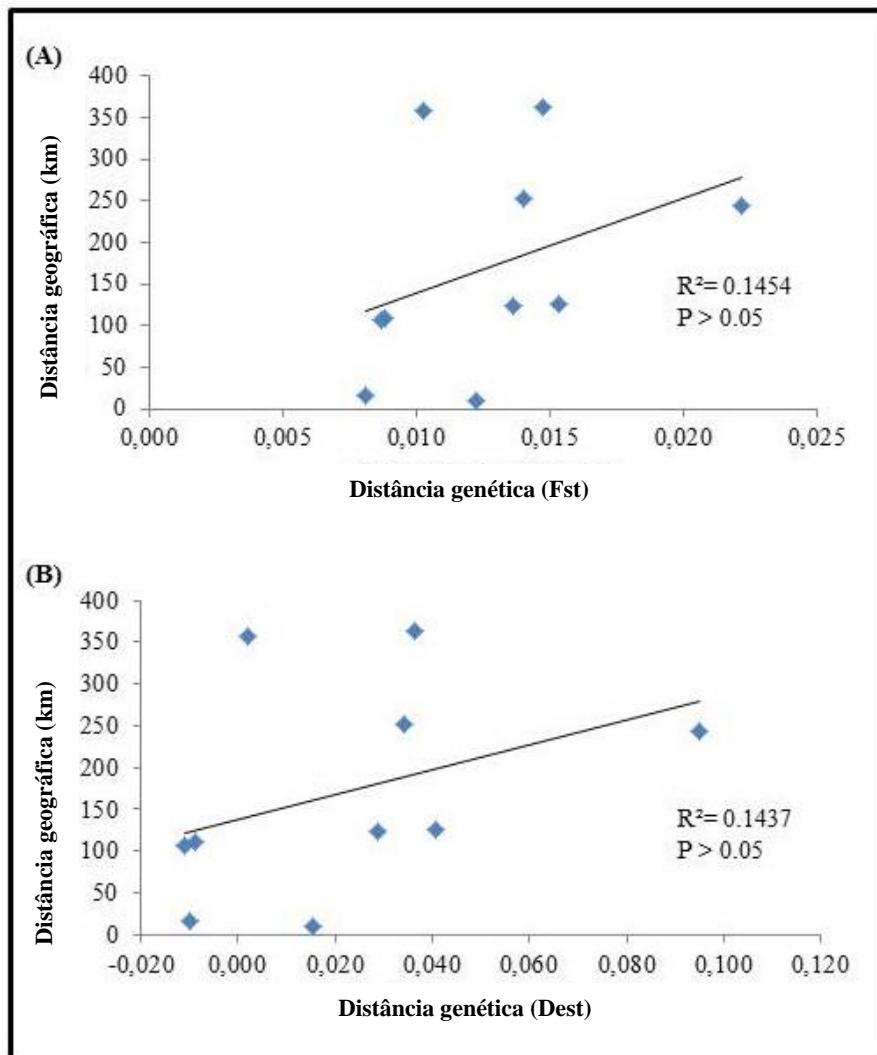
	S1 - rio Grande		S1' - rio Grande		S2 - rio Pardo		S3 - rio Mogi Guaçu		S4 - alto rio Pardo	
	Média ± DP	Amplitude	Média ± DP	Amplitude	Média ± DP	Amplitude	Média ± DP	Amplitude	Média ± DP	Amplitude
<i>Dados abióticos da água</i>										
Temperatura (°C)	25,6 ± 2,47 <sup>a</sup>	22,27 - 28,35	25,8 ± 2,83 <sup>a</sup>	21,17 - 28,30	24,50 ± 3,04 <sup>a</sup>	19,00 - 26,77	22,00 ± 2,25 <sup>b</sup>	18,50 - 24,25	25,20 ± 2,81 <sup>a</sup>	19,50 - 26,79
Oxigênio (mg/L)	8,3 ± 1,38 <sup>a</sup>	6,32 - 10,41	8,4 ± 2,02 <sup>a</sup>	4,63 - 10,02	6,8 ± 2,02 <sup>b</sup>	3,76 - 9,32	7,5 ± 0,67 <sup>ab</sup>	6,50 - 8,31	7,6 ± 1,71 <sup>ab</sup>	5,46 - 10,02
pH	7,30 ± 0,63 <sup>a</sup>	6,80 - 8,52	6,85 ± 0,47 <sup>a</sup>	6,20 - 7,36	7,52 ± 0,69 <sup>a</sup>	6,56 - 8,18	7,12 ± 0,18 <sup>a</sup>	6,87 - 7,30	7,92 ± 1,35 <sup>a</sup>	6,15 - 9,06
Condutividade (µS/cm)	39,10 ± 1,95 <sup>a</sup>	37,00 - 42,00	41,50 ± 1,52 <sup>a</sup>	40,00 - 44,00	76,30 ± 13,86 <sup>b</sup>	61,80 - 97,00	73,33 ± 22,96 <sup>b</sup>	54,00 - 105,00	79,00 ± 7,22 <sup>b</sup>	67,60 - 89,00
Transparência (m)	2,50 ± 0,08 <sup>a</sup>	2,40 - 2,60	2,40 ± 0,08 <sup>a</sup>	2,30 - 2,50	0,38 ± 0,25 <sup>b</sup>	0,20 - 0,75	0,24 ± 0,15 <sup>b</sup>	0,10 - 0,50	0,44 ± 0,22 <sup>b</sup>	0,25 - 0,75
<i>Dados biométricos dos peixes</i>										
TL (cm)	43,05 ± 4,28 <sup>a</sup>	36,00 - 54,50	26,17 ± 1,30 <sup>b</sup>	24,00 - 28,50	32,31 ± 5,76 <sup>b</sup>	29,00 - 42,50	33,28 ± 5,46 <sup>b</sup>	28,50 - 43,00	28,96 ± 2,73 <sup>b</sup>	25,50 - 33,60
BM (kg)	1,34 ± 0,51 <sup>a</sup>	0,72 - 2,70	0,27 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,19 - 0,35	0,94 ± 0,53 <sup>ab</sup>	0,41 - 2,14	0,63 ± 0,24 <sup>b</sup>	0,29 - 1,16	0,40 ± 0,13 <sup>b</sup>	0,25 - 0,67
K	1,65 ± 0,15 <sup>a</sup>	1,38 - 2,01	1,52 ± 0,09 <sup>b</sup>	1,36 - 1,68	1,55 ± 0,18 <sup>b</sup>	1,43 - 2,06	1,40 ± 0,17 <sup>b</sup>	1,08 - 1,86	1,54 ± 0,13 <sup>b</sup>	1,36 - 1,79
GSI Fêmeas	0,40 ± 0,30 <sup>a</sup>	0,17 - 1,15	0,10 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,05 - 0,14	1,28 ± 2,76 <sup>b</sup>	0,23 - 8,12	1,22 ± 2,26 <sup>b</sup>	0,12 - 10,21	1,36 ± 2,29 <sup>b</sup>	0,12 - 5,45
GSI Machos	0,03 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,02 - 0,06	0,01 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,00 - 0,03	0,53 ± 0,74 <sup>b</sup>	0,02 - 1,37	0,45 ± 0,35 <sup>b</sup>	0,01 - 0,89	0,41 ± 0,42 <sup>b</sup>	0,01 - 0,89

S1, rio Grande imediatamente a jusante da barragem de Porto Colômbia; S1', rio Grande a jusante da confluência com o rio Pardo; S2, rio Pardo a jusante da confluência com o rio Mogi Guaçu; S3, rio Mogi Guaçu, na região da Cachoeira de Emas; S4, rio Pardo a montante da confluência com o rio Mogi Guaçu. TL, comprimento total; BM, massa corporal, K, fator de condição de Fulton, GSI, índice gonadosomático. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os locais ( $P < 0,05$ ).

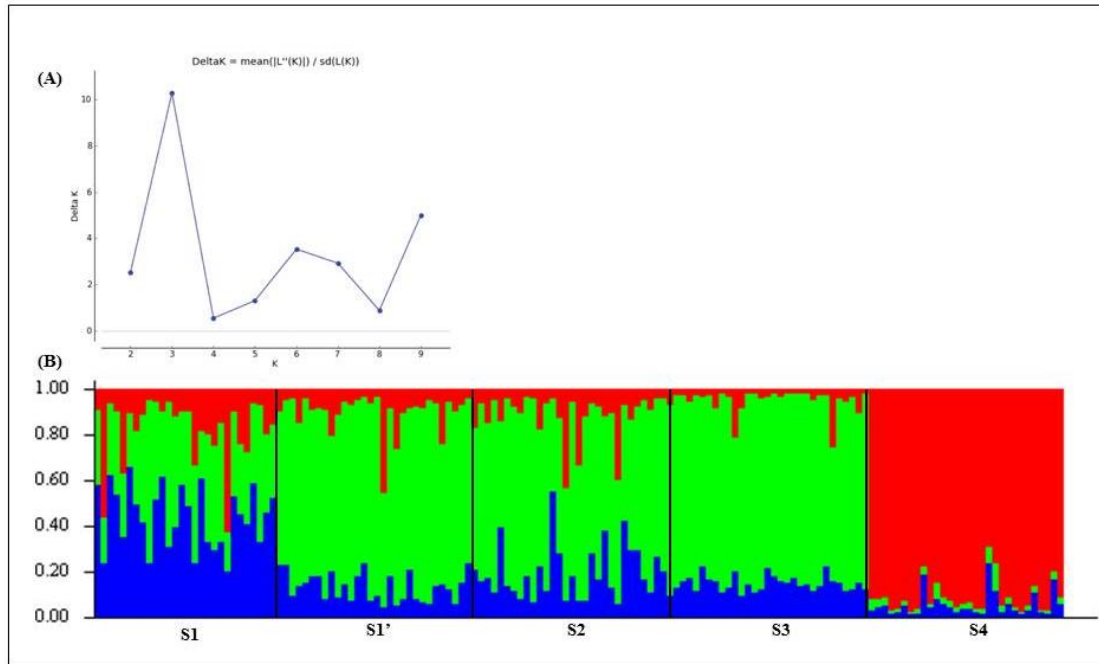
**Tabela 8.** Valores de  $F_{ST}$  (abaixo da diagonal) e  $D_{EST}$  (acima da diagonal) entre pares de populações de *Prochilodus lineatus*. \*valores significativos ( $P < 0,05$ ).

