

JONAS ELOI DE VASCONCELOS FILHO

Tomografia computadorizada aplicada a otólitos em 3D

Recife

Fevereiro/2019



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOMETRIA E ESTATÍSTICA APLICADA

Tomografia computadorizada aplicada a otólitos em 3D

Tese a ser defendida adequada para obtenção do título de Doutor em Biometria e Estatística Aplicada, defendida e aprovada por unanimidade em 26/02/2019 pela comissão examinadora

Área de concentração: Biometria e Estatística Aplicada

Orientador: Dr. Paulo Duarte Neto
Coorientador: Dr. Claudio Delrieux

Recife

Fevereiro/2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

V331t Vasconcelos Filho, Jonas Eloi de.
Tomografia computadorizada aplicada a otólitos em 3D / Jonas Eloi de
Vasconcelos Filho. – Recife, 2019.
79 f.: il.

Orientador(a): Paulo José Duarte Neto.
Coorientador(a): Claudio Augusto Delrieux.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa
de Pós-Graduação em Biometria e Estatística Aplicada, Recife, BR-PE, 2019.
Inclui referências e apêndice(s).

1. Radiodensidade 2. Metabolismo 3. Estoques pesqueiros 4. Sulcus acusticus
I. Duarte Neto, Paulo José, orient. II. Delrieux, Claudio Augusto, coorient. III. Título

CDD 310

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais e irmãs, por abdicaram dos seus sonhos para eu pudesse construir os meus. Hoje, tudo que eu fiz e tudo que eu sou, eu devo a vocês. Amanhã, tudo que farei e serei, será para vocês. Muito obrigado!

Agradeço a Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pela concessão da bolsa de doutorado e pelo fomento ao projeto Análise de Imagens e Modelagem de Otólitos (AIMMO) (APQ-0178 - 1.08/14), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pelo financiamento via edital (457387/2014-9 e MCTI/CNPQ/Universal 14/2014) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE). Muito obrigado!

Agradeço ao meu orientador, professor Paulo Duarte, que me acompanhou e estimulou o meu crescimento durante esses últimos quatro anos. Por todo apoio, confiança, suporte, conselhos, amizade e conversas. Obrigado, chefe!

Agradezco al profesor Claudio Delrieux, de la Universidad Nacional del Sur (UNS), que me recibió gentilmente y me hizo sentir como si fuera un argentino durante este año en el exterior. Gracias! Aún agradezco a mis amigos que conocí en Argentina, no sólo dentro de la universidad, sino también fuera de ella. Ustedes han hecho de esta aventura, una de las mejores de mi vida. Gracias Félix y Vale, Noelia, Natália (Argentina), Deb, Patty, Bruna, Natália (Brasil), Raisla, Ilan, Judith, Letícia y Lauri.

Agradeço a professora Rosangela Lessa, pelas oportunidades, ensinamentos e confiança, não só durante os dois anos de mestrado, mas uma relação de amizade e profissional que perdura até hoje. Muito obrigado!

Agradeço aos meus amigos de departamento: Álvaro, Rodrigo, Edy, Neidinha, Glauce, Elaine, Kerolly, Fábio, Josafá, Íkaro, entre outros. Muito obrigado por todas as conversas, risos e cervejas. Muito obrigado! Agradeço aos meus amigos do departamento de Engenharia de Pesca: Leandro, Aninha, Andressa, Philippe, Aislan, Cáthia que estiveram juntos ao meu lado durante o mestrado e permaneceram assim durante o doutorado. Muito obrigado!

Agradeço ao professor Antonino, da Universidade Federal de Pernambuco, por colaborar com a pesquisa cedendo espaço e tempo para o uso do tomógrafo, assim como

a Daniel por toda a ajuda durante a aquisição das imagens tomográficas usadas neste trabalho. Muito obrigado!

Agradeço à toda equipe do Bioimpact (que são muitos), pela companhia, amizade e acolhimento. Não só na vida acadêmica, mas também na vida pessoal e momentos de descontração. Muito obrigado!

Agradeço aos meus amigos em Mossoró, que mesmo distantes se mantiveram presentes, descontraindo, apoiando e torcendo por mim. Muito Obrigado!

Agradeço a todos citados e não citados, esquecidos por descuido. Vocês contribuíram, mesmo que involuntariamente, para o resultado final deste trabalho. Muito obrigado!

Resumo

Otólitos são chamados de "black box" devido serem fontes de informações biológicas que podem ser aplicadas a avaliação e manejo de estoques pesqueiros. E, uma das maneiras de estudá-los é a partir de análises de imagens. Entretanto, as imagens em 2D já foram exaustivamente exploradas, apesar de perderem informações devido os otólitos serem um objeto em 3D. Assim, o presente estudo objetivou em aplicar tomografia computadorizada para analisar otólitos *sagittae*. A partir de 15 configurações dos parâmetros tomográficos, concluiu-se que voltagens médias (70 e 80 kV) com filtro de alumínio com 0,5 mm de espessura são ótimos para a aquisição de imagens tomográficas de otólitos. Em seguida, estas imagens foram exploradas internamente e externamente, com aplicações em contagens de anéis de crescimento, ontogenia, comparação entre espécies e, futuramente, segmentação em camadas usando a diferença de densidades. Ademais, verificou-se a presença de cavidades internas nos indivíduos do gênero *Thunnus*. Também foi analisada a curvatura da superfície dos otólitos, afim de testar a capacidade de discriminação entre espécies, variação ontogenética e como ferramenta de segmentação do *sulcus acusticus*. Constatou-se que os atributos de curvatura Mean e RMS podem ser usados como assinatura única por espécie, além de discernir picos e vales no relevo dos otólitos. E, a partir disto, relacionar sua complexidade com o metabolismo dos indivíduos, como reflexo da idade. Além disso, com a segmentação em 3D será possível descrever não só a área do *sulcus*, mas também sua profundidade e volume. Portanto, esta tese servirá como base para estudos futuros de análise de imagens em 3D de otólitos e algumas aplicação.

Palavras-chaves: Radiodensidade; metabolismo; estoques pesqueiros; *sulcus acusticus*.

Abstract

Otoliths are called "black box" because they are sources of biological information that can be applied to the evaluation and management of fish stocks. And, one of the ways to study them is from analysis of images. However, 2D images have already been extensively explored, despite losing information because otoliths are a 3D object. Thus, the present study aimed to apply computed tomography to analyze otoliths *sagittae*. From 15 configurations of the tomographic parameters, it was concluded that average voltages (70 and 80 kV) with aluminum filters with 0.5 mm thickness are optimal for the acquisition of tomographic images of otoliths. These images were then explored internally and externally, with applications in growth ring counts, ontogeny, species comparisons, and, in the future, layered segmentation using the density difference. In addition, internal cavities were found in individuals of the genus *Thunnus*. The curvature of the surface of the otoliths was also analyzed in order to test the capacity of discrimination between species, ontogenetic variation and as a tool of segmentation of *sulcus acusticus*. It was found that the Mean and RMS curvature attributes can be used as a unique signature by species, besides discerning peaks and valleys in the relief of otoliths. And, from this, relate its complexity to the metabolism of individuals, as a reflection of age. In addition, with 3D segmentation, it will be possible to describe not only the area of the *sulcus*, but also its depth and volume. Therefore, this thesis will serve as a basis for future studies of 3D image analysis of otoliths and some applications.

Palavras-chaves: Radiodensity; metabolism; fisheries stock; *sulcus acusticus*.

Lista de Figuras

- Figura 1 – Esquema ilustrativo do labirinto do ouvido interno de *Poecilia mexicana* destacando suas estruturas e morfologia interna. d, dorsal; la, lateral; r, rostral; L, *Lagena*; S, *Saccule*; U, *Utricule*. Escala = 1mm. 1
- Figura 2 – Reconstrução em 3D do ouvido interno e da bexiga natatória de *Etroplus maculatus*. a, anterior; d, dorsal; asc, canal semicircular anterior; hsc, canal semicircular horizontal; lag, lagena; lago, otólito *asteriscus*; ml, mácula *lagenae*; ms, mácula *sacculi*; mu, mácula *utriculi*; psc, canal semicircular posterior; sac, saccule; saco, otólito *sagittae*; sb, bexiga natatória. 3
- Figura 3 – Reconstrução em 3D do Aparato de Weber em *Lophiobagrus cyclurus*. (A) Vista lateral. (B) Vista superior. IE, ouvido interno; Ch, corda; Cl, claustrum; CNS, sistema nervoso central; NA, arco neural; Sc, scaphium; Tr, tripus. Escala = 300 μ m. 4
- Figura 4 – Células ciliares de *Etroplus maculatus*. A) Conjunto de cílios destacando a diferença de comprimento entre o *steriocilium* (células menores) e o *kinocilium* (cílios maiores). B) Destaque para o bulbo nervoso, responsável pela transdução mecanoelétrica entre o otólito e as células ciliares. 4
- Figura 5 – Otólito sagita de *Sebastes alutus* seccionado, cuja a idade estimada foi de 104 anos baseado na contagem das marcas anuais de crescimento. 5
- Figura 6 – Composição química de otólitos. Não está incluído C, O, N, Ra e Th. 6
- Figura 7 – Comparação do otólito *sagittae* do salmão do Atlântico (*Salmo salar*) selvagem (a) e cultivado (b). O otólito da esquerda é de aragonita e o da direita é 90% de vaterita, com exceção do núcleo (N). 8
- Figura 8 – Alguns dos diversos formatos que os otólitos *sagittae* pode assumir. 9
- Figura 9 – Estruturas anatômicas dos otólitos *sagittae*. 9
- Figure 10 – Procedure of tomographic images acquisition of sagittae otoliths. A) Sagitta otolith of *Haemulon plumierii* vertically positioned in a styrofoam cube. Scale bar = 10 mm. B) Tomographic image of respective otolith in grayscale after acquisition. Scale bar = 1 mm. C) Otolith on base support previous scanning. On graph, relationship of voltage and current supported by machine for three filters used (0.5, 1 and 1.5 mm). 15

- Figure 11 – Tomographic images of the inner face of the otoliths sagittae A) *Acanthocybium solandri*; B) *Acanthurus coeruleus*; C) *Haemulon plumieri*; D) *Opisthonema oglinum*; E) *Thunnus albacares* and F) *Thunnus obesus* using Meshlab, wherein red are denser regions and in blue the surfaces of lower density values. 18
- Figure 12 – Tomographic images of the external face of the otoliths sagittae A) *Acanthocybium solandri*; B) *Acanthurus coeruleus*; C) *Haemulon plumieri*; D) *Opisthonema oglinum*; E) *Thunnus albacares* and F) *Thunnus obesus* using Meshlab, wherein red are denser regions and in blue the surfaces of lower density values. 19
- Figure 13 – Diagnostic graphs of optimum set μ CT parameters evaluation. A) Mosaic of histograms used to segment inner part (gray curve) from external part (black curve). B) Example of detector response for the parameter set 80 kV with 0.5 mm aluminum filter of *Haemulon plumieri*. 20
- Figure 14 – Correlation analysis between the mean radiodensity of otoliths and fish length. A) *Acanthocybium solandri*; B) *Acanthurus coeruleus*; C) *Haemulon plumieri*; D) *Opisthonema oglinum*; E) *Thunnus obesus*. . . 23
- Figure 15 – Comparison of the average radiodensities of the otoliths of the species studied. AS = *A. solandri*; AC = *A. coeruleus*; HP = *H. plumieri*; OO = *O. oglinum*; TA = *T. albacares* and TO = *T. obesus*. The elements of the box diagram correspond to the lower bound of the *mustache* given by the difference between the first quartile and 1.5IQR, first quartile, median, third quartile, and the upper bound of the *textit mustache* is the sum of the third quartile and 1.5AIQ. IQR = interquartile range. . . 25
- Figure 16 – A sequence of images along the z -axis, illustrating the opening and closing of internal spaces found in individuals of *Thunnus albacares* and *T. obesus*. The black arrows indicate the regions where these processes occurred. 25

- Figure 17 – Medium radiodensity (continuous black line) of the five lines drawn from the nucleus (red point) to the edge of the otolith, simulating the reading axis of *Acanthurus coeruleus*. The figure is composed by overlapping the photograph of the sectioned blade with a metallographic saw and its respective digital representation made by micro-computed tomography, where the highest values of radiodensity are represented in red and the smallest in blue. The vertical and dashed lines correspond to the observed growth rings and indicate their respective Hounsfield unit peaks. This image correspond to individual AC43 (see Table 2 with eight rings counted using a microscope). 26
- Figure 18 – Average radiodensities of the five lines, simulating the reading axis of *Acanthurus coeruleus*. The numbers at the end of the curves refer to the observed ages (years). 27
- Figure 19 – Average radiodensities of the five lines, simulating the reading axis of *Haemulon plumierii*. The numbers at the end of the curves refer to the observed ages (years). 28
- Figure 20 – Average radiodensities of the five lines simulating the *O. oglinum*. The estimated ages for the three samples were less than one year and similar behaviors were observed for both curves of mean Hounsfield units. The vertical, gray and continuous line indicates the core distance of 150 μm , where the authors of the present study related to the change in growth phase explained by Lessa et al. (2008). In detail, an otolith sectioned of *O. oglinum* photographed with a scanning electron microscope, showing the growth rings. The two dashed lines indicate the two phases described by the authors (LESSA et al., 2008). 29
- Figura 21 – A representação gráfica da diferença entre as curvaturas 2D e 3D. a) Exemplo da curvatura em 2D no ponto p a partir do inverso do raio que o tangencia. b) Definição das curvaturas principais K_1 e K_2 utilizadas nas etapas de cálculo para a estimativa da curvatura no ponto p 32
- Figura 22 – As curvaturas Mean, Guassian e RMS do otólito de *Haemulon plumierii*, onde as cores na superfície estão representados nos respectivos histogramas. 35
- Figura 23 – Diagramas de caixa da comparação das distribuições das curvaturas Mean, Gaussian e RMS para cada imagem utilizada. As letras acima representam a diferença significativa. AS = *A. solandri*; AC = *A. coeruleus*; HP = *H. plumierii*; OO = *O. oglinum*; TA = *T. albacares* e TO = *T. obesus*. 39

- Figura 24 – Comparação das densidades de probabilidades dos atributos de curvaturas Mean, Gaussian e RMS. As imagens dos otólitos são referentes aos valores extremos. As linhas verticais e contínuas cinza indicam o zero no eixo x referentes as curvaturas Mean e Gaussian. AS = *A. solandri*; AC = *A. coeruleus*; HP = *H. plumierii*; OO = *O. oglinum*; TA = *T. albacares* e TO = *T. obesus*. 40
- Figura 25 – Comparação das densidades de probabilidades do atributo da curvatura Mean. A legenda de cada gráfico contém os rótulos de cada linha, juntamente com os contrastes (*post-hoc* de Nemenyi < 0.05), indicando diferença significativa entre as imagens. Os números ao lado do contraste são referentes às idades em anos dos respectivos indivíduos. A) *A. solandri*; B) *A. coeruleus*; C) *H. plumierii*; D) *O. oglinum*; E) *T. albacares* e F) *T. obesus*. 43
- Figura 26 – Comparação das densidades de probabilidades do atributo da curvatura Gaussian. A legenda de cada gráfico contém os rótulos de cada linha, juntamente com os contrastes (*post-hoc* de Nemenyi < 0.05), indicando diferença significativa entre as imagens. Os números ao lado do contraste são referentes às idades em anos dos respectivos indivíduos. A) *A. solandri*; B) *A. coeruleus*; C) *H. plumierii*; D) *O. oglinum*; E) *T. albacares* e F) *T. obesus*. 44
- Figura 27 – Comparação das densidades de probabilidades do atributo da curvatura RMS. A legenda de cada gráfico contém os rótulos de cada linha, juntamente com os contrastes (*post-hoc* de Nemenyi < 0.05), indicando diferença significativa entre as imagens. Os números ao lado do contraste são referentes às idades em anos dos respectivos indivíduos. A) *A. solandri*; B) *A. coeruleus*; C) *H. plumierii*; D) *O. oglinum*; E) *T. albacares* e F) *T. obesus*. 45
- Figura 28 – Segmentação usando os atributos de curvaturas Mean, Gaussian e RMS. As imagens Full Mean, Full Gaussian e Full RMS correspondem a todo espectro de valores. Os números acima das imagens são referentes aos filtros aplicados e seu respectivo resultado. 46

Lista de tabelas

Tabela 1 – Proporção de vaterita em otólitos <i>sagittae</i>	7
Table 2 – Lengths and observed ages of the individuals used in the present study. *Estimated ages from the already published growth curves (STÉQUERT; PANFILI; DEAN, 1996; LESSA et al., 2008; DUARTE-NETO; HIGA; LESSA, 2012; MCBRIDE; RICHARDSON; MAKI, 2008). TL = Total length; FL = Furcal length and SL = Standard length; HU = Hounsfield Units (mean \pm standard deviation).	16
Table 3 – Signal-to-noise ratio (mean \pm standard deviation) of otoliths <i>sagittae</i> . .	20
Table 4 – Paired comparison of radiodensities of otoliths by species using Kruskal- Wallis (Kruskal-Wallis = 25,403, df = 5, <i>p</i> -value < 0.05) followed by <i>post-hoc</i> Dunn test. AS = <i>A. solandri</i> ; AC = <i>A. coeruleus</i> ; HP = <i>H.</i> <i>plumierii</i> ; OO = <i>O. oglinum</i> ; TA = <i>T. albacares</i> and TO = <i>T. obesus</i> . Z = Dunn test statistic and its respective <i>p</i> -value.	24
Tabela 5 – Comprimentos e idades observadas dos indivíduos utilizados no pre- sente estudo. *Idades estimadas a partir das curvas de crescimento já publicados (STÉQUERT; PANFILI; DEAN, 1996; LESSA et al., 2008; DUARTE-NETO; HIGA; LESSA, 2012; MCBRIDE; RICHARDSON; MAKI, 2008). Ct = Comprimento total; Cf = Comprimento furcal e Cp = Comprimento padrão.	33
Tabela 6 – Descritores de histogramas de curvatura Mean para todas as imagens. Os valores foram ordenados a partir da idade crescente. Img = Imagem; Comp = Comprimento; Max = Máximo; Min = Mínimo; Med = Média; Medi = Mediana; DP = desvio padrão; Ass = Assimetria e Curt = Curtose.	36
Tabela 7 – Descritores de histogramas de curvatura Gaussian para todas as imagens. Os valores foram ordenados a partir da idade crescente. Img = Imagem; Comp = Comprimento; Max = Máximo; Min = Mínimo; Med = Média; Medi = Mediana; DP = desvio padrão; Ass = Assimetria e Curt = Curtose.	37

Tabela 8 –	Descritores de histogramas de curvatura RMS para todas as imagens. Os valores foram ordenados a partir da idade crescente. Img = Imagem; Comp = Comprimento; Max = Máximo; Min = Mínimo; Med = Média; Medi = Mediana; DP = desvio padrão; Ass = Assimetria e Curt = Curtose.	38
Tabela 9 –	p -valores dos testes de Nemenyi para a curvatura Mean. AS = <i>A. solandri</i> ; AC = <i>A. coeruleus</i> ; HP = <i>H. plumierii</i> ; OO = <i>O. oglinum</i> ; TA = <i>T. albacares</i> e TO = <i>T. obesus</i>	41
Tabela 10 –	p -valores dos testes de Nemenyi para a curvatura Gaussian. AS = <i>A. solandri</i> ; AC = <i>A. coeruleus</i> ; HP = <i>H. plumierii</i> ; OO = <i>O. oglinum</i> ; TA = <i>T. albacares</i> e TO = <i>T. obesus</i>	41
Tabela 11 –	p -valores dos testes de Nemenyi para a curvatura RMS. AS = <i>A. solandri</i> ; AC = <i>A. coeruleus</i> ; HP = <i>H. plumierii</i> ; OO = <i>O. oglinum</i> ; TA = <i>T. albacares</i> e TO = <i>T. obesus</i>	41

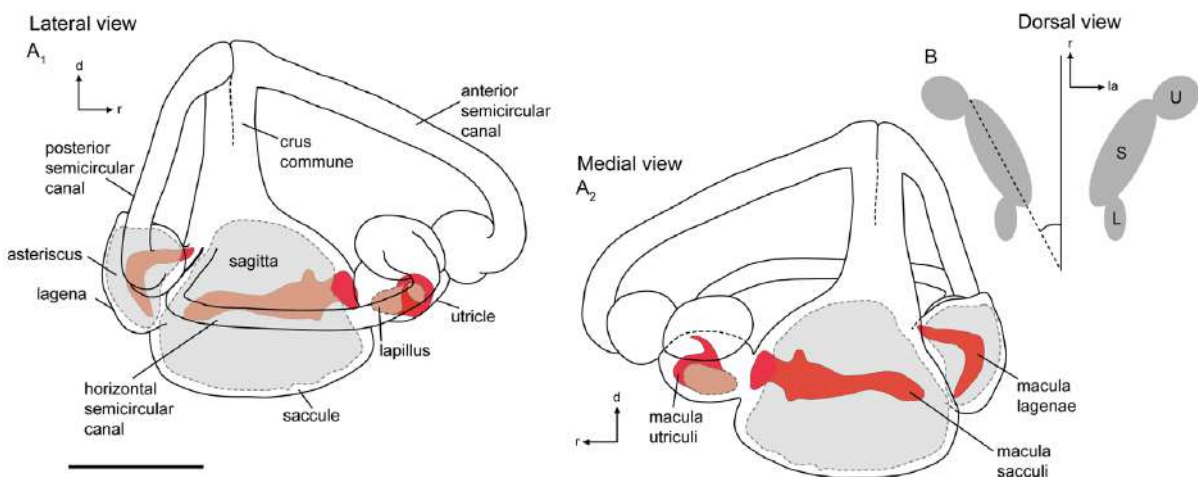
Sumário

1	Otólitos	1
1.1	Funções Biológicas	2
1.2	Idade e crescimento	4
1.3	Microquímica	6
1.4	Morfologia	8
1.5	Análise de Imagens	10
1.5.1	Imagens em 2D	10
1.5.2	Imagens em 3D	10
1.6	Objetivos	11
2	Peeling the otolith of fish: optimal parameterization for micro-CT scanning	12
2.1	Introduction	12
2.2	Material and Methods	14
2.2.1	Imaging	14
2.2.2	Calibration, Segmentation and Analysis	14
2.3	Results and Discussion	17
2.3.1	Protocol for the optimal acquisition	17
2.3.2	Exploring otolith density variation	21
2.4	Conclusions	30
3	Atributos das Curvaturas 3D de Otólitos	31
3.1	Introdução	31
3.2	Materiais e Métodos	32
3.3	Resultados e Discussão	34
3.4	Conclusão	46
4	Considerações Finais	47
	Referências Bibliográficas	48
	Apêndices	59
A	- Extração das coordenadas x, y e z	60
B	- Contagem dos anéis de crescimento assistida por tomografia	61
C	- Segmentação em 3D	64

1 Otólitos

Otólitos são concreções calcárias encontradas no labirinto do ouvido interno dos peixes ósseos (Figura 1) e são associados com as funções de audição, balanço e orientação (POPPER; RAMCHARITAR; CAMPANA, 2005). Estão conectados a um tecido sensorial, a mácula (SCHULZ-MIRBACH; HESS; PLATH, 2011), e imersos por endolinfa no interior de um compartimento labiríntico, onde a captação é feita através de estímulos mecânicos entre o otólito e células ciliares (*kinocilium*) (DUNKELBERGER; DEAN; WATABE, 1980; POPPER; HOXTER, 1984; POPPER; LU, 2000) e convertidas em impulsos elétricos. Estes compartimentos são chamados *sacculus*, *utricle* e *lagena*, onde cada um comporta um par de cada otólito denominado *sagitta*, *lapillus* e *asteriscus*, respectivamente (ASSIS, 2003; SCHULZ-MIRBACH; HESS; PLATH, 2011).

Figura 1 – Esquema ilustrativo do labirinto do ouvido interno de *Poecilia mexicana* destacando suas estruturas e morfologia interna. d, dorsal; la, lateral; r, rostral; L, *Lagena*; S, *Sacculi*; U, *Utricle*. Escala = 1mm.



Fonte: Schulz-Mirbach et al. (2011).

Algumas características particulares fazem dos otólitos uma ferramenta bastante útil na biologia pesqueira, como variação fenotípica espécie inter e intraespecífica (PLATT; POPPER, 1981), metabolismo inerte (MUGIYA; UCHIMURA, 1989), portanto não sofrem reabsorção. Estas propriedades são utilizadas na arqueologia (DISSPAIN; ULM; GILLANDERS, 2016), identificação de estoques pesqueiros (CADRIN; KERR; MARIANI,

2013; CASTONGUAY; SIMARD; GAGNON, 1991; BOLLES; BEGG, 2000; DEVRIES; GRIMES; PRAGER, 2002; DUARTE-NETO et al., 2008), estrutura populacional (JAVOR; LO; VETTER, 2011), estimativa de parâmetros biológicos (SANTANA et al., 2009), filogenia (ASSIS, 2003), ontogenia (CURIN-OSORIO; CUBILLOS; CHONG, 2012), ecologia alimentar, eventos de história de vida (SPONAUGLE, 2009a) e conectividade entre populações (BRADBURY et al., 2011).

Lombarte e Castellón (1991) mostraram como a forma do otólito é regulada pela espécie e, em menor grau, pelos fatores ambientais. Adicionalmente, Gaudie (1988) descreveu como a forma do otólito pode ser controlada pela forma da cápsula ótica e do crânio, e a marcação e descontinuidade no crescimento do otólito controlado pela mácula. Consequentemente, os estímulos fornecidos à mácula são provocados pelas variações das condições ambientais, como fotoperíodo, temperatura, e regime alimentar (LECOMTE-FINIGER, 1999; CARDINALE et al., 2004).

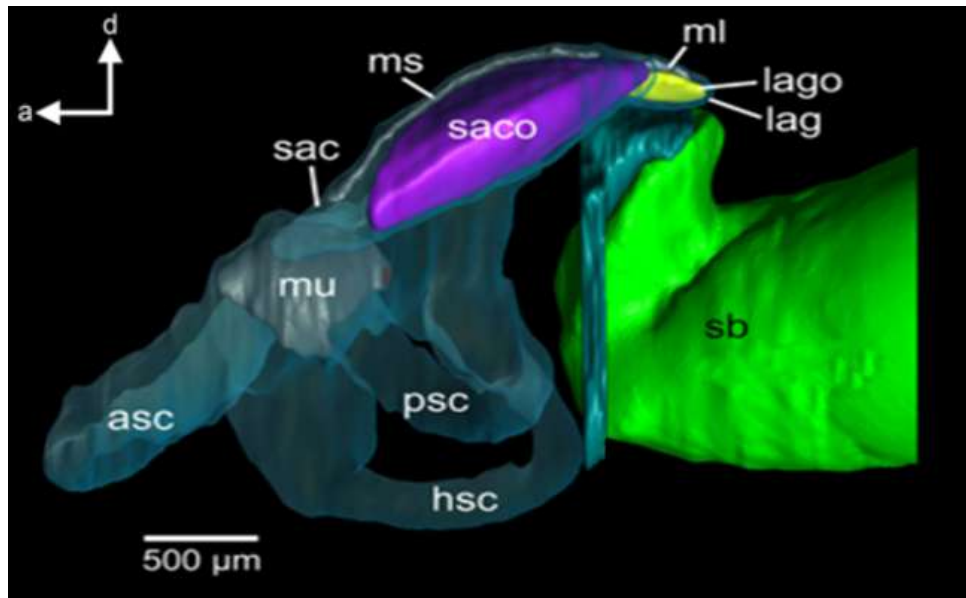
1.1 Funções Biológicas

O ouvido interno dos peixes teleósteos contém três canais semi-circulares e três pares de otólitos, formando o sistema auditivo e vestibular. Cada canal está preenchido por um líquido viscoso com propriedades iônicas chamado Endolinfa, e esta composição química é responsável pela transdução mecanoelétrica (*Mechanoelectrical transduction* - MET). Este processo é dado pelo transporte de íons de K^+ no interior da célula para o meio externo em troca da entrada de íons Na^+ , no momento em que as células ciliares se tocam (POPPER; LU, 2000).

Anteriormente, alguns trabalhos sugeriram que os otólitos *asteriscus* eram responsáveis pelo sistema vestibular, enquanto os *sagittae* e *lapillus* pela audição (POPPER; PLATT, 1983). Atualmente, alguns autores defendem que cada par de otólito é responsável por diferentes funções para espécies diferentes (POPPER; LU, 2000; POPPER; FAY, 1993).

A captação do som nos peixes é diferente de outros vertebrados, como tetrápodes, devido ao meio em que vivem, a água. No caso dos animais terrestres, eles utilizam o tímpano como detector das vibrações sonoras (POPPER; FAY, 1980). Já nos peixes teleósteos esta detecção é feita através da bexiga natatória (Figura 2), que capta as vibrações e direciona para o ouvido interno (ALEXANDER, 1966; SCHUIJF; BUWALDA, 1980).