	<b>S1</b>	<b>S1'</b>	<b>S2</b>	<b>S3</b>	<b>S4</b>
<b>S1</b>	0,00000	0,01221	0,00892	0,01439*	0,01603*
<b>S1'</b>	0,01524	0,00000	0,00854	0,01005	0,01367*
<b>S2</b>	-0,00869	-0,01089	0,00000	0,00849	0,01415*
<b>S3</b>	0,03642*	0,00197	-0,00976	0,00000	0,02176*
<b>S4</b>	0,04082*	0,02869*	0,03410*	0,09502*	0,00000

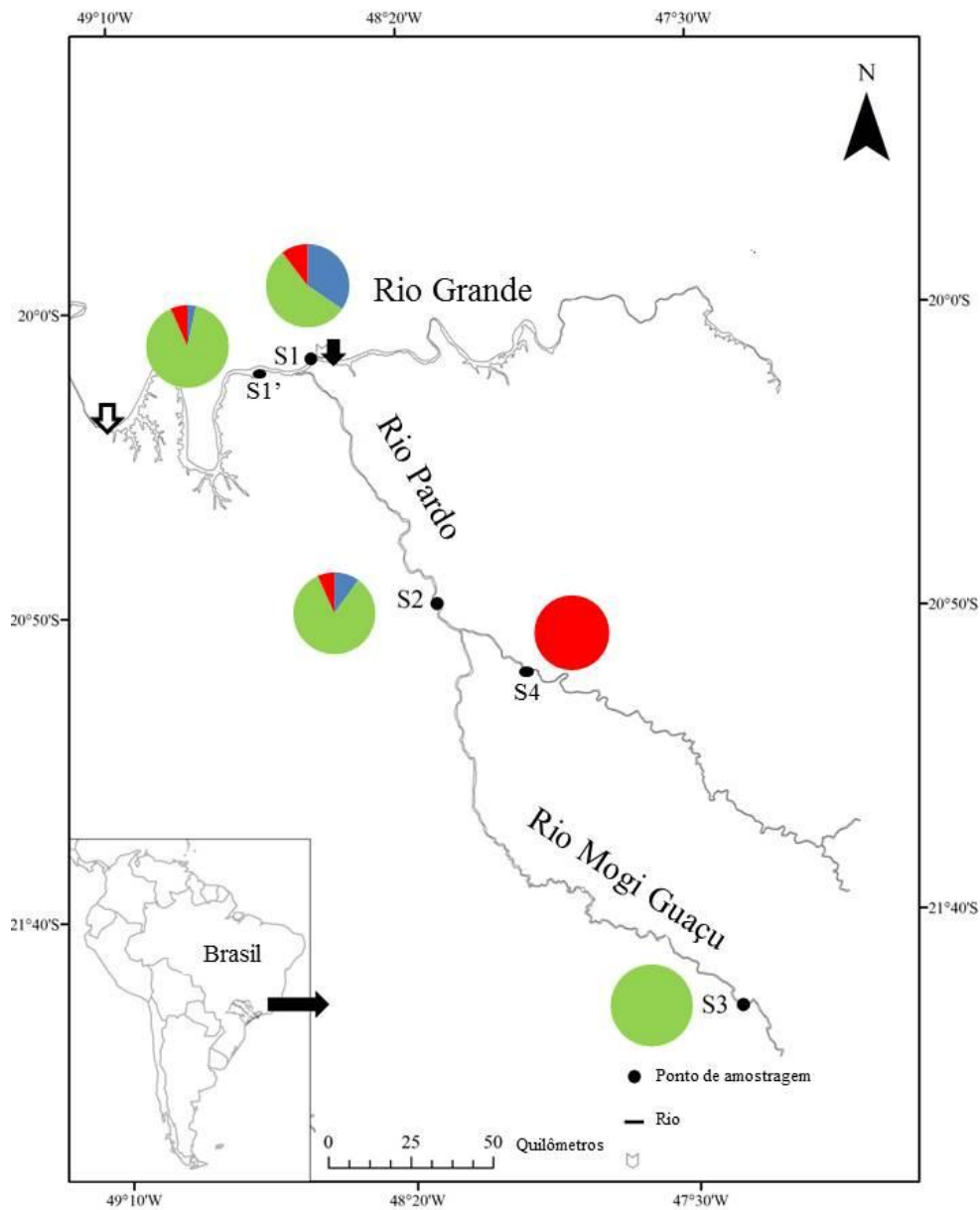
\*valores significativos ( $P < 0,05$ ).



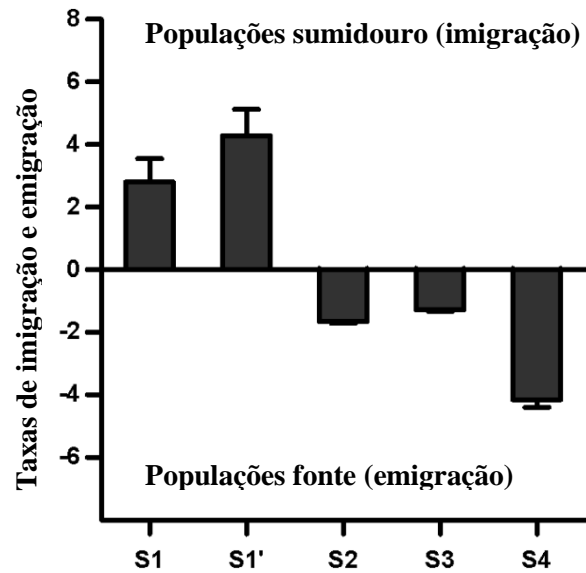
**Fig. 9.** Correlação pareada entre a distância genética e a distância geográfica entre populações de *Prochilodus lineatus* da bacia do rio Grande, utilizando o teste de Mantel. A distância genética é expressa pelos índices  $F_{ST}$  (A) e  $D_{EST}$  (B).



**Fig 10.** Resultado da análise realizada no programa STRUCTURE 2.2 para populações de *P. lineatus* da bacia do rio Grande. (A) DeltaK estimado (= média  $(|L'(K)|)/\text{dp}(L(K))$ ) versus o número de populações, K. Cada ponto representa a média de cinco corridas independentes de 10.000 cadeias de Markov gerações Montecarlo e 1000 gerações de "burn-in". (B) Distribuição proporcional dos espécimes de *P. lineatus* nos três clusters identificados pelo STRUCTURE. Cada indivíduo é representado por uma única barra vertical, na qual a cor indica a designação do indivíduo a cada clusters. As linhas pretas verticais separam os cinco pontos de amostragem, e o nome de cada localidade de origem é indicado abaixo. Cluster A em azul; Cluster B em verde, Cluster C em vermelho.



**Fig. 11.** Ilustração do modelo de estruturação populacional de *P. lineatus* na bacia do rio Grande. Gráficos de pizza mostram a distribuição dos três grupos genéticos determinados pelo programa GENECLASS nos cinco pontos geográficas: S1, rio Grande imediatamente a jusante da barragem de Porto Colômbia; S1', rio Grande a jusante da confluência com o rio Pardo; S2, rio Pardo a jusante da confluência com o rio Mogi Guaçu; S3, Mogi Guaçu, na região de Cachoeira de Emas; S4, rio Pardo a montante da confluência com o rio Mogi Guaçu. Seta preta = Usina de Porto Colômbia; seta branca = Usina de Marimbondo. Cluster A em azul; Cluster B em verde, Cluster C em vermelho.



**Figure 12.** Assimetria nas proporções médias do fluxo gênico de imigrantes e emigrantes em cinco populações de *Prochilodus lineatus* da bacia do rio Grande. As barras mostram a diferença média entre as taxas de imigração e emigração por população  $\pm$  erro padrão. Valores positivos representam populações sumidouros, com um excesso relativo de imigrantes, e os valores negativos representam as populações fonte com um excesso relativo de emigrantes.

### 4.3. HISTOPATOLOGIA HEPÁTICA E REAÇÃO DE TUNEL *IN SITU*

Fígados de *P. lineatus* apresentaram hepatócitos poliédricos distribuídos em cordões e com centro melanomacrofágicos (CMM) presentes. Em geral as alterações histológicas foram comuns, sendo deslocamento do núcleo, necrose e grânulos citoplasmáticos as mais frequentes, e infiltrado inflamatório e hiperemia, as menos frequentes.

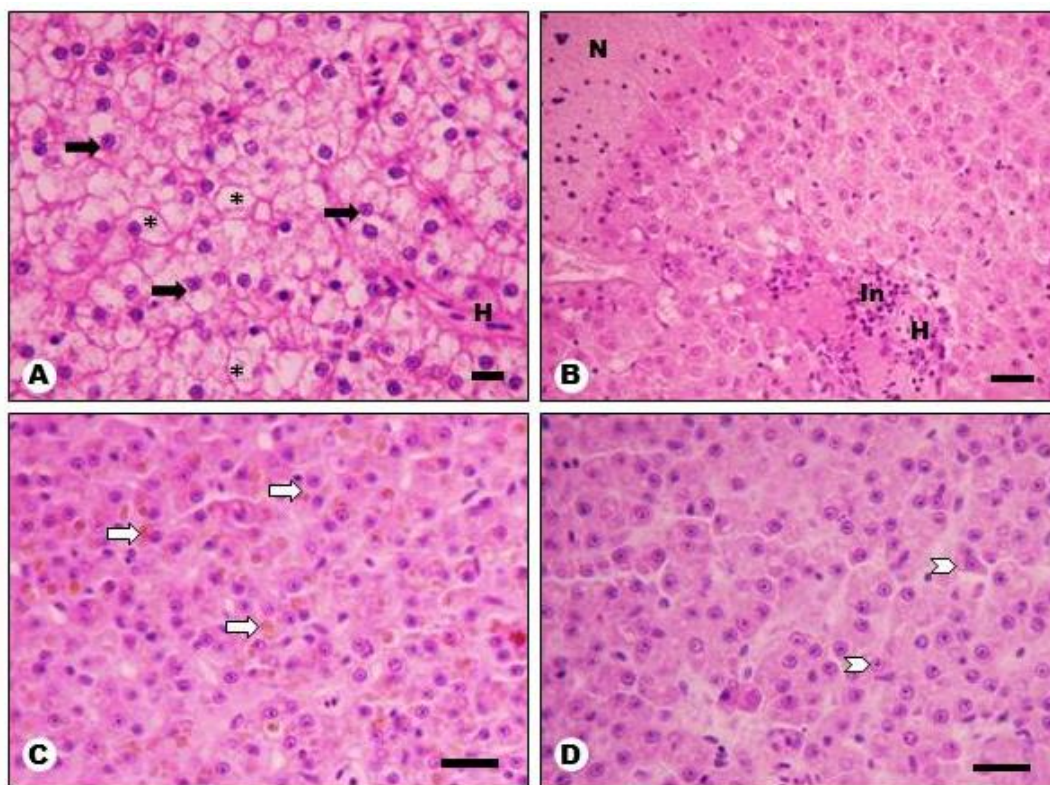
As análises histopatológicas do tecido hepático de *P. lineatus* revelaram que todas as seis alterações analisadas estavam presentes nos peixes dos três pontos de coleta avaliados (Figura 13). Diferenças significativas ( $p < 0,01$ ) relacionadas ao local de coleta dos espécimes foram observadas, com peixes do ponto S1 apresentando índice de lesão tecidual significativamente maior ( $IL = 33,66 \pm 4,92$ ) que peixes do ponto S2 ( $IL = 27,60 \pm 7,87$ ) e S3 ( $IL = 26,13 \pm 8,10$ ) (Tabela 9). Não foram observadas diferenças significativas do índice de lesão tecidual entre machos e fêmeas ou entre estádios reprodutivos. O índice hepatossomático não apresentou diferenças significativas entre os pontos de coleta (Tabela 9). A apoptose, evidenciada pela marcação TUNEL positiva nos hepatócitos, foi pouco frequente nos espécimes estudados, variando de 0 a 6 marcações por  $100 \text{ mm}^2$ . Diferenças significativas na ocorrência de apoptose no tecido hepático, não foram detectadas entre os peixes dos três pontos analisados. Também não foi observada diferença significativa entre fêmeas e machos (Tabela 9).

**Tabela 9.** Índice hepatossomático (HSI), índice de lesão hepática (IL), ocorrência de apoptose (células marcadas / 100 mm<sup>2</sup>) e necrose (escore de ocorrência) em fígados de *Prochilodus lineatus* de três pontos da bacia do rio Grande.

	S1 - rio Grande	S2 – rio Pardo	S3 – rio Mogi Guaçu
Fêmeas (n)	23	15	23
HSI	0,43 ± 0,13 <sup>a</sup>	0,48 ± 0,13 <sup>a</sup>	0,44 ± 0,11 <sup>a</sup>
IL	32,28 ± 3,70 <sup>a</sup>	26,35 ± 7,04 <sup>b</sup>	27,25 ± 7,52 <sup>b</sup>
Machos (n)	30	17	9
HSI	0,46 ± 0,16 <sup>a</sup>	0,47 ± 0,13 <sup>a</sup>	0,46 ± 0,11 <sup>a</sup>
IL	34,86 ± 5,57 <sup>a</sup>	28,71 ± 8,60 <sup>b</sup>	23,27 ± 9,25 <sup>b</sup>
Apoptose	1,33 ± 1,50 <sup>a</sup>	1,2 ± 1,30 <sup>a</sup>	1,83 ± 2,85 <sup>a</sup>
Necrose	3,92 ± 1,35 <sup>a</sup>	1,97 ± 1,79 <sup>b</sup>	2,57 ± 1,38 <sup>b</sup>

Valores expressos em média ± DP. (S1) rio Grande imediatamente a jusante da barragem de Porto Colômbia; (S2) rio Pardo a jusante da confluência com o rio Mogi Guaçu; (S3) rio Mogi Guaçu, na região de Cachoeira de Emas. IL =  $\sum_{alt} (a \times w)$ , em que **alt** = cada alteração avaliada, **a** = escore de ocorrência (0 = inalterada, 2 = leve, 4 = moderada, 6 = grave) e **w** = grau de importância da lesão (1 = mínima, 2 = moderada, 3 = acentuada).





**Fig. 13.** Cortes histológicas de fígados de fêmeas de *Prochilodus lineatus* coletados no rio Grande (A e B), rio Pardo (C) e rio Mogi Guaçu (D), mostrando as principais alterações histológicas detectadas: hiperemia (H), infiltrado inflamatório (In), necrose (N), vacuolização do citoplasma (asteriscos), deslocamento do núcleo (seta preta) e a presença de grânulos citoplasmáticos (setas brancas). A figura D representa um indivíduo com padrão não alterado, com as cabeças de setas brancas indicando hepatócitos com núcleos centrais, não deslocados e citoplasma não vacuolizado. Escala de barras = 25  $\mu$ m.

## 5. DISCUSSÃO

A bacia do alto rio Paraná tem sido alterada pela construção de inúmeras grandes usinas hidrelétricas, muitas delas ao longo do rio Grande, no entanto, a área de estudo é um remanescente lótico através do qual os peixes podem migrar e algumas populações são viáveis. Apesar dos vários impactos detectados na bacia do rio Grande, como a presença de barramentos, o baixo nível de oxigênio dissolvido no rio Pardo e a alta pressão de pesca em toda a região (Perini et al., 2013), *P. lineatus* ainda é uma das espécies de importância comercial mais abundante. Todavia, medidas de conservação devem ser tomadas para evitar maiores prejuízos a esse ecossistema aquático e à ictiofauna local. É importante destacar o importante papel do rio Pardo nesse ecossistema e a necessidade de monitoramento de suas águas em vista da quantidade de esgoto doméstico que ele recebe de grandes centros urbanos do interior paulista. O rio Mogi Guaçu na região de Cachoeira de Emas é uma área de preservação ambiental e igualmente importante nesse sistema, para a manutenção das populações de peixes migradores. O presente trabalho avaliou a histofisiologia reprodutiva e a genética populacional pela análise de microssatélites de *P. lineatus* no trecho entre a usina de Porto Colômbia e Cachoeira de Emas.

### **Biologia reprodutiva de *P. lineatus***

Os peixes do ponto S1 foram maiores do que aqueles coletados nos pontos S2 e S3, provavelmente porque o ponto S1 é uma área protegida, onde a pesca é totalmente proibida e monitorada, o que permite aos peixes alcançar maior tamanho corporal. Por outro lado, há uma grande exploração da pesca profissional e esportiva nos rios Pardo e Mogi Guaçu, sendo *P. lineatus* uma das espécies mais abundantes e capturadas. Essas observações são reforçadas pelos relatos de Bianchi et al. (2000), que verificaram que peixes de comunidades submetidas a pressão de pesca intensa tendem a ser de menor tamanho quando comparados a peixes de ambientes não submetidos desse tipo de exploração. Os valores de K foram menores nas fêmeas do ponto S3, provavelmente devido ao alto consumo de reservas lipídicas em fêmeas, essencial para a migração reprodutiva e maturação gonadal (Ribeiro et al. 2007). Em machos, o consumo de reservas lipídicas para a reprodução é mais baixo que nas fêmeas, sendo os valores de K mais elevados em S3 (Rajasilta et al. 1997; Ribeiro et al. 2007).

Durante o período reprodutivo, a baixa frequência de peixes em maturação (estádio 2) no rio Grande (S1) justifica os valores mais baixos de GSI, semelhante ao relatado para *P. argenteus* do rio São Francisco (Sato *et al.* 2005). O pico do GSI em novembro-dezembro coincidiu com o aumento da temperatura e diminuição da condutividade e da transparência da água, associando esses fatores a uma maior atividade reprodutiva dos peixes (Lowe-McConnell 1987). Fêmeas em desova (estádio 3) foram coletadas apenas no rio Mogi Guaçu (S3), e machos no estágio 3 foram também frequentes nesse trecho, onde a reprodução *P. lineatus* é completada. Estes resultados, associados a estudos de marcação-recaptura (Godoy 1959; Godoy 1972), sugerem que durante o período reprodutivo, *P. lineatus* deixa o rio Grande (S1) usando o rio Pardo (S2) como uma rota migratória para completar seu ciclo reprodutivo no rio Mogi Guaçu (S3). Além disso, a frequência de peixes em regressão (estádio 4) foi maior em S1, sugerindo que *P. lineatus* provavelmente retorna a esse local, onde permanece até a próxima estação reprodutiva. De fato, a área onde se localiza o ponto S1 foi considerada um importante sítio de alimentação para peixes migratórios (Godoy 1972).

No presente estudo, a fecundidade e o diâmetro ovocitário foram mais altos e o índice de atresia folicular foi mais baixo nos peixes dos pontos S2 e S3, onde eles atingiram um desenvolvimento gonadal mais avançado. Diversos fatores influenciam as taxas de fecundidade e o índice de atresia folicular, tais como sazonalidade, parâmetros físico-químicos da água, poluição, disponibilidade de alimentos, estresse, confinamento e níveis hormonais inadequados (Bromley *et al.* 2000; James & Sampath 2002; Drevnick *et al.* 2006; Benejam *et al.* 2010; Muchlisin *et al.* 2011). Baixa fecundidade e altos níveis de atresia folicular foram também reportados por outros estudos a jusante de reservatórios brasileiros quando comparados a peixes de regiões mais distantes das barragens (Agostinho *et al.* 1993; Sato *et al.* 2005; Arantes *et al.* 2010; Thomé *et al.* 2012). No rio Colorado, EUA, foi observada uma diminuição no crescimento somático dos peixes, no fator de condição, e do recrutamento dos peixes na área de influência de barragens hidrelétricas (Paukert & Rogers 2004).

Níveis plasmáticos de gonadotrofinas e hormônios sexuais oscilam durante o ciclo reprodutivo anual dos peixes, variando de acordo com a estratégia reprodutiva de cada espécie (Devlin & Nagahama 2002). Peixes que apresentam reprodução sazonal em geral apresentam variações bruscas nas concentrações de esteroides sexuais durante o ciclo reprodutivo, como detectado em *P. lineatus* no presente trabalho e em outras

espécies de água doce neotropicais (Marcano *et al.* 2007; Arantes *et al.* 2010). Os baixos níveis de esteroides sexuais em peixes do ponto S1 durante o período reprodutivo justificam os menores valores de GSI em fêmeas e machos, bem como a menor fecundidade e diâmetro de folículos vitelogênicos nesse ponto. Resultados semelhantes foram obtidos em *P. argenteus* na área de influência da barragem de Três Marias, rio São Francisco (Arantes *et al.* 2010; Domingos *et al.* 2012a). Por outro lado, as variações cíclicas de testosterona (T) e  $17\beta$ -estradiol ( $17\beta$ -E) nos pontos S2 e S3 suportam o desempenho reprodutivo de *P. lineatus* nesses pontos, uma vez que  $17\beta$ -E está envolvido na produção das proteínas de ovo, coriogenina e vitelogenina (Fausto *et al.* 2004; Senthilkumaran *et al.* 2004), e T estimula a maturação testicular, atuando na diferenciação das espermatogônias, formação de cistos de espermátócitos e promovendo a liberação de esperma no lúmen tubular (Weltzien *et al.* 2004; Schulz *et al.* 2010). Em contraste com a queda de T e  $17\beta$ -E no estágio 3, as concentrações de  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona ( $17\alpha$ -OHP) mantiveram-se elevadas no estágio 3. Esse hormônio é convertido em DHP, responsável pelos eventos da maturação final ovocitária, indução da espermição e aumento da produção de sêmen (Miwa *et al.* 2001; Schulz *et al.* 2010). De fato, valores elevados de  $17\alpha$ -OHP ocorreram em peixes dos pontos S2 e S3, onde as fêmeas alcançaram a maturação final ovocitária e desova, e os machos também estavam preparados para a reprodução.