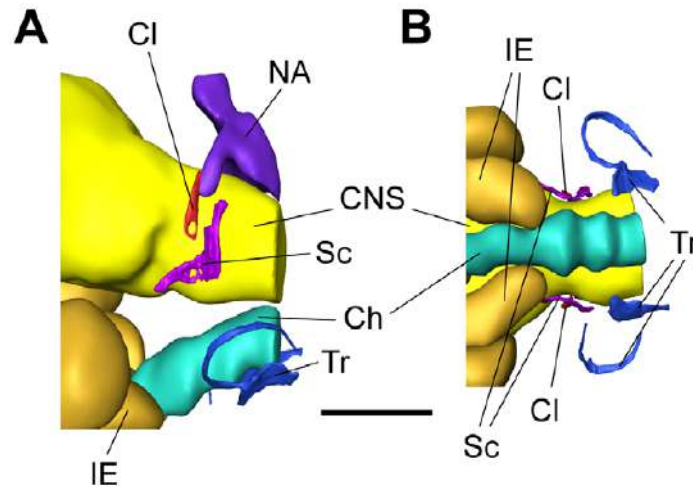
Figura 2 – Reconstrução em 3D do ouvido interno e da bexiga natatória de *Etroplus maculatus*. a, anterior; d, dorsal; asc, canal semicircular anterior; hsc, canal semicircular horizontal; lag, lagena; lago, otólito *asteriscus*; ml, mácula *lagenae*; ms, mácula *sacculi*; mu, mácula *utrículi*; psc, canal semicircular posterior; sac, saccule; sacco, otólito *sagittae*; sb, bexiga natatória.



Fonte: Schulz-Mirbach et al. (2013).

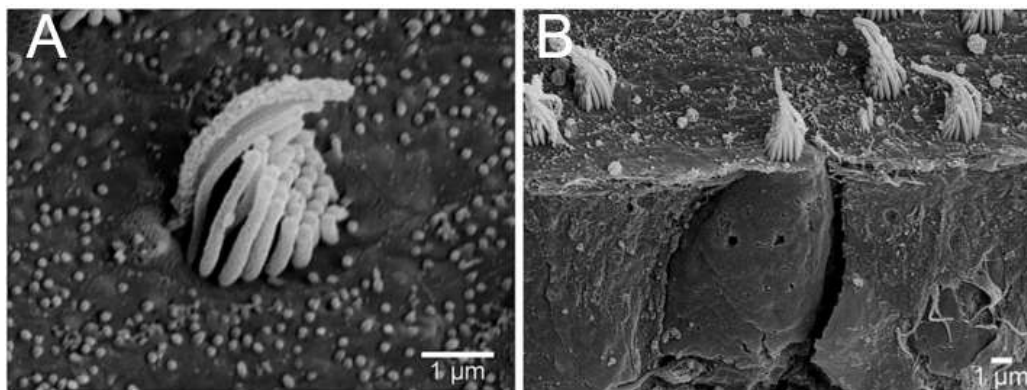
No caso dos peixes da superordem *Ostariophysi* esta conexão é intermediada pelo aparato de Weber, uma cadeia de pequenos ossos (*claustrum*, *scaphium*, *intercalarium* e *tripus*) chamados de Ossículos Weberianos, que auxiliam na detecção de sons nestes peixes (Figura 3) (LADICH; SCHULZ-MIRBACH, 2016 apud WEBER, 1820). Esta ligação amplifica as ondas sonoras fazendo que estes peixes tenham uma maior sensibilidade auditiva (FAY; POPPER, 1980) e alguns estudos mostraram que existe uma relação direta entre o comprimento da bexiga natatória e o número de ossículos no Aparato de Weber com a captação de altas frequências (LECHNER; LADICH, 2008; SCHULZ-MIRBACH; METSCHER; LADICH, 2012). Independente da superordem, as vibrações sonoras são convertidas em impulsos elétricos a partir do contato físico entre os otólitos e as células ciliares (Figura 4).

Figura 3 – Reconstrução em 3D do Aparato de Weber em *Lophiobagrus cyclurus*. (A) Vista lateral. (B) Vista superior. IE, ouvido interno; Ch, corda; Cl, claustrum; CNS, sistema nervoso central; NA, arco neural; Sc, scaphium; Tr, tripus. Escala = 300 μm .



Fonte: Lechner et al. (2011).

Figura 4 – Células ciliares de *Etroplus maculatus*. A) Conjunto de cílios destacando a diferença de comprimento entre o *stereocilium* (células menores) e o *kinocilium* (cílios maiores). B) Destaque para o bulbo nervoso, responsável pela transdução mecanoelétrica entre o otólito e as células ciliares.



Fonte: Schulz-Mirbach et al. (2014).

1.2 Idade e crescimento

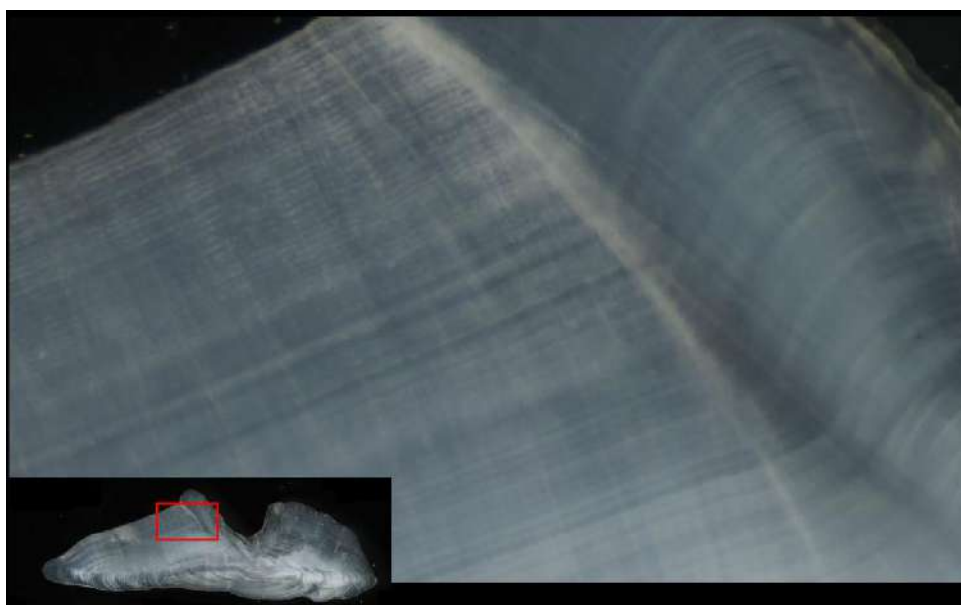
A deposição de cálcio nos otólitos sofre variação devido às alterações do metabolismo dos indivíduos (MUGIYA, 1987; DUARTE-NETO et al., 2014). Assim, quando o metabolismo está acelerado, haverá a formação de uma banda translúcida, mais larga e

com baixa densidade de cálcio. Enquanto que no momento do crescimento lento, formará uma banda opaca, mais estreita que a translúcida e com maior densidade de cálcio.

Estas flutuações metabólicas são influenciadas principalmente pela temperatura (GREEN et al., 2009). Neste caso, durante o verão e devido às altas temperaturas, o metabolismo eleva-se e, portanto, haverá a formação de uma banda translúcida. Ao passo que durante o inverno, as temperaturas baixam e, conseqüentemente, a taxa metabólica. Quando estas bandas estão relacionada com o intervalo de tempo, então é possível usar a contagem destas marcas como estimador da idade dos peixe.

Existem marcas etárias anuais, semestrais, mensais, diários e semi-diários (SPONAUOGLE, 2009b), sendo anuais e diários as mais comuns. No caso de um ano, ela é chamada de *annuli*, dado que ela representa o incremento anual. O mesmo princípio é válido para o ciclo circadiano, ou seja, o período de 24 horas do dia, onde a variação da temperatura entre dia e noite é suficiente para marcar um anel diário (CAMPANA; NEILSON, 1985). Com isso, é possível definir a idade e estudar o crescimento dos peixes baseado na marcação dos anéis de crescimento.

Figura 5 – Otólito sagita de *Sebastes alutus* seccionado, cuja a idade estimada foi de 104 anos baseado na contagem das marcas anuais de crescimento.



Fonte: National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA).

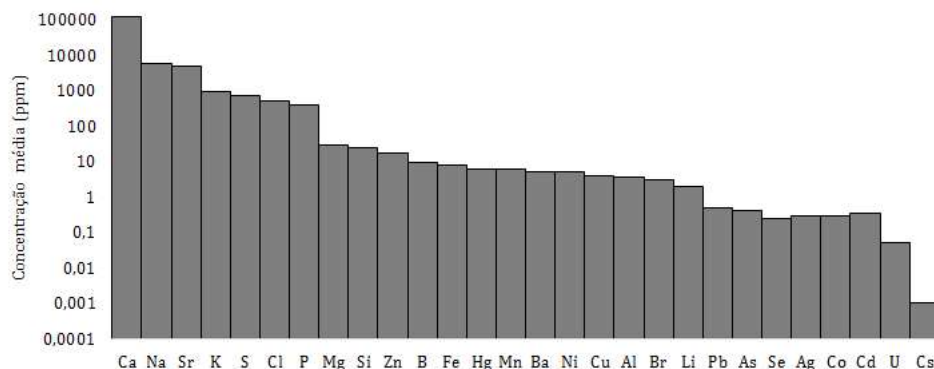
Entretanto, estas bandas também refletem as mudanças de hábitos alimentares, migrações, maturação gonadal e estresse (GREEN et al., 2009). Neste caso, as bandas não podem ser relacionadas com tempo, mas sim com eventos de história de vida. Além

disto, a deposição de cálcio e formação das bandas são susceptíveis a variações devido a idade, sexo, tamanho e genética. Esta flutuação natural favorece a subjetividade dos métodos convencionais aplicados a estudos de crescimento. Para tentar remover esse erro da subjetividade, têm sido usado a abordagem de contagem por, no mínimo, dois leitores independente e sem conhecimento prévio do comprimento do indivíduo (CAMPANA, 2001).

1.3 Microquímica

O otólito é formado por cerca de 95 a 97% de carbonato de cálcio (CAMPANA et al., 1997; CAMPANA, 1999), 2 a 4% de proteína presentes na matriz orgânica (HOFF; FUIMAN, 1993; SASAGAWA; MUGIYA, 1996) e 1% de outros 30 elemento químicos (Figura 6) (CAMPANA, 1999).

Figura 6 – Composição química de otólitos. Não está incluído C, O, N, Ra e Th.

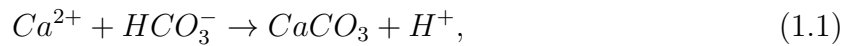


Fonte: Modificado de Campana (1999).

O carbonato de cálcio ($CaCO_3$) é um sal inorgânico bastante utilizado na natureza como matéria-prima para estruturas rígidas, como ossos (ASZÓDI et al., 2000), ovos (PACKARD; HIRSCH; IVERSON, 1984), espículas (SIMPSON, 1989), corais (WAINWRIGHT, 1963) e conchas (ADDADI; RAZ; WEINER, 2003). Na natureza ele ocorre em três formas cristalinas: calcita, vaterita e aragonita. A primeira é a mais abundante, com cristais romboédricos, que caracteriza sua densidade ($2,71 \text{ g/cm}^3$) e maior estabilidade (LIPPMANN, 1973). A vaterita ($2,56 \text{ g/cm}^3$) apresenta sistema hexagonal, o que lhe torna menos estável e, conseqüentemente, mais escasso na natureza (NORTHWOOD; LEWIS, 1968). Por último, a aragonita ($2,93 \text{ g/cm}^3$) é a mais densa, devido a estrutura cristalina ortorrômbica.

Já nos otólitos *sagittae*, a principal forma cristalina é aragonita e, em menores proporções, vaterita (CARLSTRÖM, 1963). Entretanto, esta proporção apresenta variações (Tabela 1). Outro fator que altera a prevalência de vaterita é a origem do peixe. Reimer et al. (2016) constataram que salmões cultivados têm 10 vezes mais vaterita que os selvagens (Figura 7), resultando em perda de 28 a 50% da funcionalidade dos otólitos.

Os otólitos são formados a partir de um processo de biomineralização, que se inicia no *primordium* (núcleo) e continua durante a vida do peixe, com a precipitação de carbonato de cálcio sendo regulado pelo ritmo endógeno do seu metabolismo (MUGIYA, 1987; LECOMTE-FINIGER, 1999). Segundo Jolivet (2009), a precipitação do carbonato de cálcio é governada pela reação:



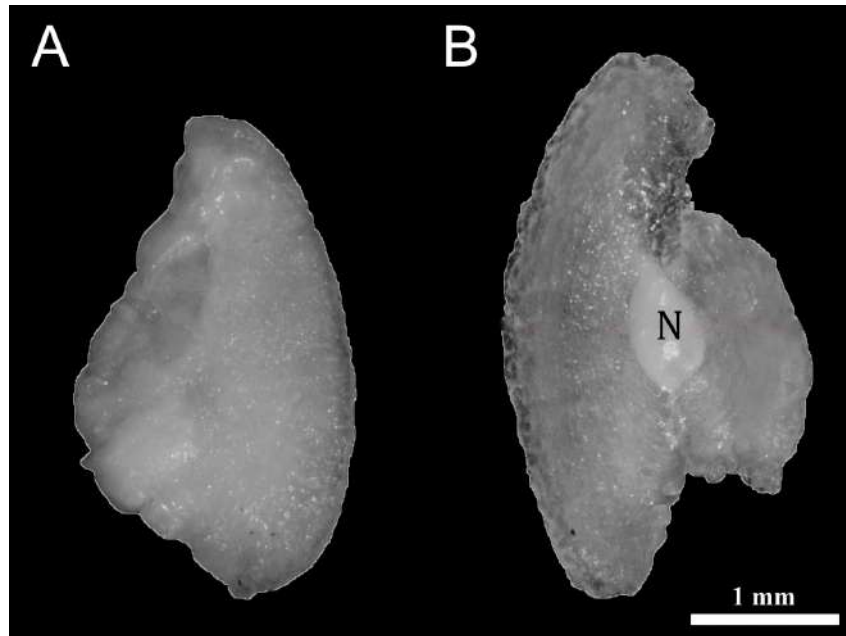
caracterizada pelo coeficiente de saturação $Sa^2 = [Ca^{2+}][HCO_3^-]/K_S$, onde K_S é o produto de solubilidade. A precipitação ocorrerá somente quando o coeficiente de saturação for superior a 1.

Tabela 1 – Proporção de vaterita em otólitos *sagittae*.