### **Genética de populações de *P. lineatus***

Considerando-se a ausência de barreiras físicas entre os pontos de amostragem estudados, uma única população panmítica dentro de um sistema hidrográfico contínuo seria uma situação esperada para esses peixes migradores. No entanto, os valores significativos de  $F_{ST}$  e  $D_{EST}$  e a análise Bayesiana sugeriram a existência de uma estrutura genética nesse sistema de rios, com três agrupamentos genéticos habitando as localidades amostradas. Apesar da ausência de barreiras, estruturação genética nas populações de peixes pode ocorrer entre distâncias geográficas curtas (Angers & Bernatchez 1998; Koskinen *et al.* 2001; Koskinen *et al.* 2002; Primmer *et al.* 2006), devido a efeito fonte-sumidouro (*source-sink effect*), fatores comportamentais como o comportamento de *homing* ou fatores ambientais (Gaggiotti *et al.* 2009; Sanches *et al.* 2012).

O ponto S4, no alto rio Pardo, foi o mais diferenciado deles, como demonstrado pela análise de agrupamento Bayesiana, que indicou uma maior similaridade entre as populações dos locais S1, S1', S2 e S3, compostas principalmente por indivíduos do Cluster B. O ponto S4 por sua vez, era completamente diferenciado, sendo inteiramente composto por indivíduos designados para o Cluster C (Fig. 11). A associação entre os pontos S1, S1', S2 e S3 era esperada, já que não há barreiras geográficas entre eles e há estudos de marcação-recaptura assumindo a existência de uma rota migratória passando por esses pontos (Godoy 1972). No entanto, embora os peixes do ponto S3 sejam mais relacionados com os pontos S1, S1' e S2 do que com o ponto S4, uma diferenciação significativa entre S1 e S3 também foi detectada pelos índices genéticos, uma vez que o ponto S1 apresentou menos espécimes atribuídos ao Cluster B (55%) do que os pontos S1' (90%), S2 (83%) e principalmente S3, composto inteiramente por indivíduos designados para o Cluster B (Fig. 11). Além disso, indivíduos da população S1 foram atribuídos aos seus agrupamentos genéticos com base em baixos índices de probabilidade (< 80%). Esses estoques mistos detectados no ponto S1 podem representar uma falta de identidade genética dos peixes do ponto S1, o que poderia estar relacionado ao impacto da barragem, que bloqueou o movimento dos peixes ao longo do rio principal e para suas áreas de desova mais a montante. Nós especulamos que alguns espécimes poderiam ser remanescentes de uma população maior e panmítica que não existe mais, devido à fragmentação do habitat pelos represamentos. Esta hipótese é fortalecida pela análise de populações de *P. lineatus* em outras áreas do rio Grande, a montante da usina de Porto Colômbia e por estudos de comportamento por telemetria.

Estruturação populacional similar à detectada no presente trabalho foi demonstrada para outras espécies de piracema da bacia do rio São Francisco, como *Prochilodus argenteus* (Hatanaka et al. 2006); *Brycon hilarii* (Sanchez & Galetti Jr 2007) e *Brycon orthotaenia* (Wasko & Galetti 2002; Sanchez et al. 2012), tendo sido associada ao fato de que, embora diferentes populações migratórias possam ocupar e explorar o mesmo rio, elas se segregam durante o período de desova e, conseqüentemente, a estruturação populacional é mantida mesmo com a falta de uma barreira geográfica (Pereira et al. 2009; Sanchez et al. 2012). Além disso, algumas espécies de peixes são capazes de reconhecer indivíduos parentes de não-parentes, e podem mostrar preferência por se acasalarem com os mais aparentados (Ward & Hart 2003; Fraser et al. 2005; Ward et al. 2009). Estes mecanismos poderiam proporcionar

um intercâmbio limitado de indivíduos em reprodução, acentuando diferenças genéticas entre populações menos aparentadas (Ward & Hart 2003).

Isolamento por distância não foi detectado para *P. lineatus* como demonstrado pelo teste de Mantel, no qual populações mais distantes geograficamente, como S2 e S3 (252,8 km de distância,  $F_{ST} = 0,0085$ ), foram mais relacionadas do que populações mais próximas entre si, como S2 e S4 (16,3 km de distância,  $F_{ST} = 0,0141$ ). Considerando a forte estrutura genética populacional encontrada para as populações do alto rio Pardo e rio Mogi Guaçu, especulamos que a manutenção desses agrupamentos genéticos a estrutura populacional sem barreira geográfica pode estar relacionada a um comportamento de *homing*, como sugerido por Godoy (1972), utilizando estudos de marcação-recaptura. Comportamento de *homing* foi descrito em espécies de água doce neárticas, como a carpa e o salmão (Stahl 1987; Minakawa & Kraft 2005; Neville *et al.* 2006b), e espécies marinhas, como atum e tubarão (Keeney *et al.* 2005; Rooker *et al.* 2008). Na região neotropical, a maioria do conhecimento sobre comportamento de *homing* é baseado em estudos de marcação-recaptura e radio-telemetria (Godoy 1972; Godinho & Kynard 2006; Godinho *et al.* 2007) e poucos usaram ferramentas genéticas (Hatanaka & Galetti Jr. 2003; Batista & Alves-Gomes 2006; Hatanaka *et al.* 2006; Pereira *et al.* 2009).

Considerando-se a existência de uma possível população residente (sumidouro) habitando a área a jusante da usina de Porto Colômbia (S1), nós testamos a hipótese de haver uma metapopulação em um sistema de fonte-sumidouro, com os afluentes mantendo os estoques de *P. lineatus* (fonte), um efeito resultante do represamento sobre estrutura genética da população. De fato foram detectadas duas populações receptoras (S1 e S1') no rio Grande e três populações doadoras (S2, S3 e S4) em seus afluentes, rios Pardo e Mogi Guaçu, que foram considerados áreas de reprodução de *P. lineatus* e estariam fornecendo indivíduos para o rio Grande, sua área de alimentação. Esses dados são suportados pelos resultados da biologia reprodutiva dessa espécie que mostrou que os peixes migram pelo rio Pardo para alcançar áreas de desova no rio Mogi Guaçu (Perini *et al.* 2013). Estudos com peixes e outros vertebrados tem mostrado a importância de proteger áreas estrategicamente posicionadas para atuarem como fontes de emigrantes dentro de uma metapopulação (Novaro *et al.* 2000; Hrbek *et al.* 2005). Nesse modelo, por exemplo, zonas de caça podem ser sustentadas por áreas adjacentes, com habitat relativamente intacto (Novaro *et al.* 2000).

As características genéticas das populações geográficas de *P. lineatus* foram também relacionadas ao ambiente (Manel *et al.* 2003) que inclui as variáveis físico-químicas da água avaliadas no presente trabalho. As duas populações receptoras S1 e S1' apresentaram maior coeficiente de endogamia  $F_{IS}$  e a água desses pontos foi significativamente mais transparente e com menor condutividade. Esses dois fatores abióticos mostraram uma correlação significativa com o coeficiente de endogamia  $F_{IS}$ , em que o aumento do  $F_{IS}$  acompanha o aumento da transparência ( $R^2 = 0,85$ ,  $p < 0,05$ ) e a diminuição da condutividade ( $R^2 = 0,84$ ,  $p < 0,05$ ), mostrando que diferenças nos índices genéticos populacionais foram associadas às diferenças nas características bióticas e abióticas de cada ponto. De fato, mudanças na transparência da água e condutividade têm sido apontadas como o principal distúrbio físico causado pela barragem de Porto Colômbia, e também tem sido relacionadas a alterações no ciclo reprodutivo de *P. lineatus* (Perini *et al.* 2013). Valores altos de transparência de água e baixa condutividade foram detectados logo a jusante da barragem de Porto Colômbia (S1). Nesse ponto, espécimes de peixe foram significativamente mais pesados, apenas uma pequena proporção de fêmeas atingiu estágio de maturação e não foram capazes de desovar na região (Perini *et al.* 2013). Por outro lado, o ponto S3, no rio Mogi Guaçu, apresentou elevado número de fêmeas maduras, além de fêmeas desovadas (Perini *et al.* 2013). Godoy (1972) observou que a região onde o ponto S1 está localizado seria um sítio de alimentação e a área onde o ponto S3 está, seria um sítio de reprodução. Estas observações são reforçadas pelos dados genéticos do presente trabalho, que indicam nos pontos S2, S3 e S4 (todos localizados nos afluentes) um menor coeficiente de endogamia e maior diversidade alélica e heterozigosidade, provavelmente recebendo cardumes de outras regiões da bacia do rio Grande durante o período reprodutivo. Por outro lado, o ponto S1, localizado no rio principal do sistema, apresentou o maior coeficiente de endogamia e menor heterozigosidade, que poderia ser relacionada à presença de uma possível população residente atuando como sumidouro em uma dinâmica meta-populacional fonte-sumidouro. Na bacia do rio Marys, EUA, padrões genéticos das populações da truta *Oncorhynchus clarkii henshawi* são afetadas por uma combinação de processos relacionados à paisagem do ambiente e a presença de metapopulações (Neville *et al.* 2006a). Nesse contexto, populações localizadas em habitats de maior qualidade ambiental ou em ambientes com maior fluxo de migradores apresentaram maior variabilidade genética do que as demais populações.

Desvios do HWE, como ocorrido em 17 loci das amostras analisadas, são comuns na análise de microssatélites (Carreras-Carbonell *et al.* 2006; Chevolut *et al.* 2006) e podem ser resultado de artefatos técnicos como a ocorrência de alelos nulos, erros da DNA polimerase ou excesso de heterozigotos, endogamia, seleção de alelos específicos, efeito Wahlund, ou o elevado número de alelos por locus. Evidências significativas para erros de escore devido a excessos de heterozigotos e erros da DNA polimerase não foram encontradas em nossas amostras. Embora alelos nulos tenham sido detectados, eles não foram constantes em todas as populações para o mesmo locus. Alelos nulos podem resultar de erros no anelamento de *primers* durante a amplificação e são frequentemente reportados em estudos de genética de populações usando microssatélites, sendo uma das limitações dessa técnica (Dakin & Avise 2004). Entretanto, marcadores moleculares microssatélites são excelentes para estudos de genética de populações muito próximas, visto que essas pequenas sequências possuem rápida taxa mutacional, elevado conteúdo de informação de polimorfismo, são abundantes e têm herança do tipo mendeliana. Além disso, a análise de microssatélites necessita de pequenas quantidades de DNA para a amplificação por PCR (Melo *et al.* 2008).

Aqui nós apresentamos pela primeira vez evidências de uma modificação antrópica do habitat influenciando a estrutura de meta-população do peixe *P. lineatus*. A existência de populações fonte em tributários e populações sumidouro no rio principal, além de agrupamentos genéticos co-existent de *P. lineatus* em áreas de alimentação e a segregação desses agrupamentos nas áreas de reprodução, traz novos conhecimentos sobre comportamento e biologia de peixes migradores, para programas de gestão da pesca e conservação da diversidade genética. Análises de outras sub-bacias e diferentes espécies de peixes poderiam fornecer um panorama mais completo da dinâmica populacional das espécies afetadas pela fragmentação do habitat. Nossos dados sugerem que este sistema fluvial, composto por um rio principal com um represamento e dois grandes afluentes é auto-sustentável, uma vez que afluentes estão agindo como fonte para *P. lineatus*, que ainda é a espécie mais abundante na região. Mesmo em um lugar afetado por ações antrópicas e pesca comercial, esses afluentes parecem ser capazes de manter esta população de peixes. Todavia, novos barramentos em um desses dois afluentes poderiam ser fatais para esse sistema.



### **Histopatologia hepática de *P. lineatus***

A exposição a estressores ambientais pode resultar em alterações morfológicas que, mesmo não sendo letais, prejudicam a habilidade do peixe em realizar suas funções fisiológicas (Rand 1995). É crescente o número de trabalhos em que peixes são empregados como bioindicadores da qualidade dos ecossistemas aquáticos (Schwaiger *et al.* 1997; Gundersen *et al.* 2000; Pacheco & Santos 2002; Thophon *et al.* 2003; Barcarolli & Martinez 2004), entretanto, poucos são os que utilizaram espécies nativas (Winkaler *et al.* ; Martinez & Cólus 2002; Barcarolli & Martinez 2004), como por exemplo o tambaqui, que tem sido empregado como bioindicador da presença de agentes químicos, físicos e biológicos em rios da Amazônia (Groff 2008).

Os valores do índice de lesão hepática (IL) mostraram que as diferenças teciduais observadas em fígados de *P. lineatus* no presente trabalho não estão relacionadas ao sexo e estágio de maturação gonadal, mas sim com o ambiente em que os espécimes foram coletados, já que peixes do ponto localizado no rio principal (S1), que sofre influência direta do barramento, apresentaram maior IL do que peixes coletados nos seus afluentes (S2 e S3).

Apesar de o rio Pardo ser conhecidamente e visivelmente um rio poluído que recebe lixo doméstico de diversas cidades, o IL foi menor que em S1, sendo que injúrias no fígado podem estar relacionadas ao grande acúmulo de gordura dos peixes do ponto S1, os quais são maiores, mais pesados e com elevado valor de K. A presença de poluentes e acúmulo de matéria orgânica no ponto S2 não promoveu alterações drásticas do tecido hepático de *P. lineatus*, todavia agentes xenobióticos provocam alterações no nível molecular que não foram avaliadas no presente trabalho, mas podem revelar outros tipos de alteração. Devido ao seu hábito alimentar iliófago, essa espécie é adequada para monitoramento ambiental, pois está em contato constante com xenobióticos na água e no sedimento do qual se alimenta (Camargo & Martinez 2006; Langiano & Martinez 2008; Simonato *et al.* 2008; Cazenave *et al.* 2009).

Estudos que avaliam lesões histopatológicas em fígados de peixes são tipicamente realizados em condições de cultivo, e os conduzidos em ambientes naturais geralmente avaliam as alterações patológicas associadas a agentes contaminantes da água, como metais pesados, organoclorados e outros xenobióticos, sendo raros os que buscam associar tais mudanças a alterações do ecossistema. No presente trabalho a baixa ocorrência de apoptose (menos de 2 células marcadas / 100 mm<sup>2</sup>) e a ausência de

diferença significativa, demonstram que esse tipo de morte celular não é o mais comum de se observar no tecido hepático, sendo a necrose amplamente identificada. Nos três pontos estudados áreas de necrose foram detectadas, sendo mais comum no ponto S1. O índice hepatossomático, relacionado tanto as demandas energético-metabólicas, quanto ao estado nutricional, também não apresentou diferença significativa, que, bem como a ocorrência de apoptose, não foi um bom indicador das diferenças ambientais entre os pontos amostrados.

Em conjunto, os resultados do presente estudo contribuem para a compreensão do comportamento e biologia de *P. lineatus*, bem como fornecem subsídios para a conservação e manejo dessa espécie em ambiente natural. Programas de monitoramento nos afluentes são recomendáveis para minimizar o impacto da usina sobre a ictiofauna local.

## 6. CONCLUSÕES

- Peixes coletados a jusante da UHE de Porto Colômbia não conseguem completar seu ciclo reprodutivo, sendo incapazes de desovar e apresentam alterações na flutuação dos hormônios sexuais e na fecundidade;
- Durante o período reprodutivo, *Prochilodus lineatus* deixa o rio Grande, a jusante da barragem de Porto Colômbia (S1) migrando através do rio Pardo (S2) para desovar no rio Mogi Guaçu, região de Cachoeira de Emas (S3);
- A UHE de Porto Colômbia é uma barreira física para a migração de *P. lineatus* e, os peixes que habitam a área logo a jusante são maiores, mais pesados e desenvolvem maior quantidade de lesões no tecido hepático, principalmente necrose e deslocamento do núcleo;
- A apoptose não é um tipo de lesão frequente no fígado de *P. lineatus* nas condições estudadas, sendo a necrose o tipo de morte celular mais frequente;
- Na área do presente estudo, *P. lineatus* não constitui uma única e panmítica população genética, mas está subdividido em três agrupamentos que coexistem e mantém um nível de estruturação, ainda que baixo. Essa estruturação não se relaciona a isolamento geográfico e deve estar relacionada a um comportamento de *homing*;
- As populações de *P. lineatus* constituem uma metapopulação influenciada por uma dinâmica de fonte-sumidouro, relacionada a existência do represamento hidrelétrico e ao papel biológico de cada um dos rios nesse sistema;
- Os afluentes rios Pardo e Mogi Guaçu são importantes na manutenção dos estoques de *P. lineatus* na bacia do rio Grande, e a conectividade entre esses rios é um fator chave para a conservação de suas populações e do fluxo gênico entre elas.

## 7. REFERÊNCIAS

- Aarts BGW, Van Den Brink FWB, Nienhuis PH (2004) Habitat loss as the main cause of the slow recovery of fish faunas of regulated large rivers in Europe: the transversal floodplain gradient. *River Research and Applications* **20**, 3-23.
- Agostinho A, Pelicice F, Gomes L (2008) Dams and the fish fauna of the Neotropical region: impacts and management related to diversity and fisheries. *Brazilian Journal of Biology* **68**, 1119-1132.
- Agostinho AA, Gomes LC, Latini JD (2004) Fisheries management in Brazilian reservoirs: Lessons from/for South America. *Interciencia* **29**, 334-338.
- Agostinho AA, Gomes LC, Pelicice FM (2007) *Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil* EDUEM, Maringá.
- Agostinho AA, Gomes LC, Suzuki HI, Júlio-Júnior HF (2003) Upper Paraná river basin. In: *Migratory Fish of South America* (eds. Carolsfeld J, Harvey B, Ross C, Baer A), pp. 19-98. World Fisheries Trust, Victoria, British Columbia.
- Agostinho AA, Julio JR HF, Petrere JR. M (1994) Itaipu reservoir (Brazil): impacts of the impoundment on the fish fauna and fisheries. In: *Rehabilitation of Freshwater Fisheries* (ed. Cowx IG), pp. 171-184. Fishing News Book, Oxford.
- Agostinho AA, Mendes VP, Suzuki HT, Canzi C (1993) Avaliação da atividade reprodutiva da comunidade de peixes dos primeiros quilômetros a jusante do reservatório de Itaipu. *Revista Unimar 15 (Suppl.)*, 175-189.
- Aljanabi SM, Martinez I (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* **25**, 4692-4693.
- Allendorf FW, Ryman N, Utter FM (1987) Genetics and fishery management: past, present and future. In: *Population Genetics & Fishery Management* (eds. Ryman N, Utter F), pp. 1-19. University of Washington, Washington.
- Allendorf FW, Utter FM (1979) Population genetics. In: *Fish Physiology* (eds. Hoar WS, Randal DJ, Brett JR), pp. 407-454. Academic Press, Washington.
- Angers B, Bernatchez L (1998) Combined use of SMM and non-SMM methods to infer fine structure and evolutionary history of closely related brook charr (*Salvelinus fontinalis*, Salmonidae) populations from microsatellites. *Molecular Biology and Evolution* **15**, 143-159.

- Arantes FP, Santos HB, Rizzo E, Sato Y, Bazzoli N (2010) Profiles of sex steroids, fecundity, and spawning of the curimata-pacu *Prochilodus argenteus* in the Sao Francisco River, downstream from the Tres Marias Dam, Southeastern Brazil. *Animal Reproduction Science* **118**, 330-336.
- Arantes FP, Santos HB, Rizzo E, Sato Y, Bazzoli N (2011) Influence of water temperature on induced reproduction by hypophysation, sex steroids concentrations and final oocyte maturation of the “curimatã-pacu” *Prochilodus argenteus* (Pisces: Prochilodontidae). *General and Comparative Endocrinology* **172**, 400-408.
- Bagenal TB, Braum E (1978) Eggs and early life history. In: *Methods of assessment of fish production in fresh waters* (ed. Bagenal T), pp. 165-201. IBP Handbook 3, Blackwell Scientific, Oxford.
- Baldisserotto B (2002) *Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura*. Ed. UFSM, Santa Maria.
- Barbosa ACDR, Galzerani F, Corrêa TC, Galetti Jr. PM, Hatanaka T (2008) Description of novel microsatellite loci in the Neotropical fish *Prochilodus argenteus* and cross-amplification in *P. costatus* and *P. lineatus*. *Genetics and Molecular Biology* **31**, 357-360.
- Barcarolli IF, Martinez CBR (2004) Effects of Aluminum in Acidic Water on Hematological and Physiological Parameters of the Neotropical Fish *Leporinus macrocephalus* (Anostomidae). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **72**, 639-646.
- Barcellos LJG, Wassermann GF, Scott AP, *et al.* (2001) Steroid Profiles in Cultured Female Jundiá, the Siluridae *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pisces Teleostei), during the First Reproductive Cycle. *General and Comparative Endocrinology* **121**, 325-332.
- Barcellos LJG, Wassermann GF, Scott AP, *et al.* (2002) Plasma steroid concentrations in relation to the reproductive cycle of cultured male *Rhamdia quelen*. *Journal of Fish Biology* **61**, 751-763.
- Batista JS, Alves-Gomes JA (2006) Phylogeography of *Brachyplatystoma rousseauxii* (Siluriformes - Pimelodidae) in the Amazon Basin offers preliminary evidence for the first case of homing” for an Amazonian migratory catfish. *Genetics and Molecular Research* **5**, 723-740.
- Baxter RM (1977) Environmental effects of dams and impoundments. *An. Rev. Ecol. Syst.* **8**, 255-283.