Autores	Espécies	Proporção de Vaterita
Bowen et al. (1999)	<i>Salvelinus namaycush</i>	7–15
Campana (1983)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	27
Casselman (1990)	<i>Salvelinus namaycush</i>	70
David et al. (1994)	<i>Sciaenops ocellatus</i>	0
Gaudie (1986)	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	20-24

Fonte: Modificado de Reimer et al. (2016).

Figura 7 – Comparação do otólito *sagittae* do salmão do Atlântico (*Salmo salar*) selvagem (a) e cultivado (b). O otólito da esquerda é de aragonita e o da direita é 90% de vaterita, com exceção do núcleo (N).



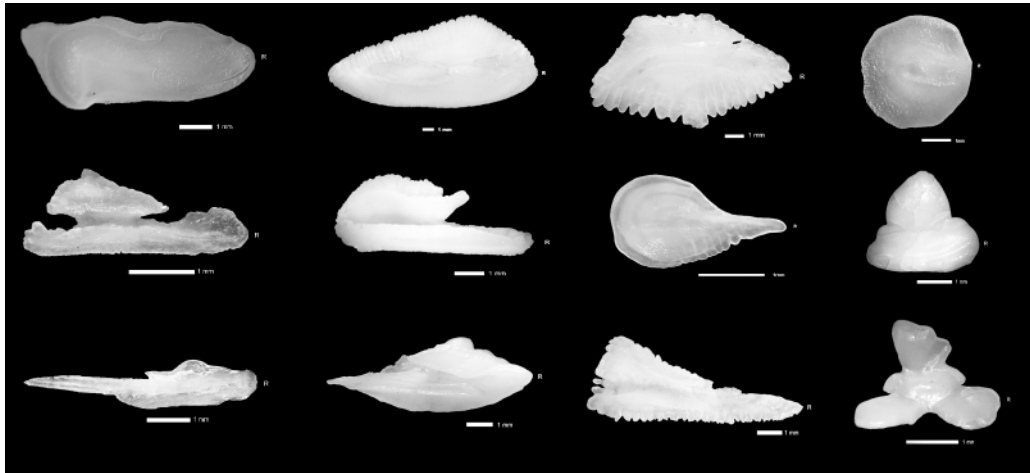
Fonte: Modificado de Reimer et al. 2016.

À medida que o cálcio é depositado, outros elementos químicos presentes na água serão incorporados ao otólito e, devido ao seu metabolismo inerte, permanecerão ali (MUGIYA; UCHIMURA, 1989). Alguns deles, tais como estrôncio (*Sr*), magnésio (*Mg*) e bário (*Ba*) são utilizados como assinaturas geoquímicas para identificação de estoques (THORROLD; JONES; CAMPANA, 1997; CAMPANA; THORROLD, 2001), migração de peixes anádromos (SECOR; HENDERSON-ARZAPALO; PICCOLI, 1995) e exposição à zonas hipóxicas (LIMBURG et al., 2015).

1.4 Morfologia

Devido a sua variação fenotípica inter e intraespecífica da espécie (PLATT; POPPER, 1981), os otólitos pode assumir diversos formatos (Figura 8), desde os mais simples, circulares ou elípticos com margens lisas, até os mais irregulares. Alguns autores atribuem essa variação a genética e os fatores ambientais, que afetam na taxa de crescimento (CAMPANA; CASSELMAN, 1993), e hábito alimentar (GAGLIANO; MCCORMICK, 2004).

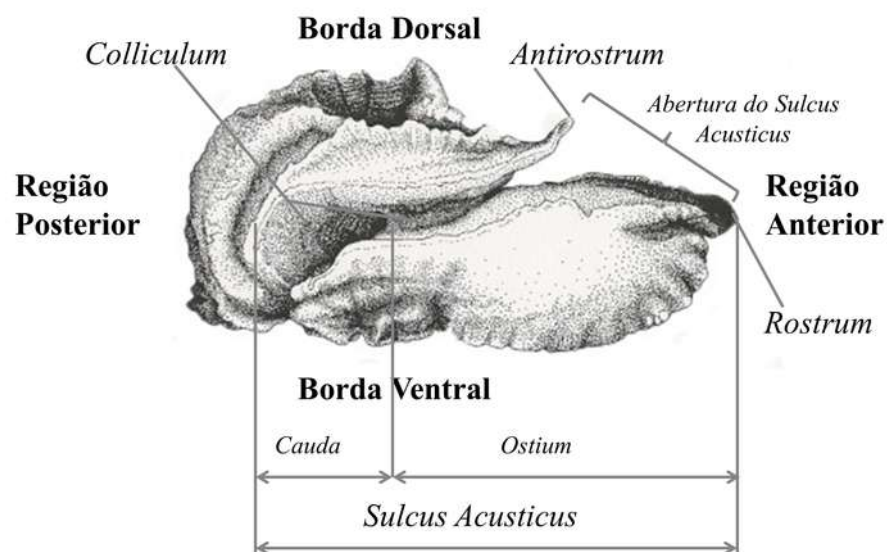
Figura 8 – Alguns dos diversos formatos que os otólitos *sagittae* pode assumir.



Fonte: Lombarte et al. (2006).

Atualmente, existem diversos catálogos e artigos que descrevem e auxiliam na identificação dos otólitos (TUSET et al., 2003a; CAMPANA, 2004; TUSET; LOMBARTE; ASSIS, 2008; ROSSI-WONGTSCHOWSKI et al., 2014). Existe também uma série de estruturas anatômicas utilizadas para descrever e classificar os otólitos (Figura 9) juntamente com índices morfométricos (TUSET et al., 2003b).

Figura 9 – Estruturas anatômicas dos otólitos *sagittae*.



Fonte: Rossi-Wongtschowski et al. (2016).

1.5 Análise de Imagens

Devido à essa gama de formas que os otólitos podem assumir, as análises de imagens têm sido empregada para identificar estoques pesqueiros, táxons e descrever a ecomorfologia. Para atingir esses objetivos, a metodologia mais utilizada é análise de imagem em 2D por ser mais barato e acessível. Entretanto, este tipo de metodologia avalia somente uma face do otólito por vez. Com isso, parte da informação é perdida. Assim, a análise de imagem em 3D, apesar de ser mais cara, é mais robusta e capaz de captar todas as variações da superfície dos otólitos.

1.5.1 Imagens em 2D

Dentre as metodologias aplicadas às imagens em 2D estão a morfometria clássica como, comprimento, altura, espessura, área e perímetro. A partir destas medidas são calculados os índices de forma como retangularidade, elipticidade e circularidade (DUARTE-NETO et al., 2008). Por outro lado, existem outros métodos que descrevem verdadeiramente a forma e que têm sido amplamente utilizados como resposta alternativa, rápida e de baixo custo para descrição da morfologia e identificação do táxon (PARISI-BARADAD et al., 2010) e populações (LEGUÁ et al., 2013; DUARTE-NETO et al., 2008): representação por marcos anatômicos (MONTEIRO et al., 2005; PONTON, 2006), análise de Fourier elíptica (TRACEY; LYLE; DUHAMEL, 2006; DUARTE-NETO et al., 2008; STRANSKY, 2013) e análise de wavelet (PARISI-BARADAD et al., 2005; LOMBARTE et al., 2006). Nestes estudos, o método de aquisição mais utilizado foi o uso de câmera digital e microscópio estereoscópico com fundo preto.

1.5.2 Imagens em 3D

Já as análises a partir de imagens 3D requerem um custo maior, devido ao uso de equipamentos mais sofisticados, sendo o resultado muito mais expressivo e preciso (GARBOCZI, 2002; STYNDER; KUPCZIK, 2013; DU et al., 2013; WILLIS et al., 2013). Alguns trabalhos já tentaram reproduzir otólitos em 3D utilizando diversos métodos como cortes e laser de citometria fluorescente (BAILEY et al., 1995), tomografia computadorizada (YAN et al., 2009), microscópio de varredura (LAGARDÈRE et al., 1995; MOTTA et al., 2009) e LED's (MARTI-PUIG et al., 2015). Este tipo de análise possibilita um avanço para a identificação de espécies e estoques, além da aplicação para a contagem de anéis de crescimento assistida por computadores (STARRS; EBNER; FULTON, 2014; FISHER; HUNTER, 2018).

Dentre estas abordagens, uma tecnologia emergente para a análise de imagens em

3D de otólitos é a tomografia computadorizada. O primeiro trabalho desse tipo foi de Hamrin et al. (1999), onde os autores usaram tomografia computadorizada para reproduzir o otólito do bacalhau-do-atlântico (*Gadus morhua*). Apesar da reconstrução em 3D bem sucedida, não foi possível identificar anéis de crescimento, provavelmente devido ao poder computacional e resolução do tomógrafo.

Três anos depois, o grupo FAbOSA (Fish Ageing by Otolith Shape Analysis), tentou explorar outras técnicas, como exposição prolongada, solução iônica e diferentes solventes orgânicos (ARNERI et al., 2002). Entretanto, novamente não foi possível a visualização dos anéis de crescimento pelo mesmo motivo do trabalho pioneiro. Em 2009, Yan et al. usou tomografia computadorizada com parâmetros iguais a 130 kV de voltagem e 30 μm de corrente para avaliar o impacto da contaminação dos rios da China sobre os otólitos.

Já em 2016, Mapp et al. foram os primeiros a identificar anéis de crescimento em otólitos utilizando tomografia computadorizada. Para isso, foi usado tomografia síncrotron de contraste de fase, que eleva bastante o custo do estudo. Somado a isto, os autores utilizaram uma secção de 3,5 mm de um otólito de solha-europeia (*Pleuronectes platessa*) com 53 kV e sem filtro.

1.6 Objetivos

Considerando os poucos avanços na caracterização 3D de otólitos até o momento, o presente trabalho tem como principal objetivo contribuir para o processo de aquisição e descrição 3D de imagens de otólitos por microtomografia computadorizada. Serão explorados nos capítulos seguintes configurações tomográficas ótimas para aquisição de imagens de otólitos *sagittae* e como explorar potencialmente as densidades externas e internas, bem como comparar as radiodensidades médias entre espécies e a variação ontogenética. Também, buscou-se mapear a curvatura em 3D dos otólitos a partir de imagens tomográficas, uma abordagem pioneira para o estudo morfológico desta importante estrutura. Este novo atributo foi avaliado quanto a sua capacidade de discriminar espécies e/ou descrever tendências ao longo da vida dos peixes.

2 Peeling the otolith of fish: optimal parameterization for micro-CT scanning

2.1 Introduction

Over the last years, computed tomography (CT) has evolved from an exclusive tool of medicine into a widely accepted technique used to analyze the internal structure of objects in a non-destructive way (SCHOEPF; COSTELLO, 2004; BUDOFF; SHINBANE, 2016; JALAGUIER-COUDRAY et al., 2016). The ability to detail the distribution of the internal density of samples has found applications in different fields, such as material engineering (VELICHKO; HOLZAPFEL; MÜCKLICH, 2007), biology (including in vivo research) (POSTNOV; SASOV et al., 2002; POSTNOV et al., 2003; FÜRST et al., 2008; LOWE et al., 2013) and archeology (NOEVER; KEILER; GLENNER, 2015).

A micro-computed tomography (μ CT) scan consists of digitally reconstructing a set of projections formed by the transmitted X-ray beam through the sample (KAK; SLANEY, 2001). These projections are two-dimensional images with a micrometric resolution pixel and the gray-scale of the pixels reflect the mean of the attenuation coefficient of the material (attenuation is caused by the scattering and/or absorption of photons due to interactions with the object (GRODSTEIN, 1957). Therefore, materials with greater density have greater attenuation and the representative pixel is closer to white.

During the acquisition process, electrons are produced from the heating of a filament, accelerated with high voltage and collide into a metal target, thereby producing X-ray photons. The tomographic parameters voltage (kV), current (μ A) and filtering are fundamental for proper image acquisition. Low voltages reduce the capability of photons to penetrate the object, while high voltages result in images with low contrast if low current is used. Electric current controls the number of photons produced, while an increased number of photons produces a greater amount of information catches by a detector. Further, the photons in the X-ray beam contain different energies in conventional tomography. This spectrum of values is called "polychromatic beam" and this energy variation leads to an error in the attenuation coefficients. Then, filters are used to reduce this error, blocking the emission of photons of less energy. Thus, finding an optimal combination of these parameters are required for each type of structure (HSIEH, 2009; KAK; SLANEY, 2001).

CT is one of the emerging techniques with perhaps the greatest potential for the study of fish otoliths (STARRS; EBNER; FULTON, 2014), which are calcified structures found in the inner ear of bony fish, responsible for hearing and balance (POPPER; FAY, 1993). These structures are used in studies regarding age, migration, population structure, phylogeny, feeding ecology, and life histories, constituting an important tool in diverse fields of ichthyology and fishery science (PANFILI et al., 2002; DUARTE-NETO et al., 2008; GREEN et al., 2009). The pioneering approach presented three-dimensional (3D) images of the otoliths from the Atlantic Cod (*Gadus morhua*) in 1999 by Hamrin et al., demonstrating at that time the promising use of such images in the identification of stocks based on otolith shape. After Fish Ageing by Otolith Shape Analysis (FABOSA) group have tried to improve the procedure using prolonged exposure, ionic solution and different organic solvents (ARNERI et al., 2002), however, they not found any internal structures.

Although the use of CT on otoliths first occurred in the late 1990s, real progress has been made only recently. Advances in μ CT resulted in a significant improvement in spatial resolution with the capability of generating images with voxel sizes of three μm . Therefore, it becomes feasible to observe tiny details, such as annual growth structures with a thickness of about 20 μm (JENKINS, 1990; WALDRON; KERSTAN, 2001; SANTANA; MORIZE; LESSA, 2006; LESSA et al., 2008). The potential use of μ CT analysis for otoliths is observed in a different kind of research. Yan et al. (2009) tried to relate otolith CT values to different water pollution degrees. Browning et al. (2012) also used CT to analyze morphology changes as consequent on stressful condition in Red Drum *Sciaenops ocellatus* and Bignami et al. (2013) to see how ocean acidification influence on Cobia (*Rachycentron canadum*) otoliths. More recently, Mapp et al. (2016) used a non-conventional tomography, the synchrotron radiation, to render an otolith of Plaice (*Pleuronectes platessa*) and shown growth rings.

All of these studies (except for FABOSA) have succeeded in their objectives. However, they do not present the methodological aspects behind this new experimental procedure, that may be considered a relatively costly time and expensive technique, manly that one used by Mapp et al. (2016). Therefore, in this work, we develop and describe a protocol for the optimal acquisition of conventional μ CT images of sagittal otoliths, considering different species and a spectrum of CT parameters. Several applicabilities of this new procedure were explored in order to highlight the advantages of this method.