- Bazzoli N, Rizzo E (1995) Reabsorção de folículos atrésicos em *Astyanax bimaculatus lacustris* (Pisces, Teleostei) mantidos em confinamento. *Revista Bios* **2**, 37-41.
- Beerli P, Felsenstein J (1999) Maximum-Likelihood Estimation of Migration Rates and Effective Population Numbers in Two Populations Using a Coalescent Approach. *Genetics* **152**, 763-773.
- Beerli P, Felsenstein J (2001) Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in n subpopulations by using a coalescent approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 4563-4568.
- Beheregaray LB, MÖLLer LM, Schwartz TS, Chao NL, Caccone A (2004) Microsatellite markers for the cardinal tetra *Paracheirodon axelrodi*, a commercially important fish from central Amazonia. *Molecular Ecology Notes* **4**, 330-332.
- Benejam L, Benito J, García-Berthou E (2010) Decreases in Condition and Fecundity of Freshwater Fishes in a Highly Polluted Reservoir. *Water, Air, & Soil Pollution* **210**, 231-242.
- Bernet D, Schmidt H, Meier W, Burkhardt-Holm P, Wahli T (1999) Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases* **22**, 25-34.
- Bianchi G, Gislason H, Graham K, *et al.* (2000) Impact of fishing on size composition and diversity of demersal fish communities. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil* **57**, 558-571.
- Bogliolo L, Brasileiro Filho G (2006) *Bogliolo patologia* Guanabara-Koogan.
- Bromley PJ, Ravier C, Witthames PR (2000) The influence of feeding regime on sexual maturation, fecundity and atresia in first-time spawning turbot. *Journal of Fish Biology* **56**, 264-278.
- Brown JE, Stepien CA (2009) Invasion genetics of the Eurasian round goby in North America: tracing sources and spread patterns. *Molecular Ecology* **18**, 64-79.
- Brusle J, Anadon G (1996) The structure and function of fish liver. *Fish Morphology Science Publishers*, 77-93.
- Buckup PA, Menezes NA, Ghazzi MS (2007) Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil (ed. Nacional M), Rio de Janeiro.

- Camargo MMP, Martinez CBR (2006) Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* submitted to in situ tests in an urban stream in southern Brazil. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **21**, 61-69.
- Carreras-Carbonell J, Macpherson E, Pascual M (2006) Population structure within and between subspecies of the Mediterranean triplefin fish *Tripterygion delaisi* revealed by highly polymorphic microsatellite loci. *Molecular Ecology* **15**, 3527-3539.
- Carvalho DC, Oliveira DAA, Sampaio I, Beheregaray LB (2009) Microsatellite markers for the Amazon peacock bass (*Cichla piquiti*). *Molecular Ecology Resources* **9**, 239-241.
- Cazenave J, Bacchetta C, Parma MJ, Scarabotti PA, Wunderlin DA (2009) Multiple biomarkers responses in *Prochilodus lineatus* allowed assessing changes in the water quality of Salado River basin (Santa Fe, Argentina). *Environmental Pollution* **157**, 3025-3033.
- CEMIG (2012) Peixe Vivo, bacia do rio Grande, acessado em 12 junho de 2012.
- Chaves-Pozo E, Liarte S, Vargas-Chacoff L, *et al.* (2007) 17Beta-estradiol triggers postspawning in spermatogenically active gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) males. *Biological Reproduction* **76**, 142-148.
- Chevolot M, Ellis JR, Hoarau G, *et al.* (2006) Population structure of the thornback ray (*Raja clavata* L.) in British waters. *Journal of Sea Research* **56**, 305-316.
- Corbacho C, Sánchez JM (2001) Patterns of species richness and introduced species in native freshwater fish faunas of a Mediterranean-type basin: the Guadiana River (southwest Iberian Peninsula). *Regulated Rivers: Research & Management* **17**, 699-707.
- Dakin EE, Avise JC (2004) Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* **93**, 504-509.
- De Mérona B, Albert P (1999) Ecological monitoring of fish assemblages downstream of a hydroelectric dam in French Guiana (South America). *Regulated Rivers: Research & Management* **15**, 339-351.
- Devlin RH, Nagahama Y (2002) Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* **208**, 191-364.
- Domingos F, Thomé R, Arantes F, *et al.* (2012a) Assessment of spermatogenesis and plasma sex steroids in a seasonal breeding teleost: a comparative study in an

area of influence of a tributary, downstream from a hydroelectric power dam, Brazil. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1709-1719.

- Domingos F, Thomé R, Arantes F, *et al.* (2012b) Assessment of spermatogenesis and plasma sex steroids in a seasonal breeding teleost: a comparative study in an area of influence of a tributary, downstream from a hydroelectric power dam, Brazil. *Fish Physiology and Biochemistry* **38**, 1709-1719.
- Drevnick PE, Sandheinrich MB, Oris JT (2006) Increased ovarian follicular apoptosis in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to dietary methylmercury. *Aquatic Toxicology* **79**, 49-54.
- Dugan P, Barlow C, Agostinho A, *et al.* (2010) Fish Migration, Dams, and Loss of Ecosystem Services in the Mekong Basin. *AMBIO: A Journal of the Human Environment* **39**, 344-348.
- Earl D, vonHoldt B (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* **4**, 359-361.
- Fausto AM, Picchiatti S, Taddei AR, *et al.* (2004) Formation of the egg envelope of a teleost, *Dicentrarchus labrax*: immunochemical and cytochemical detection of multiple components. *Anatomy and Embryology* **208**, 43-53.
- Figueiredo-Fernandes A, Ferreira-Cardoso JV, Garcia-Santos S, *et al.* (2007) Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper. *Pesquisa Veterinária Brasileira* **27**, 103-109.
- Fishelson L (2006) Cytomorphological alterations of the thymus, spleen, head-kidney, and liver in cardinal fish (Apogonidae, Teleostei) as bioindicators of stress. *Journal of Morphology* **267**, 57-69.
- Foresti F, Toledo-Filho SA, Almeida-Toledo LF (1992) Manejo de recursos genéticos em populações naturais. In: *Situação atual e perspectivas da Ictiologia no Brasil* (eds. Agostinho AA, Benedito-Cecílio E), pp. 58-67. Editora da Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002) *Introduction to conservation genetics* University Press., Cambridge.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2008) *Fundamentos da Genética da Conservação* SBG, Ribeirão Preto.
- Fraser DJ, Duchesne P, Bernatchez L (2005) Migratory charr schools exhibit population and kin associations beyond juvenile stages. *Molecular Ecology* **14**, 3133-3146.



FURNAS (2011) Parque Gerador. Acessado em maio de 2013.

Furuya VRB, Hayashi C, Furuya WM, Soares CM, Galdioli EM (2008) Influência de plâncton, dieta artificial e sua combinação, sobre o crescimento e sobrevivência de larvas de curimatá (*Prochilodus lineatus*). *Acta Scientiarum. Animal Sciences* **21**, 699-703.

Gaggiotti OE, Bekkevold D, Jørgensen HBH, *et al.* (2009) Disentangling the effects of evolutionary, demographic, and environmental factors influencing genetic structure of natural populations: Atlantic herring as a case study. *Evolution* **63**, 2939-2951.

Garcez R, Calcagnotto D, De Almeida-Toledo LF (2011) Population structure of the migratory fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes) from rio Grande basin (Brazil), an area fragmented by dams. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* **21**, 268-275.

Garcia-Lopez A, Couto E, Canario AV, Sarasquete C, Martinez-Rodriguez G (2007) Ovarian development and plasma sex steroid levels in cultured female Senegalese sole *Solea senegalensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology A* **146**, 342-354.

Gazola R, Borella MI (1997) Plasma testosterone and 11-ketotestosterone levels of male pacu *Piaractus mesopotamicus* (Cypriniformes, Characidae). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **30**, 1485-1487.

Gehrke PC, Gilligan DM, Barwick M (2002) Changes in fish communities of the Shoalhaven River 20 years after construction of Tallowa Dam, Australia. *River Research and Applications* **18**, 265-286.

Godinho A, Kynard B, Godinho H (2007) Migration and spawning of female surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*, Pimelodidae) in the São Francisco river, Brazil. *Environmental Biology of Fishes* **80**, 421-433.

Godinho AL, Kynard B (2006) Migration and Spawning of Radio-Tagged Zulega *Prochilodus argenteus* in a Dammed Brazilian River. *Transactions of the American Fisheries Society* **135**, 811-824.

Godinho HP, Godinho AL (1994) Ecology and conservation of fish in southeastern Brazilian river basins submitted to hydroelectric impoundments. *Acta Limnologica Brasiliensia* **5**, 187-197.

Godoy MP (1959) Age, growth, Sexual Maturity, Behaviour, Migration, Tagging and Transplantation of the Curimatá (*Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881) of the Mogi Guassu River, São Paulo State, Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **31**, 447-478.

- Godoy MP (1972) Brazilian tagging experiments, fishes migration, and upper Paraná river basin eco-system. *Revista Brasileira de Biologia* **32**, 473-485.
- Godoy MP (1975) *Peixes do Brasil, sub-ordem Characoidei da bacia do rio Mogi-Guaçu* Editora Franciscana, Piracicaba, SP. .
- Gosset C, Rives J, Labonne J (2006) Effect of habitat fragmentation on spawning migration of brown trout (*Salmo trutta* L.). *Ecology of Freshwater Fish* **15**, 247-254.
- Groff AA (2008) O tambaqui (*Colossoma macropomum*) eo pirarucu (*Arapaima gigas*) como organismos bioindicadores do efeito genotóxico da radiação ultravioleta (UVA e UVB).
- Gundersen DT, Miller R, Mischler A, *et al.* (2000) Biomarker response and health of polychlorinated biphenyl-and chlordane-contaminated paddlefish from the Ohio River Basin, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry* **19**, 2275-2285.
- Haider SG (2007) Leydig cell steroidogenesis: unmasking the functional importance of mitochondria. *Endocrinology* **148**, 2581-2582.
- Hatanaka T, Galetti Jr. PM (2003) RAPD markers indicate the occurrence of structured populations in a migratory freshwater fish species. *Genetics and Molecular Biology* **26**, 19-25.
- Hatanaka T, Henrique-Silva F, Galetti P (2006) Population Substructuring in a Migratory Freshwater Fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the São Francisco River. *Genetica* **126**, 153-159.
- Heggenes J, Røed KH (2006) Do dams increase genetic diversity in brown trout (*Salmo trutta*)? Microgeographic differentiation in a fragmented river. *Ecology of Freshwater Fish* **15**, 366-375.
- Hirzinger V, Keckeis H, Nemeschkal HL, Schiemer F (2004) The importance of inshore areas for adult fish distribution along a free-flowing section of the Danube, Austria. *River Research and Applications* **20**, 137-149.
- Hoffmann AC, Orsi ML, Shibatta OA (2005) Diversidade de peixes do reservatório da UHE Escola Engenharia Mackenzie (Capivara), Rio Paranapanema, bacia do alto rio Paraná, Brasil, e a importância dos grandes tributários na sua manutenção. *Iheringia. Série Zoológica* **95**, 319-325.
- Holleley CE, Geerts PG (2009) Multiplex Manager 1.0: a cross-platform computer program that plans and optimizes multiplex PCR. *BioTechniques* **46**, 511-517.

- Hrbek T, Farias IP, Crossa M, *et al.* (2005) Population genetic analysis of *Arapaima gigas*, one of the largest freshwater fishes of the Amazon basin: implications for its conservation. *Animal Conservation* **8**, 297-308.
- James R, Sampath K (2002) Effect of different feeds on growth and fecundity in ornamental fish, *Betta splendens* (Regan). *Indian Journal of Fisheries* **49**, 279-284.
- Jost LOU (2008) GST and its relatives do not measure differentiation. *Molecular Ecology* **17**, 4015-4026.
- Keeney DB, Heupel MR, Hueter RE, Heist EJ (2005) Microsatellite and mitochondrial DNA analyses of the genetic structure of blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*) nurseries in the northwestern Atlantic, Gulf of Mexico, and Caribbean Sea. *Molecular Ecology* **14**, 1911-1923.
- Kitanishi S, Yamamoto T, Edo K, Higashi S (2012) Influences of habitat fragmentation by damming on the genetic structure of masu salmon populations in Hokkaido, Japan. *Conservation Genetics*, 1-10.
- Koel TM (2004) Spatial Variation in Fish Species Richness of the Upper Mississippi River System. *Transactions of the American Fisheries Society* **133**, 984-1003.
- Koskinen M, Piironen J, Primmer C (2001) Interpopulation genetic divergence in European grayling (*Thymallus thymallus*, Salmonidae) at a microgeographic scale: implications for conservation. *Conservation Genetics* **2**, 133-143.
- Koskinen MT, Piironen J, Sundell P, Primmer CR (2002) Spatiotemporal evolutionary relationships and genetic assessment of stocking effects in grayling (*Thymallus thymallus*, Salmonidae). *Ecology Letters* **5**, 193-205.
- Kumakura N, Okuzawa K, Gen K, Kagawa H (2003) Effects of gonadotropin-releasing hormone agonist and dopamine antagonist on hypothalamus–pituitary–gonadal axis of pre-pubertal female red seabream (*Pagrus major*). *General and Comparative Endocrinology* **131**, 264-273.
- Kummu M, Sarkkula J (2008) Impact of the Mekong River Flow Alteration on the Tonle Sap Flood Pulse. *AMBIO: A Journal of the Human Environment* **37**, 185-192.
- Langiano VdC, Martinez CBR (2008) Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **147**, 222-231.

- Larinier M, Marmulla G (2004) Fish passes: types, principles and geographical distribution - an overview, 183-207.
- Lowe-McConnell RH (1987) *Ecological studies in tropical fish communities* Cambridge University Press, Cambridge.
- Lubzens E, Young G, Bobe J, Cerda J (2010) Oogenesis in teleosts: how eggs are formed. *General and Comparative Endocrinology* **165**, 367-389.
- Malarkey DE, Johnson K, Ryan L, Boorman G, Maronpot RR (2005) New Insights into Functional Aspects of Liver Morphology. *Toxicologic Pathology* **33**, 27-34.
- Manel S, Schwartz MK, Luikart G, Taberlet P (2003) Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology and Evolution* **18**, 189-197.
- Mantel N (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* **27**, 209-220.
- Marcano D, Cardillo E, Rodriguez C, *et al.* (2007) Seasonal reproductive biology of two species of freshwater catfish from the Venezuelan floodplains. *General and Comparative Endocrinology* **153**, 371-377.
- Martinez C, Cólus I (2002) Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. *a bacia do rio Tibagi. Londrina, Parana*, 551-577.
- Martins YS, Arantes FP, Sato Y, *et al.* (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* **93**, 48-56.
- Matsubara T, Sawano K (1995) Proteolytic cleavage of vitellogenin and yolk proteins during vitellogenin uptake and oocyte maturation in barfin flounder (*Verasper moseri*). *Journal of Experimental Zoology* **272**, 34-45.
- Matthews WJ, Marsh-Matthews E (2007) Extirpation of Red Shiner in Direct Tributaries of Lake Texoma (Oklahoma-Texas): A Cautionary Case History from a Fragmented River-Reservoir System. *Transactions of the American Fisheries Society* **136**, 1041-1062.
- Melo DC, Oliveira DAA, Seerig A, Carvalho DC (2008) Practical application of microsatellite markers in genetic characterization and identification of stocks of tilapia. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* **32**, 220-224.

- Minakawa N, Kraft GF (2005) Homing behaviour of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) within an off-channel habitat. *Ecology of Freshwater Fish* **14**, 197-201.
- Miranda ACL, Bazzoli N, Rizzo E, Sato Y (1999) Ovarian follicular atresia in two teleost species: a histological and ultrastructural study. *Tissue and Cell* **31**, 480-488.
- Miura T, Higuchi M, Ozaki Y, Ohta T, Miura C (2006) Progesterone is an essential factor for the initiation of the meiosis in spermatogenic cells of the eel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 7333-7338.
- Miwa T, Yoshizaki G, Naka H, *et al.* (2001) Ovarian steroid synthesis during oocyte maturation and ovulation in Japanese catfish (*Silurus asotus*). *Aquaculture* **198**, 179-191.
- Morais R, Thomé R, Lemos F, 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.
- Morita K, Yamamoto S (2002) Effects of Habitat Fragmentation by Damming on the Persistence of Stream-Dwelling Charr Populations. *Conservation Biology* **16**, 1318-1323.
- Muchlisin ZA, Musman M, Fadli N, Nor Siti-Azizah M (2011) Fecundity and spawning frequency of *Rasbora tawarensis* (Pisces: Cyprinidae) an endemic species from Lake Laut Tawar, Aceh, Indonesia. *AACL Bioflux* **4**, 273-279.
- Munakata A, Amano M, Ikuta K, Kitamura S, Aida K (2001) The effects of testosterone on upstream migratory behavior in masu salmon, *Oncorhynchus masou*. *General and Comparative Endocrinology* **122**, 329-340.
- Nagahama Y, Yamashita M (2008) Regulation of oocyte maturation in fish. *Development, Growth and Differentiation* **50 Suppl 1**, 195-219.
- Nagahama Y, Yoshikuni M, Yamashita M, Tokumoto T, Katsu Y (1995) Regulation of oocyte growth and maturation in fish. *Current Topics in Developmental Biology* **30**, 103-145.
- Nahum R, Beyth Y, Chun SY, Hsueh AJ, Tsafiriri A (1996) Early onset of deoxyribonucleic acid fragmentation during atresia of preovulatory ovarian follicles in rats. *Biology of Reproduction* **55**, 1075-1080.

- Narum SR, Boe S, Moran P, Powell M (2006) Small-Scale Genetic Structure and Variation in Steelhead of the Grande Ronde River, Oregon, USA. *Transactions of the American Fisheries Society* **135**, 979-986.
- Nelson JS (2006) *Fishes of the world*, 4th edn. Hoboken: John Wiley.
- Neville H, Dunham J, Peacock M (2006a) Landscape attributes and life history variability shape genetic structure of trout populations in a stream network. *Landscape Ecology* **21**, 901-916.
- Neville HM, Isaak DJ, Dunham JB, Thurow RF, Rieman BE (2006b) Fine-scale natal homing and localized movement as shaped by sex and spawning habitat in Chinook salmon: insights from spatial autocorrelation analysis of individual genotypes. *Molecular Ecology* **15**, 4589-4602.
- Nilsson C, Berggren K (2000) Alterations of Riparian Ecosystems Caused by River Regulation. *BioScience* **50**, 783-792.
- Ninhaus-Silveira A, Foresti F, de Azevedo A (2006) Structural and ultrastructural analysis of embryonic development of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836)(Characiforme; Prochilodontidae). *Zygote-The Biology of Gametes and Early Embryos* **14**, 217-230.
- Novaro AJ, Redford KH, Bodmer RE (2000) Effect of Hunting in Source-Sink Systems in the Neotropics. *Conservation Biology* **14**, 713-721.
- Ohta T, Miyake H, Miura C, *et al.* (2007) Follicle-stimulating hormone induces spermatogenesis mediated by androgen production in Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Biological Reproduction* **77**, 970-977.
- Oliveira E, Minte-Vera C, Goulart E (2005) Structure of fish assemblages along spatial gradients in a deep subtropical reservoir (Itaipu Reservoir, Brazil-Paraguay border). *Environmental Biology of Fishes* **72**, 283-304.
- Oyakama OT, Akama A, Mautari KC, Nolasco JC (2006) *Peixes de riachos da Mata Atlântica nas Unidades de Conservação do vale do rio Ribeira de Iguape no estado de São Paulo*. Editora Neotrópica, São Paulo.
- Pacheco M, Santos MA (2002) Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* **53**, 331-347.
- Parma MJ, Loteste A, Campana M, Bacchetta C (2007) Changes of hematological parameters in *Prochilodus lineatus*(Pisces, Prochilodontidae) exposed to sublethal concentration of cypermethrin. *Journal of Environmental Biology* **28**, 147-149.