2.2 Material and Methods

2.2.1 Imaging

Thirth left otoliths *sagittae* from six species were investigated: seven from *Acanthocybium solandri* (Cuvier, 1829); eight from *Acanthurus coeruleus* (Bloch e Schneider, 1801); three from *Haemulon plumieri* (Lacepède, 1801); three from *Opisthonema oglinum* (Lesueur, 1818); two from *Thunnus albacares* (Bonnaterre, 1788); and seven from *T. obesus* (Lowe, 1839) (Table 2). The otoliths were embedded in a styrofoam cube and scanned vertically in a μ CT device (Nikon Metrology model XT H 225 ST, X-ray Computed Tomography Laboratory of the Department of Nuclear Energy, Federal University of Pernambuco, Brazil). The larger axis was placed perpendicular to the support base (Figure 10) to minimize the Feret diameter and consequently to maximize the resolution of the resulting volume, yielding an isotropic image resolution. This procedure is important to increase the richness of detail and information and, consequently, each image has a voxel size that optimizes the acquisition, respecting the size of the otolith.

Fifteen different scan settings have been examined by varying the voltage from 60 to 100 kV in steps of 10 kV with an electrical current based on the voltage *versus* current relationship that reaches always 50,000 detected photons in 500 ms (Figure 10). This process was executed with three aluminum filters of 0.5, 1.0 and 1.5 mm thickness.

2.2.2 Calibration, Segmentation and Analysis

An otolith scanned twice, with different parameter settings, will result in two images with different attenuation coefficient values. To standardize and compare them, these coefficients are converted to an arbitrary scale called the Hounsfield scale, where its measure is the Hounsfield unit (HU). This scale is based on air (0 HU) and distilled water (1000 HU).

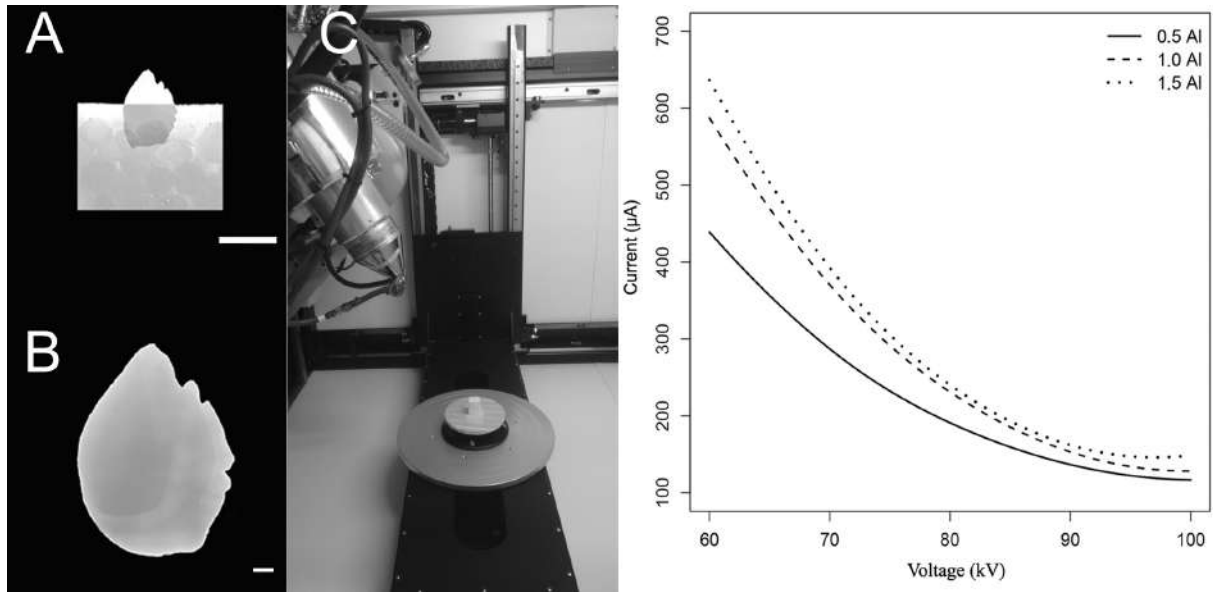
The linear attenuation coefficients were converted to HU using the linear equation:

$$HU_x = \frac{\mu_x - \mu_{water}}{\mu_{water}} * 1000 \quad (2.1)$$

with μ_x and μ_{water} the linear attenuation coefficients of the material and water, respectively. This transformation is necessary to represent the radiodensity in a dimensionless scale for purposes of comparisons with other studies (BUZUG, 2008).

Four specific analyses were performed to diagnose the parameters. First, histograms of the sinograms were computed. The sinogram is a graph that compiles of all projections,

Figure 10 – Procedure of tomographic images acquisition of sagittae otoliths. A) Sagitta otolith of *Haemulon plumierii* vertically positioned in a styrofoam cube. Scale bar = 10 mm. B) Tomographic image of respective otolith in grayscale after acquisition. Scale bar = 1 mm. C) Otolith on base support previous scanning. On graph, relationship of voltage and current supported by machine for three filters used (0.5, 1 and 1.5 mm).



taken at different angles in a single image (KUDO; SAITO, 1991; HAWKINS; LEICHNER; YANG, 1988). Thus, the distribution of the detected photons allows to analyze the saturation of the CT detector; only values in the interval of 0.2 and 0.8 were considered as appropriate. Second, the reconstructed volumes have been segmented into two volumes-of-interest. We labeled the voxels as the inner region and exterior shell. Then, we smoothed and removed disconnected regions from the initial volumes-of-interest using 3D morphological operations and registered the smoothed volumes-of-interest to all remaining scans of the same otolith. At the end of this process, the histograms of the interior and exterior volumes of interest have been computed to analyze the possible overlap between them. Third, we computed statistical measures: the contrast of the signal as the standard deviation of the inner region σ_{in} and the magnitude of the noise as the standard deviation on a homogenous void region outside the otolith σ_{out} , composed by air or the styrofoam fixture. The signal-to-noise ratio (SNR) compares the object signal to the background noise within an image (BOAS; FLEISCHMANN, 2012) and reads $SNR = \sigma_{in}/\sigma_{out}$. Finally, the last analysis was performed as *post-hoc* after finding the optimum parameter set and was conducted to prove the feasibility of detecting the expected yearly growth rings.

For the 3D visualization, an R script (Appendix A) was first written to extract the

Table 2 – Lengths and observed ages of the individuals used in the present study. *Estimated ages from the already published growth curves (STÉQUERT; PANFILI; DEAN, 1996; LESSA et al., 2008; DUARTE-NETO; HIGA; LESSA, 2012; MCBRIDE; RICHARDSON; MAKI, 2008). TL = Total length; FL = Furcal length and SL = Standard length; HU = Hounsfield Units (mean \pm standard deviation).

Images	Species	Length	Age	HU	Voxel (μm)
AS02	<i>A. solandri</i>	159 TL	5.53*	6770.03 \pm 910.66	8
AS11	<i>A. solandri</i>	139.7 TL	2.89*	6667.82 \pm 950.87	7
AS12	<i>A. solandri</i>	142.3 TL	3.13*	6854.89 \pm 937.57	7
AS1294	<i>A. solandri</i>	155 TL	4.73*	6735.74 \pm 972.63	8
AS17	<i>A. solandri</i>	131 TL	2.23*	6810.47 \pm 1030.96	7
AS28	<i>A. solandri</i>	151 TL	4.11*	6743.12 \pm 930.96	7
AS35	<i>A. solandri</i>	118 TL	1.47*	6752.87 \pm 1053.92	6
AC36	<i>A. coeruleus</i>	10.9 TL	1	8584.08 \pm 954.49	3
AC37	<i>A. coeruleus</i>	24 TL	5	7817.11 \pm 982.37	3
AC38	<i>A. coeruleus</i>	22 TL	4	7830.75 \pm 984.98	3
AC39	<i>A. coeruleus</i>	24.9 TL	4	7850.02 \pm 1006.73	3
AC40	<i>A. coeruleus</i>	26.2 TL	4	7747.89 \pm 1003.95	3
AC41	<i>A. coeruleus</i>	25.8 TL	6	7615.58 \pm 965.14	3
AC42	<i>A. coeruleus</i>	32 TL	15	7441.57 \pm 1026.62	5
AC43	<i>A. coeruleus</i>	30.1 TL	8	7593.43 \pm 959.9	5
HP09	<i>H. plumierii</i>	32.5 TL	20	8287.79 \pm 1016.93	8
HP118	<i>H. plumierii</i>	26.6 TL	14	8149.19 \pm 1008.72	6
HP150	<i>H. plumierii</i>	18.3 TL	8	7914.35 \pm 875.31	3
OO132	<i>O. oglinum</i>	18.9 SL	0.73*	8609.35 \pm 923.45	3
OO134	<i>O. oglinum</i>	14.8 SL	0.52*	8534.63 \pm 971.38	3
OO279	<i>O. oglinum</i>	18 SL	0.68*	8551.46 \pm 933.31	3
TA22	<i>T. albacares</i>	119 FL	3*	8555.16 \pm 1455.08	11
TA119	<i>T. albacares</i>	120 FL	3*	8460.58 \pm 1272.79	13
TO55	<i>T. obesus</i>	105.8 FL	3.22*	6686.81 \pm 951.39	10
TO70	<i>T. obesus</i>	142.7 FL	5.59*	6659.76 \pm 863.66	10
TO77	<i>T. obesus</i>	127.3 FL	4.49*	6536.35 \pm 882.73	10
TO78	<i>T. obesus</i>	157.3 FL	6.85*	6438.39 \pm 879.18	11
TO79	<i>T. obesus</i>	128.7 FL	4.58*	6517.55 \pm 933.39	10
TO83	<i>T. obesus</i>	138.7 FL	5.29*	6497.41 \pm 879.96	10
TO89	<i>T. obesus</i>	105.6 FL	3.21*	6780.36 \pm 958.21	9

contour pixel of the otolith from each 2D projection. Based on these x , y and z coordinates of each pixel, the color scaled reconstruction and iterative 3D visualization of otolith images were carried out using MeshLab software (CIGNONI et al., 2008). Then, the descriptive statistics of the image density were estimated and five lines were drawn starting from the nucleus towards the edge, following the reading axes indicated in previous age and growth studies of each species using R software (R Core Team, 2018). Each row was smoothed using a five-point moving average. After the smoothing, the means of these lines were plotted to verify the alternation of densities relative to the formation of the growth rings. This process is described in appendix B.

We evaluate the possible correlation between the mean radiodensity of each otolith and the respective fish length using simple linear correlation analysis, in order to detect ontogenetic trends for each species. Mean values of HU among species were also compared using the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's *post-hoc*. All statistical analyses were performed in R with a significance level of 0.05.

2.3 Results and Discussion

2.3.1 Protocol for the optimal acquisition

All parameter sets resulted in high-quality external images with varying tonalities. It was possible to discern external structures such as the *sulcus acusticus*, *ostium*, *rostrum*, *cauda e excisura*, as well as the fluctuations of the margins and the depth of the *sulcus acusticus* (Figures 11 and 12). Solely 3D imaging enables analysis of the whole otolith surface, curvature between faces and the deepness of *sulcus acusticus*.

In figure 13, the black curves represent the exterior volume and the gray ones the interior volume, overlapping in all combinations of 60 kV, 100 kV and 1.5 mm aluminum filter. Wherefore, they were not considered suitable from this point of view. Nevertheless, the SNR analysis showed that 60 kV and 0.5 mm aluminum filter yields a better relationship between real signal and noise, in contrast with higher voltages or thicker filters (Table 3). Thus, we did not discard the possible use of 60 kV, however, 70 kV and 80 kV with 0.5 mm filter were considered the most appropriate parameters since they presented good results in all analysis. Both satisfy the Rose criterion (ROSE, 1948), that classify images with $SNR > 5$ as adequate. The sinogram analysis confirms the quality of the choice of parameters (Figure 13B), *i.e.* the detector did not saturate for any of the configurations. That is, lower voltage yields lower density contrast.

Figure 11 – Tomographic images of the inner face of the otoliths sagittae A) *Acanthocybium solandri*; B) *Acanthurus coeruleus*; C) *Haemulon plumieri*; D) *Opisthonema oglinum*; E) *Thunnus albacares* and F) *Thunnus obesus* using Meshlab, wherein red are denser regions and in blue the surfaces of lower density values.

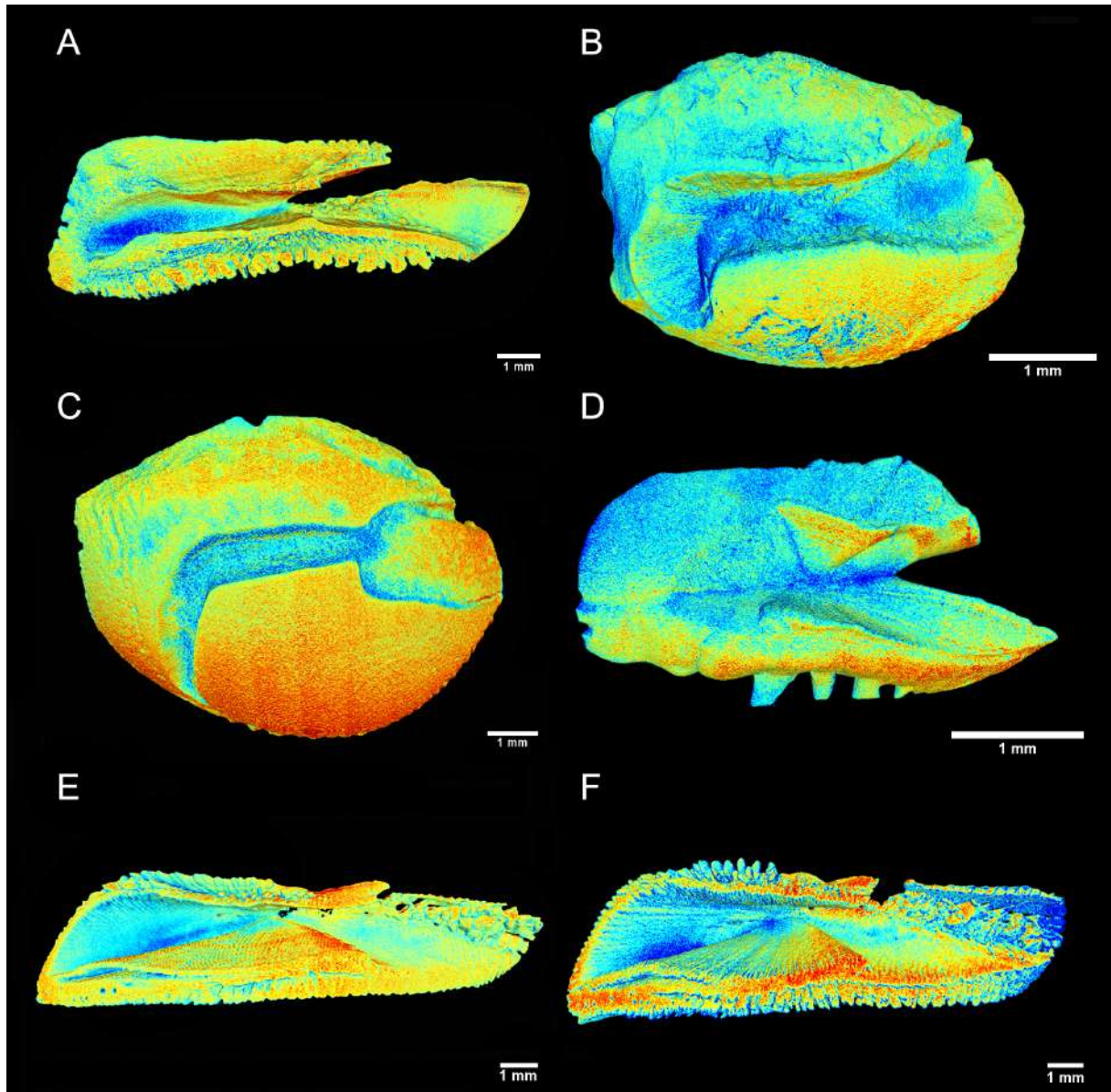


Figure 12 – Tomographic images of the external face of the otoliths *sagittae* A) *Acanthocybium solandri*; B) *Acanthurus coeruleus*; C) *Haemulon plumieri*; D) *Opisthonema oglinum*; E) *Thunnus albacares* and F) *Thunnus obesus* using Meshlab, wherein red are denser regions and in blue the surfaces of lower density values.

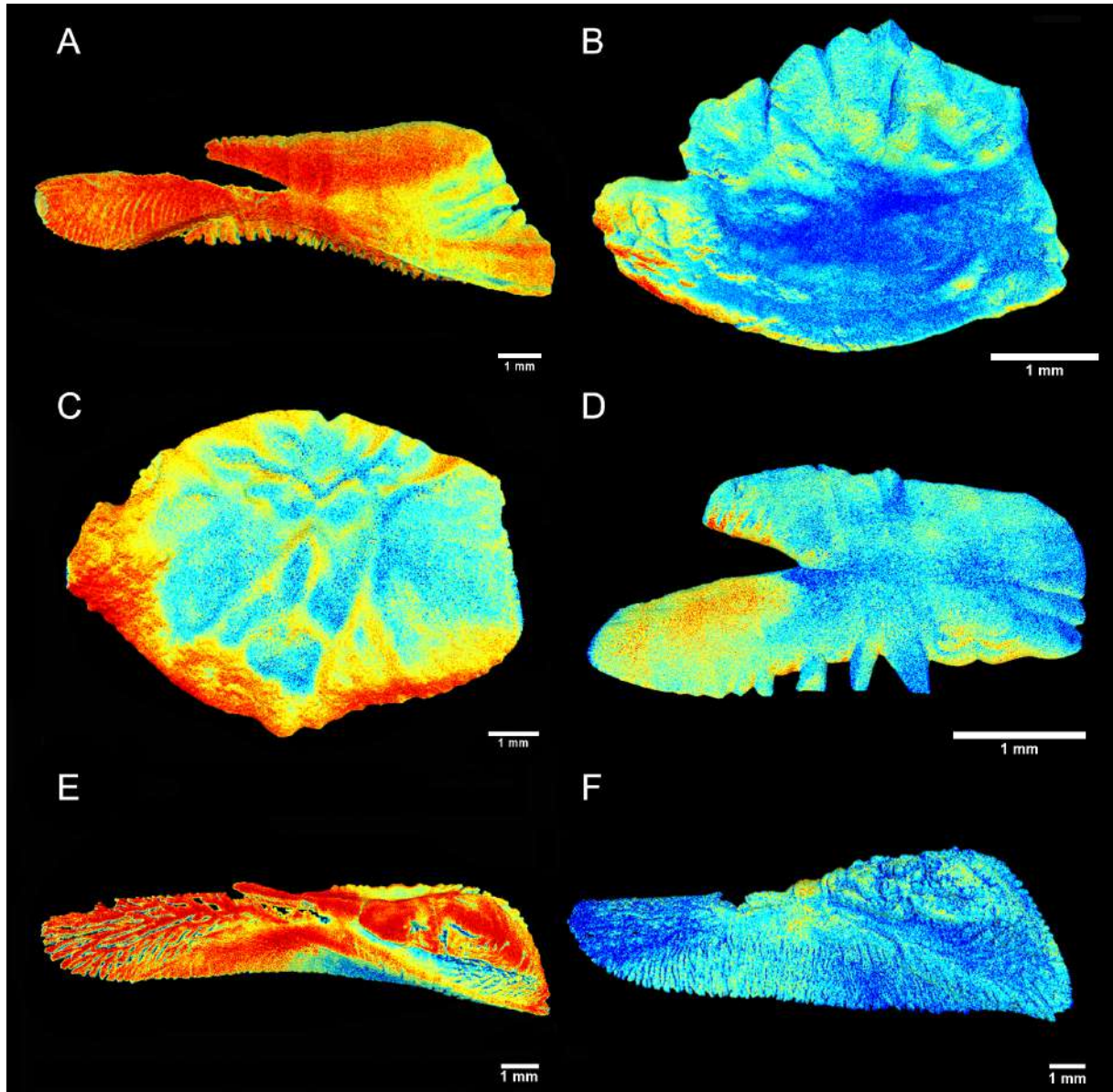


Figure 13 – Diagnostic graphs of optimum set μ CT parameters evaluation. A) Mosaic of histograms used to segment inner part (gray curve) from external part (black curve). B) Example of detector response for the parameter set 80 kV with 0.5 mm aluminum filter of *Haemulon plumierii*.

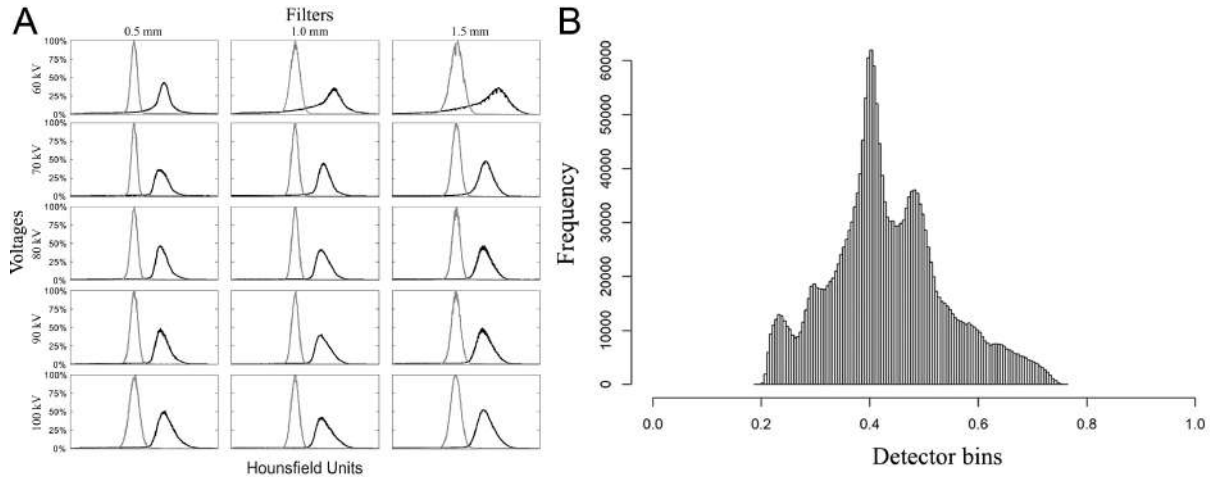


Table 3 – Signal-to-noise ratio (mean \pm standard deviation) of otoliths *sagittae*.

Voltages (kV)	Filters (mm)		
	0.5	1	1.5
60	9.50 \pm 3.80	7.59 \pm 2.65	6.44 \pm 2.35
70	8.11 \pm 3.39	7.13 \pm 2.70	5.80 \pm 2.04
80	7.46 \pm 4.55	6.25 \pm 2.47	5.17 \pm 1.84
90	6.54 \pm 3.80	5.47 \pm 2.08	4.33 \pm 1.78
100	5.43 \pm 3.60	4.70 \pm 1.78	4.01 \pm 1.71

Combining these factors, the best images were achieved with medium voltages (70 and 80 kV) and a 0.5 mm aluminum filter. The worst images were achieved when using a 1.5 mm aluminum filter, as it was either not possible to capture information on density or artifacts were formed. The term artifact here refers to any systematic discrepancy between CT numbers in a reconstructed image, and the true attenuation coefficients of the object (BARRETT; KEAT, 2004).

FAbOSA group, in 2000, also used 80 kV and aluminum filter, but they obtained lower resolution and noisier images, possibly due to an outdated machine and lack of necessary computational power. Consequently, it was not possible to observe the growth rings. More recently, Yan et al. (2009) used a high voltage (130 kV) and low current (30 μ A), where high voltage possibly forced the photons through the otolith and no information on density was captured. Mapp et al. (2016) using monochromatic X-ray with 53 kV and no filter rendered a 3D image highlighting the growth rings. Although the authors

considered that the objective proposed was reached, they reported some artifacts and did not experiment with others tomography settings. To reduce artifacts and improve SNR, therefore, our results suggested that inner structures as a function of density are better visualized using the following parameters: 80 kV, 220 μA and 0.5 mm aluminum filter. From this, all following procedures were conducted on samples imaged using only this configuration.

2.3.2 Exploring otolith density variation

Micro-CT scan provides shape, density distribution and structures of the otolith. The present investigation is the first study to present tomography images of entire otoliths with a discernible of internal and external density distributions using a conventional μCT . Using the correct set of parameters and appropriate voxel size (resolution), one can correctly represent the mean attenuation coefficient of the otolith material and obtain rich details regarding density.

The linear attenuation coefficients were converted in Hounsfield units (HU), with the minimum value of 2941.94 for *T. obesus* and the maximum of 11839 for *T. albacares*, but the highest mean radiodensity was 8609.35 HU for *O. oglinum* (Table 2). Yan et al. (2009) found an HU between 2500 and 4600 for *asteriscus* and *lappilus* of the carp otolith, respectively. Mapp et. al (2016) and FAbOSA group (2002) did not present HU values. Nevertheless, other calcified structures are out of this range, *e.g.*, scallop shells (744 HU) (DIEZ et al., 2013) and ureteral stone (1350 HU) (HAMEED et al., 2013).

The otoliths are composed by aragonite (CARLSTRÖM, 1963), which is one of the crystalline forms of calcium carbonate (CaCO_3) with density equal to 2.93 g/cm^3 . There are others forms with different densities and as well could be found in otolith: calcite, with rhombohedral crystals, which characterizes its density (2.71 g/cm^3) and higher stability (LIPPMANN, 1973); and vaterite (2.56 g/cm^3), which presents a hexagonal crystal, less stable and, consequently, more scarce in nature (NORTHWOOD; LEWIS, 1968). Thus, the chemical proportion between those polymorphs could lead to distinct Hounsfield units, and, then, different values for *asteriscus* and *lappilus* otoliths. However, the values presented by Yan et al. seems to be reasonable and consistent for these structures.

The distribution of otolith density can be visualized using the linear conversion of the attenuation coefficient on RGB scale, in which blue corresponds to lowest density regions and red corresponds to regions of higher density (Figures 11 and 12). Externally, the deeper region of the *sulcus acusticus* exhibits the lowest densities, increasing towards the surface in all species. This pattern is also described by Gauldie and Nelson (1990) for other species, suggesting that contact with hair cells and the macula causes a reduction in

the calcium deposition rate in this region.

A strong correlation between radiodensity and fish length was observed (Figure 14). However, there is not a unique pattern: a linear and positive correlation for *H. plumieri* and *O. oglinum*, linear and negative correlation for *A. coeruleus* and *T. obesus*, and non linear correlation for *O. oglinum*, which is considered a fast-growing and short-lived species (LESSA et al., 2008). *A. solandri* presented no correlation. This could be related to the fact that all individuals in this sample have reached the stationary growth phase or could exist two linear patterns related to different sexes since McBride et al. (2008) suggested a difference in growth between males and females for this species. Unfortunately, we do not have information on sex definition to confirm the second hypothesis.

There was a significant difference among mean radiodensities of studied species (Table 4) and Dunn's *post-hoc* pointed out that *T. obesus* and *A. solandri* had Hounsfield units different from the other species (Figure 15). Both belong to the Scombridae family, but from a different genus. Further, although they also belonged to the same genus *Thunnus*, the *T. alabacares* otoliths had radiodensities greater than *T. obesus*, which in turn demonstrated to be very similar to *A. solandri* (same family). Since these two tuna species are very close species, including their behaviors, we were expecting to find very similar results. Perhaps, the radiodensity of otoliths is not a phylogenetic response. An outlier was observed for *A. coeruleus* which can be explained by the age difference between this individual (AC36, one-year-old) and the others (> 4 years).

Figure 14 – Correlation analysis between the mean radiodensity of otoliths and fish length.
 A) *Acanthocybium solandri*; B) *Acanthurus coeruleus*; C) *Haemulon plumieri*;
 D) *Opisthonema oglinum*; E) *Thunnus obesus*.