- Paukert C, Rogers RS (2004) Factors Affecting Condition of Flannelmouth Suckers in the Colorado River, Grand Canyon, Arizona. *North American Journal of Fisheries Management* **24**, 648-653.
- Peakall R, Smouse P (2012) GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics*.
- Pelicice FM, Agostinho AA (2008) Fish-Passage Facilities as Ecological Traps in Large Neotropical Rivers. *Conservation Biology* **22**, 180-188.
- Penczak T, Agostinho AA, Gomes LC, Latini JD (2009) Impacts of a reservoir on fish assemblages of small tributaries of the Corumbá river, Brazil. *River Research and Applications* **25**, 1013-1024.
- Pereira LHG, Foresti F, Oliveira C (2009) Genetic structure of the migratory catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) suggests homing behaviour. *Ecology of Freshwater Fish* **18**, 215-225.
- Perini VR, Paschoalini AL, Cruz CKF, *et al.* (2013) Profiles of sex steroids, fecundity and spawning of a migratory characiform fish from the Paraguay–Paraná basin: a comparative study in a three-river system. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1-12.
- Petriere M (1996) Fisheries in large tropical reservoirs in South America. *Lakes & Reservoirs: Research & Management* **2**, 111-133.
- Petry AC, Agostinho AA, Gomes LC (2003) Fish assemblages of tropical floodplain lagoons: exploring the role of connectivity in a dry year. *Neotropical Ichthyology* **1**, 111-119.
- Piferrer F, Blazquez M (2005) Aromatase distribution and regulation in fish. *Fish Physiology and Biochemistry* **31**, 215-226.
- Piry S, Alapetite A, Cornuet J-M, *et al.* (2004) GENECLASS2: A Software for Genetic Assignment and First-Generation Migrant Detection. *Journal of Heredity* **95**, 536-539.
- Ponton D, Vauchel P (1998) Immediate downstream effects of the Petit-Saut dam on young neotropical fish in a large tributary of the Sinnamary River (French Guiana, South America). *Regulated Rivers: Research & Management* **14**, 227-243.
- Pottinger TG (1999) The impact of stress on animal reproductive activities. *Stress physiology in animals*. Sheffield, England. Sheffield Academic Press, 130-177.

- Prado PS, Souza CC, Bazzoli N, Rizzo E (2011) Reproductive disruption in lambari *Astyanax fasciatus* from a Southeastern Brazilian reservoir. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **74**, 1879-1887.
- Primmer CR, Veselov AJ, Zubchenko A, *et al.* (2006) Isolation by distance within a river system: genetic population structuring of Atlantic salmon, *Salmo salar*, in tributaries of the Varzuga River in northwest Russia. *Molecular Ecology* **15**, 653-666.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics* **155**, 945-959.
- Rajasilta M, Paranko J, Laine PT (1997) Reproductive characteristics of the male herring in the northern Baltic Sea. *Journal of Fish Biology* **51**, 978-988.
- Ramella MS, Kroth MA, Meurer S, *et al.* (2006) Genetic variability in four fish species (*Pimelodus maculatus*, *Prochilodus lineatus*, *Salminus brasiliensis* and *Steindachneridion scripta*) from Uruguay River basin. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **49**, 589-598.
- Rand GM (1995) *Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environment fate, and risk assessment* Taylor & Francis.
- Revaldaves E, Renesto E, Machado MFPS (1997) Genetic variability of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) in the upper Paraná river. *Brazilian Journal of Genetics* **20**.
- Ribeiro VMA, Santos GB, Bazzoli N (2007) Reproductive biology of *Steindachnerina insculpta* (Fernandez-Yépez) (Teleostei, Curimatidae) in Furnas reservoir, Minas Gerais, Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia* **24**, 71-76.
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* **43**, 223-225.
- Rizzo E, Bazzoli N (1995) Follicular atresia in curimatá-pioa *Prochilodus affinis* Reinhardt, 1874 (Pisces, Characiformes) *Revista Brasileira de Biologia* **55**, 697-703.
- Rocha E, Rocha MJ, Monteiro R (2003) Seasonal changes in fish hepatocytes and correlations with the endocrine system. *Fish adaptations. Science Publishers, Enfield, NH, and Plymbridge Distributors Ltd., Plymouth*, 383-403.
- Romagosa E, Souza BE, Sanches EA, Baggio DM, Bombardelli RA (2010) Sperm motility of *Prochilodus lineatus* in relation to dilution rate and temperature of the activating medium. *Journal of Applied Ichthyology* **26**, 678-681.



- Rooker JR, Secor DH, De Metrio G, *et al.* (2008) Natal Homing and Connectivity in Atlantic Bluefin Tuna Populations. *Science* **322**, 742-744.
- Rosa RS, Lima FTC (2008) Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Biodiversidade e Florestas. Departamento de conservação da Biodiversidade In: *Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção* (eds. Machado AMM, Drummond GM, Paglia AP). Biodiversidade, Brasília.
- Rousset F (2008) genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* **8**, 103-106.
- Saidapur KS (1978) Follicular atresia in the ovaries of nonmammalian vertebrates. *International Review of Cytology* **54**, 225-244.
- Sanches A, Galetti Jr P (2007) Genetic evidence of population structuring in the neotropical freshwater fish *Brycon hilarii* (Valenciennes, 1850). *Brazilian Journal of Biology* **67**, 889-895.
- Sanches A, Galetti Jr PM, Galzerani F, *et al.* (2012) Genetic population structure of two migratory freshwater fish species (*Brycon orthotaenia* and *Prochilodus argenteus*) from the São Francisco River in Brazil and its significance for conservation. *Latin American Journal of Aquatic Research* **40**, 177-186.
- Santos HB, Thome RG, Arantes FP, *et al.* (2008) Ovarian follicular atresia is mediated by heterophagy, autophagy, and apoptosis in *Prochilodus argenteus* and *Leporinus taeniatus* (Teleostei: Characiformes). *Theriogenology* **70**, 1449-1460.
- Sato Y, Bazzoli N, Rizzo E, Boschi MB, Miranda MOT (2005) Influence of the Abaeté River on the reproductive success of the neotropical migratory teleost *Prochilodus argenteus* in the São Francisco River, downstream from the Três Marias Dam, southeastern Brazil. *River Research and Applications* **21**, 939-950.
- Sato Y, Sampaio EV (2005) A ictiofauna na região do alto São Francisco, com ênfase no reservatório de Trê Marias, Minas Gerais. In: *Ecologia de reservatórios* (eds. Nogueira MG, Henry R, Jorcin E), pp. 251-274. Rima, São Carlos.
- Schulz R, Miura T (2002) Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish Physiology and Biochemistry* **26**, 43-56.
- Schulz RW, de Franca LR, Lareyre JJ, *et al.* (2010) Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology* **165**, 390-411.
- Schwaiger J, Wanke R, Adam S, *et al.* (1997) The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* **6**, 75-86.

- Senthilkumaran B, Yoshikuni M, Nagahama Y (2004) A shift in steroidogenesis occurring in ovarian follicles prior to oocyte maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology* **215**, 11-18.
- Simonato JD, Guedes CLB, Martinez CBR (2008) Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **69**, 112-120.
- Spruell P, Hemmingsen AR, Howell PJ, Kanda N, Allendorf FW (2003) Conservation genetics of bull trout: Geographic distribution of variation at microsatellite loci. *Conservation Genetics* **4**, 17-29.
- Stahl G (1987) Genetic population structure of Atlantic salmon. In: *Population Genetics and Fishery Management* (eds. Ryman N, Utter F), pp. 121-140. University of Washington Press, Seattle.
- Suzuki HI, Agostinho AA, Winemiller KO (2000) Relationship between oocyte morphology and reproductive strategy in loriciid catfishes of the Paraná River, Brazil. *Journal of Fish Biology* **57**, 791-807.
- Suzuki IH, Agostinho AA (1997) Reprodução de peixes do reservatório de Segredo. In: *Reservatório de Segredo: bases ecológicas para o manejo* (eds. Agostinho AA, Gomes LC), pp. 161-182. EDUEM, Maringá.
- Suzuki Y, Takashima F, Hibiya T (1995) An Atlas of Fish Histology: Normal and Pathological Features. *Vascular System*, Kodansha Ltd., Tokyo, 72-87.
- Tautz D (1989) Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* **17**, 6463-6471.
- Thomé RG, Domingos FFT, Santos HB, *et al.* (2012) Apoptosis, cell proliferation and vitellogenesis during the folliculogenesis and follicular growth in teleost fish. *Tissue and Cell* **44**, 54-62.
- Thophon S, Kruatrachue M, Upatham E, *et al.* (2003) Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. *Environmental Pollution* **121**, 307-320.
- Van Dyk JC, Pieterse GM, van Vuren JHJ (2007) Histological changes in the liver of *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) after exposure to cadmium and zinc. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **66**, 432-440.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* **4**, 535-538.

- Vaz MM (2000) *Guia ilustrado de peixes da bacia do Rio Grande* CEMIG/CETEC, Belo Horizonte.
- Vazzoler AEA (1996) *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. EDUEM, Maringá.
- Viveiros A, Godinho H (2009) Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. *Fish Physiology and Biochemistry* **35**, 137-150.
- Ward AJW, Hart PJB (2003) The effects of kin and familiarity on interactions between fish. *Fish and Fisheries* **4**, 348-358.
- Ward AJW, Webster MM, Magurran AE, Currie S, Krause J (2009) Species and population differences in social recognition between fishes: a role for ecology? *Behavioral Ecology* **20**, 511-516.
- Wasko AP, Galetti PM (2002) RAPD analysis in the Neotropical fish <i>Brycon lundii</i>: genetic diversity and its implications for the conservation of the species. *Hydrobiologia* **474**, 131-137.
- Weltzien FA, Andersson E, Andersen O, Shalchian-Tabrizi K, Norberg B (2004) The brain-pituitary-gonad axis in male teleosts, with special emphasis on flatfish (Pleuronectiformes). *Comparative Biochemistry and Physiology A* **137**, 447-477.
- Winemiller KO (1989) Patterns of variation in life history among South American fishes in seasonal environments. *Oecologia* **81**, 225-241.
- Winkaler E, Silva A, Galindo H, CBR M (2001) Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. *Acta Scientiarum* **23**, 507-514.
- Wirth T, Bernatchez L (2001) Genetic evidence against panmixia in the European eel. *Nature* **409**, 1037-1040.
- Wood AW, Kraak GVD (2003) Yolk proteolysis in rainbow trout oocytes after serum-free culture: Evidence for a novel biochemical mechanism of atresia in oviparous vertebrates. *Molecular Reproduction and Development* **65**, 219-227.
- Wood AW, Van Der Kraak G (2002) Inhibition of apoptosis in vitellogenic ovarian follicles of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by salmon gonadotropin, epidermal growth factor, and 17 $\beta$ -estradiol. *Molecular Reproduction and Development* **61**, 511-518.

- Wood AW, Van Der Kraak GJ (2001) Apoptosis and Ovarian Function: Novel Perspectives from the Teleosts. *Biology of Reproduction* **64**, 264-271.
- Yamada H, Satoh R, Ogoh M, *et al.* (2002) Circadian changes in serum concentrations of steroids in Japanese char *Salvelinus leucomaenis* at the stage of final maturation. *Zoological Science* **19**, 891-898.
- Yazbeck GM, Kalapothakis E (2007) Isolation and characterization of microsatellite DNA in the piracema fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes). *Genetic Molecular Research* **6**, 1026-1034.
- Zaniboni-Filho E, Nuñez APO, Reynalte-Tataje DA, Serafini RL (2009) Water pH and *Prochilodus lineatus* larvae survival. *Fish Physiology and Biochemistry* **35**, 151-155.