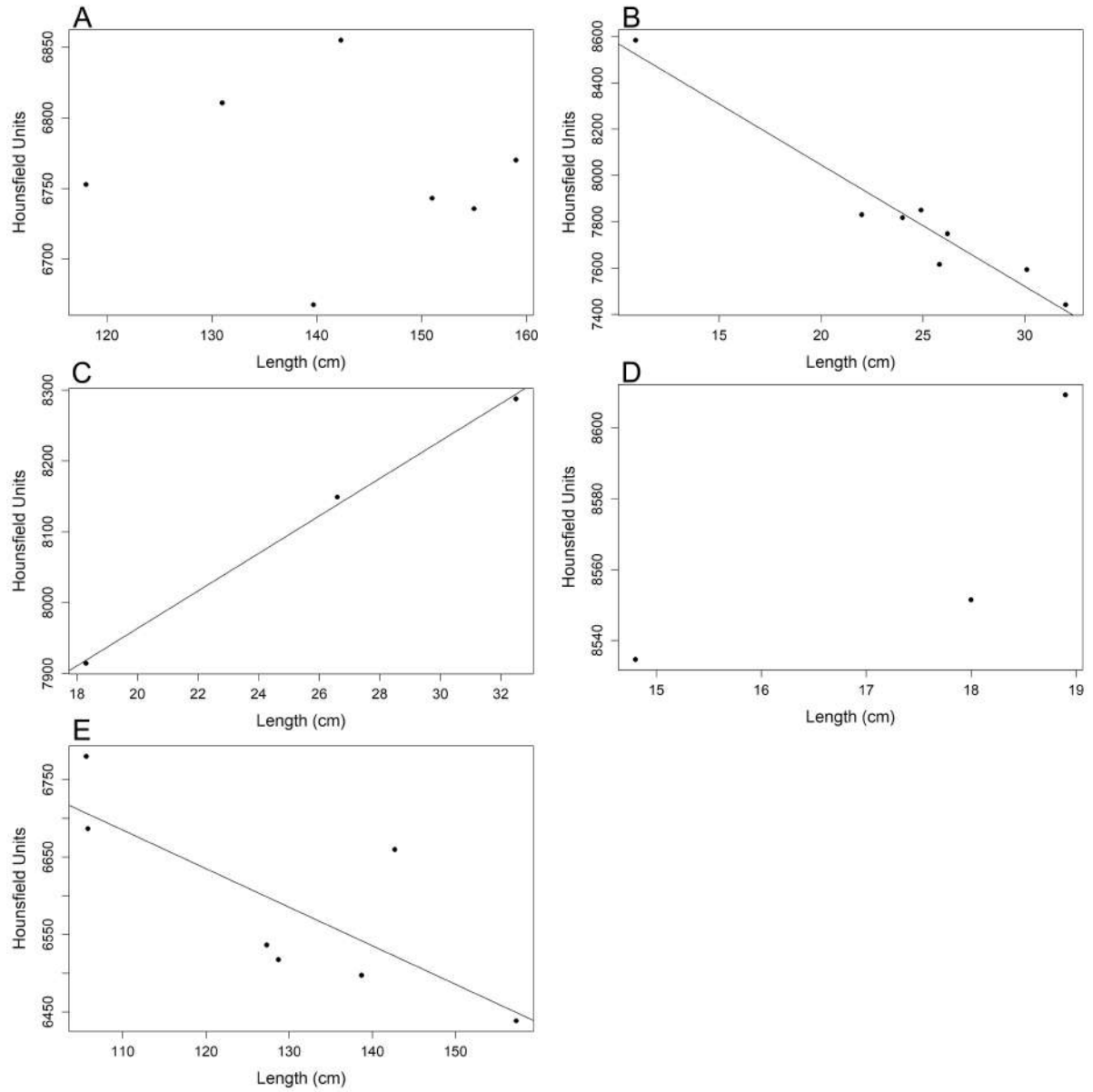


Table 4 – Paired comparison of radiodensities of otoliths by species using Kruskal-Wallis (Kruskal-Wallis = 25,403, df = 5, p -value < 0.05) followed by *post-hoc* Dunn test. AS = *A. solandri*; AC = *A. coeruleus*; HP = *H. plumierii*; OO = *O. oglinum*; TA = *T. albacares* and TO = *T. obesus*. Z = Dunn test statistic and its respective p -value.

Comparison	Z	p -valor
AC - AS	2.03	0.04
AC - HP	-0.61	0.54
AS - HP	-2.12	0.03
AC - OO	-1.39	0.16
AS - OO	-2.88	0.00
HP - OO	-0.65	0.52
AC - TA	-1.02	0.31
AS - TA	-2.32	0.02
HP - TA	-0.44	0.66
OO - TA	0.15	0.88
AC - TO	3.19	0.00
AS - TO	1.12	0.26
HP - TO	2.99	0.00
OO - TO	3.75	0.00
TA - TO	3.07	0.00

Internally, empty cavities were observed for tuna otoliths (both species) (Figure 16). In some cases, it seems like a tunnel with an entrance but no exit and in other cases, there is no connection to the surface for all along the z -axis. These empty spaces are likely formed during the calcification process and, probably, are filled by endolymph. Also, they reduce the otolith density. However, whether their occurrence represents just a random process or there is any related functional or ecological reason needs to be clarified.

It was possible to extract a cross-section of the otolith (as usually done in age and growth studies using a metallographic saw) and observe the variation in density from the core towards the edges (Figure 17). An alternation between low and high-density areas was observed, representing concentric bands of mineral-deficient and mineral-rich zones that constitute growth increments (GREEN et al., 2009).

Figure 15 – Comparison of the average radiodensities of the otoliths of the species studied. AS = *A. solandri*; AC = *A. coeruleus*; HP = *H. plumierii*; OO = *O. oglinum*; TA = *T. albacares* and TO = *T. obesus*. The elements of the box diagram correspond to the lower bound of the *mustache* given by the difference between the first quartile and 1.5IQR, first quartile, median, third quartile, and the upper bound of the *textit* mustache is the sum of the third quartile and 1.5AIQ. IQR = interquartile range.

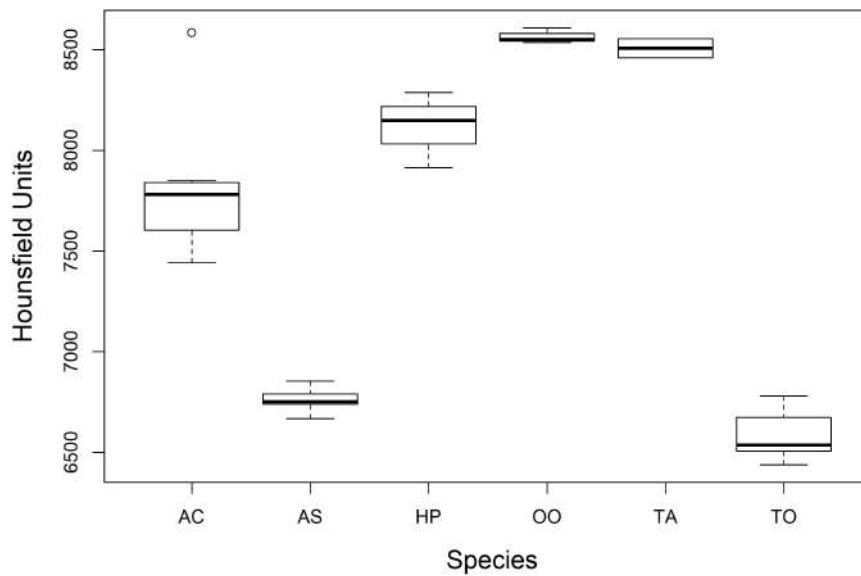
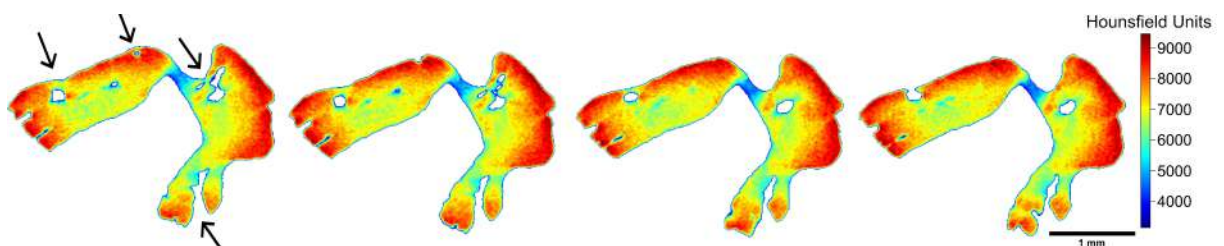
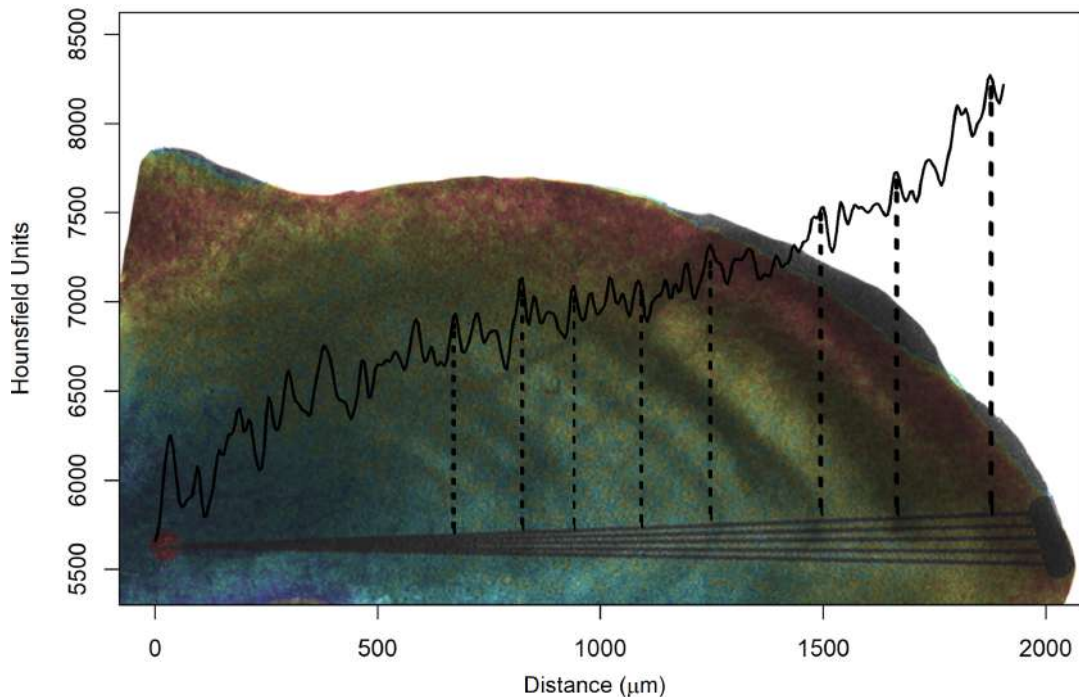


Figure 16 – A sequence of images along the z -axis, illustrating the opening and closing of internal spaces found in individuals of *Thunnus albacares* and *T. obesus*. The black arrows indicate the regions where these processes occurred.



The sections closest to the nucleus were selected, where five lines were traced from the nucleus to the edge of the otolith simulating reading axes used in age and growth studies (Figure 17). The same procedure was replicated for all otoliths and, in particular, *A. coeruleus* (Figure 18) and *H. plumierii* (Figure 19) showed a decrease in HU values with the aging of the animals. In addition, the three samples AC38, AC39 and AC40, which are the same age, exhibited similar behavior among themselves (Figure 18). The

Figure 17 – Medium radiodensity (continuous black line) of the five lines drawn from the nucleus (red point) to the edge of the otolith, simulating the reading axis of *Acanthurus coeruleus*. The figure is composed by overlapping the photograph of the sectioned blade with a metallographic saw and its respective digital representation made by micro-computed tomography, where the highest values of radiodensity are represented in red and the smallest in blue. The vertical and dashed lines correspond to the observed growth rings and indicate their respective Hounsfield unit peaks. This image correspond to individual AC43 (see Table 2 with eight rings counted using a microscope).

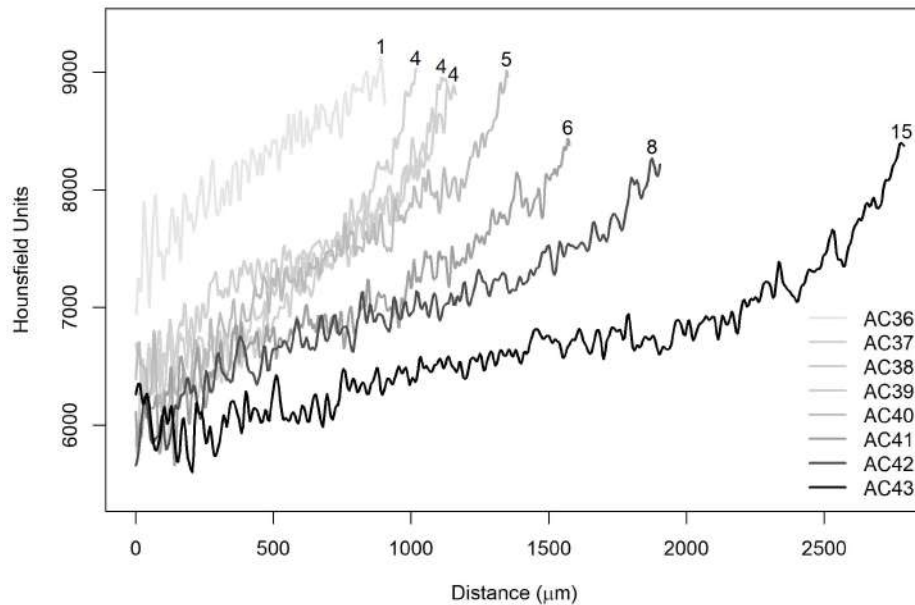


same was found for the two samples of *T. obesus* (3 years old) and the specimens of *T. albacares* (~3 years old).

In figure 19, it was observed that the curves showed the same behavior in the initial phase between 0 and 200 μm . In this specific section, it is possible to observe the effect of voxel size differences. The HP09 sample had a resolution equal to eight μm and, therefore, could not capture the variation on the same scale as the other images (HP118 and HP150). Furthermore, it has been found that there is no effect of voxel size on the displacement of the curves, since six images of *A. coeruleus* that have a resolution equal to 3 μm showed the same pattern, as well as those with resolution equal to 5 μm (Figure 18). Actually, the reason for the displacements is attributed to ontogenetic variations.

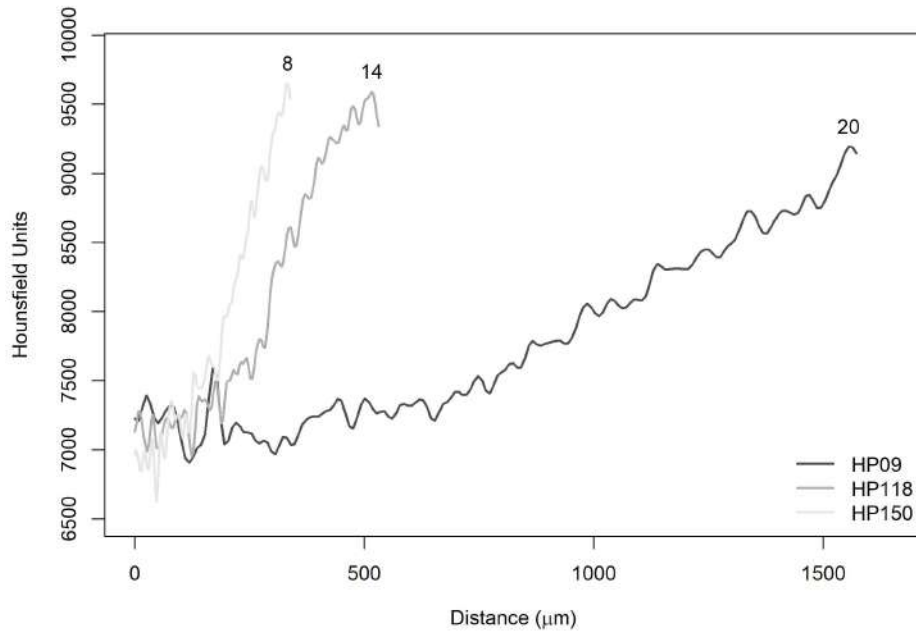
The three *O. oglinum* specimens presented the same pattern (Figure 20) occurring coincident peaks and valleys, since their estimated ages were less than one year. In addition, the region between zero and 150 μm showed great variation. This corroborates the study by

Figure 18 – Average radiodensities of the five lines, simulating the reading axis of *Acanthurus coeruleus*. The numbers at the end of the curves refer to the observed ages (years).



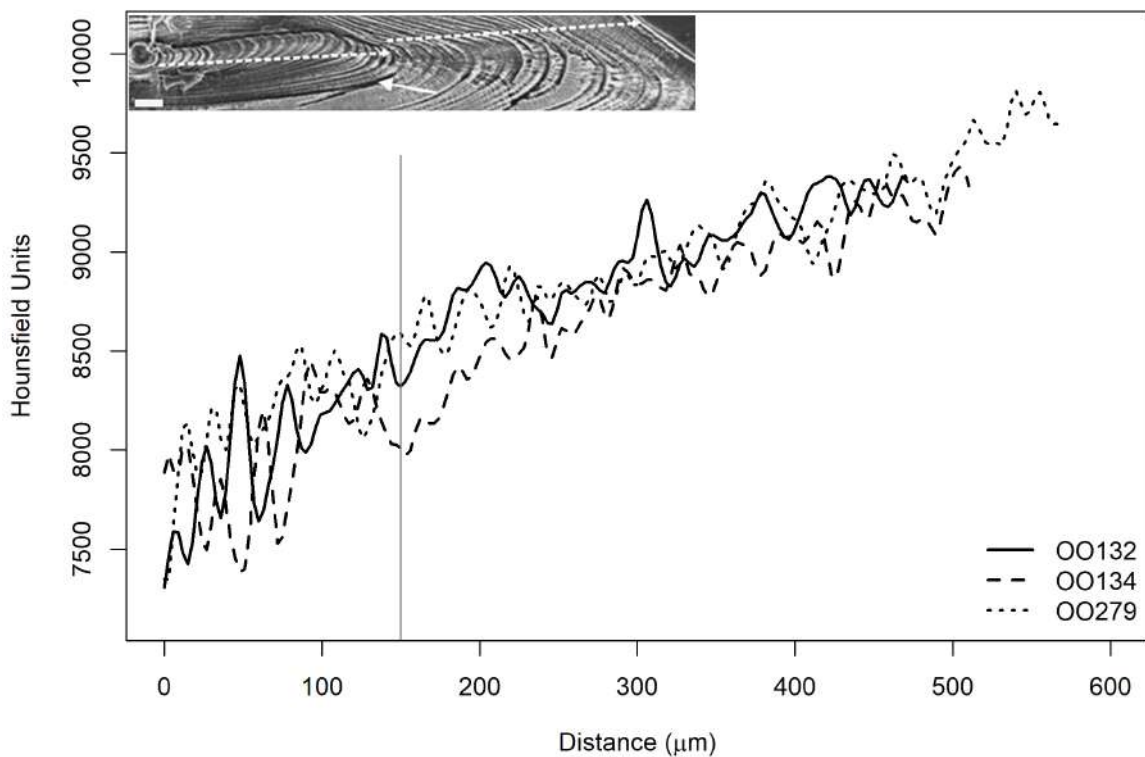
Lessa et al. (2008), where it was possible to measure the thickness of the micro-increments (daily) and observed the occurrence of two zones with distinct patterns, as shown in figure 20. In this paper, the authors associated the first zone to marks of life history events at the begin of fish life, such as the opening of the mouth, migration, and settlement. This reinforces the idea that the radiodensity fluctuations observed in the present work could be also associated with the occurrence of growth marks represented by these events.

Figure 19 – Average radiodensities of the five lines, simulating the reading axis of *Haemulon plumieri*. The numbers at the end of the curves refer to the observed ages (years).



These results indicate that the number of peaks and valleys is related to the micro or macrostructures, that could be related to age or life history events. Besides, it is important to emphasize that, in the future, this procedure could be made automatic, removing the inter-rater error omnipresent in the conventional approach. Also, using the difference between them, we could segment layer by layer until reconstruct the previous form, peeling the otolith.

Figure 20 – Average radiodensities of the five lines simulating the *O. oglinum*. The estimated ages for the three samples were less than one year and similar behaviors were observed for both curves of mean Hounsfield units. The vertical, gray and continuous line indicates the core distance of 150 μm , where the authors of the present study related to the change in growth phase explained by Lessa et al. (2008). In detail, an otolith sectioned of *O. oglinum* photographed with a scanning electron microscope, showing the growth rings. The two dashed lines indicate the two phases described by the authors (LESSA et al., 2008).



During otolith formation the core (otolith nucleus) is the first part to be formed and has the lowest density due to its chemical composition made primarily by glycoproteins (SASAGAWA; MUGIYA, 1996) and other organic material (FERMIN et al., 1998; BORELLI et al., 2001; PISAM; JAMMET; LAURENT, 2002). In age and growth studies, knowing the position of the otolith nucleus and type of cut used (cross-sectional or longitudinal) is fundamental. The protocol described in the current work may help researchers to attain this task without losing samples. Finally, in extreme cases where a unique sample is available, as deep-sea fishes and critically endangered species, non-destructive methods are the best alternative.

2.4 Conclusions

We show that μ CT scanning of otoliths can yield rich information on variations in density and enable the 3D characterization of macrostructures of otoliths, being the only technique that provides a high-resolution otolith image, in a non-destructive manner. For this purpose, we recommend the use of the following μ CT parameters: 80 kV, 220 μ A and 0.5 mm. Furthermore, the current procedure not only generates a solid 3D object, but it also yields radiodensity as a function of x , y , z . Therefore, the approach presented represents a breakthrough in the otolith investigation, establishing a new point of view for future studies with inference in ecology, taxonomy, distribution, and microchemistry that use the otolith as the basic structure of analysis.

3 Atributos das Curvaturas 3D de Otólitos

3.1 Introdução

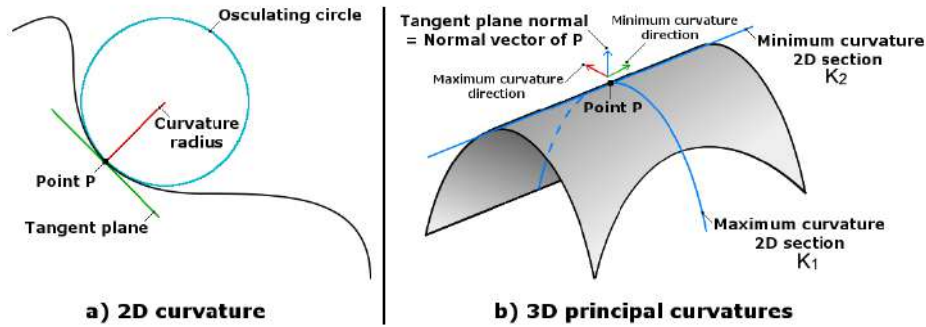
A plasticidade fenotípica dos otólitos é importante para a biologia pesqueira por fornecer informações sobre o crescimento, a conectividade da população (STRANSKY, 2013; DUARTE-NETO et al., 2008) e o identificador de táxon (PARISI-BARADAD et al., 2010). Para isso são usados descritores, como os clássicos (comprimento, altura, peso) e os modernos (Fourier, wavelet, dimensão fractal) (LOMBARTE et al., 2006; PARISI-BARADAD et al., 2005; PIERA et al., 2005), onde a grande maioria desses estudos utilizaram câmeras convencionais e microscópios estereoscópicos para as imagens dos otólitos e as análises são baseadas nos contornos 2D.

Recentemente, o aprimoramento em ferramentas, softwares e poder computacional permitem a análise de imagens 3D mais robusta, que proporciona mais informações e amplia os campos de pesquisa. Uma dessas técnicas 3D é a curvatura baseada na segunda derivada da superfície e seus atributos. Esse procedimento fornece distribuição espacial da curvatura e mais detalhes sobre a forma local. Conseqüentemente, podemos distinguir uma superfície convexa ou côncava e identificar bordas. Este método foi aplicado com sucesso em interpretação sísmica (KLEIN; RICHARD; JAMES, 2008), segmentação automática de objetos (GAUTHIER et al., 2017) e reconhecimento de faces (TANAKA; IKEDA; CHIAKI, 1998).

Nas curvas 2D, a curvatura é o inverso do raio r no ponto p (Figura 21a) e podemos calcular a curvatura (K), usando sua segunda derivada entre dois pontos no plano- xy . No entanto, existe um número infinito de curvaturas na superfície em 3D. Portanto, é necessário definir dois eixos ortogonais como referências, sendo eles as direções máxima (K_1) e mínima (K_2) da curvatura (Figura 21b).

Assim, a curvatura poderia ser usada para descrever o relevo do otólito em 3D, onde para entender melhor o padrão podemos representá-la usando uma imagem em escala de cores e a distribuição de frequência desses valores. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi mapear as curvaturas do otólito em 3D, explorar os histogramas dos diferentes atributos, utilizá-los como descritor de forma de otólitos e aplicá-los como discriminante de espécies e relacioná-los a ontogenia.

Figura 21 – A representação gráfica da diferença entre as curvaturas 2D e 3D. a) Exemplo da curvatura em 2D no ponto p a partir do inverso do raio que o tangencia. b) Definição das curvaturas principais K_1 e K_2 utilizadas nas etapas de cálculo para a estimativa da curvatura no ponto p .



Fonte: Gauthier et al. (2017).

3.2 Materiais e Métodos

Foram utilizados 30 otólitos *sagittae*: sete de cavala-empinge, *Acanthocybium solandri* (Cuvier, 1829); oito de cirurgiã-azul, *Acanthurus coeruleus* (Bloch e Schneider, 1801); três de biquara, *Haemulon plumierii* (Lacepède, 1801); três de sardinha-laje, *Opisthonema oglinum* (Lesueur, 1818); dois de albacora-laje, *Thunnus albacares* (Bonnaterre, 1788) e sete de albacora-bandolim, *T. obesus* (Lowe, 1839) (Tabela 5). Os otólitos foram embutidos em um cubo de isopor e escaneados verticalmente em um dispositivo de μ TC. Foi utilizado um micro-tomógrafo modelo Nikon XT H 225 ST no Laboratório de Tomografia Computadorizada de Raios X do Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. Os parâmetros de aquisição utilizados foram 80 kV, 220 μ A e filtro de alumínio de 0,5 mm de espessura.

Para a visualização em 3D foi escrito um script (Apêndice A) para a extração dos pixel do contorno do otólito de cada projeção em 2D. A partir destas coordenadas x , y e z de cada pixel, foi utilizado o software MeshLab (CIGNONI et al., 2008) para a reconstrução em escala de cores para visualização iterativa e em 3D. A partir destas, podemos calcular e explorar os três atributos: curvatura Mean (K_m), curvatura Gaussian (K_g) e curvatura quadrada média da raiz (RMS) (K_{rms}). O K_m é a média do máximo e mínimo; o K_g é o produto deles e K_{rms} é a raiz quadrada da soma dos quadrados das direções principais.

Foram retirados os valores extremos, menores que 0,5% e maiores que 99,5% da distribuição acumulada. Posteriormente, foi realizado o teste de normalidade de Anderson-Darling e calculadas as estatísticas descritivas das distribuições (máximo, mínimo, média,

Tabela 5 – Comprimentos e idades observadas dos indivíduos utilizados no presente estudo. *Idades estimadas a partir das curvas de crescimento já publicados (STÉQUERT; PANFILI; DEAN, 1996; LESSA et al., 2008; DUARTE-NETO; HIGA; LESSA, 2012; MCBRIDE; RICHARDSON; MAKI, 2008). Ct = Comprimento total; Cf = Comprimento furcal e Cp = Comprimento padrão.

Imagens	Espécies	Comprimento	Idade	Voxel (μm)
AS02	<i>A. solandri</i>	159 Ct	5.53*	8
AS11	<i>A. solandri</i>	139.7 Ct	2.89*	7
AS12	<i>A. solandri</i>	142.3 Ct	3.13*	7
AS1294	<i>A. solandri</i>	155 Ct	4.73*	8
AS17	<i>A. solandri</i>	131 Ct	2.23*	7
AS28	<i>A. solandri</i>	151 Ct	4.11*	7
AS35	<i>A. solandri</i>	118 Ct	1.47*	6
AC36	<i>A. coeruleus</i>	10.9 Ct	1	3
AC37	<i>A. coeruleus</i>	24 Ct	5	3
AC38	<i>A. coeruleus</i>	22 Ct	4	3
AC39	<i>A. coeruleus</i>	24.9 Ct	4	3
AC40	<i>A. coeruleus</i>	26.2 Ct	4	3
AC41	<i>A. coeruleus</i>	25.8 Ct	6	3
AC42	<i>A. coeruleus</i>	32 Ct	15	5
AC43	<i>A. coeruleus</i>	30.1 Ct	8	5
HP09	<i>H. plumierii</i>	32.5 Ct	20	8
HP118	<i>H. plumierii</i>	26.6 Ct	14	6
HP150	<i>H. plumierii</i>	18.3 Ct	8	3
OO132	<i>O. oglinum</i>	18.9 Cp	0.73*	3
OO134	<i>O. oglinum</i>	14.8 Cp	0.52*	3
OO279	<i>O. oglinum</i>	18 Cp	0.68*	3
TA22	<i>T. albacares</i>	119 Cf	3*	11
TA119	<i>T. albacares</i>	120 Cf	3*	13
TO55	<i>T. obesus</i>	105.8 Cf	3.22*	10
TO70	<i>T. obesus</i>	142.7 Cf	5.59*	10
TO77	<i>T. obesus</i>	127.3 Cf	4.49*	10
TO78	<i>T. obesus</i>	157.3 Cf	6.85*	11
TO79	<i>T. obesus</i>	128.7 Cf	4.58*	10
TO83	<i>T. obesus</i>	138.7 Cf	5.29*	10
TO89	<i>T. obesus</i>	105.6 Cf	3.21*	9

mediana, desvio-padrão, assimetria e curtose). Rejeitada a hipótese de normalidade, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis para avaliar a diferença global e, em seguida, o *post-hoc* de Nemenyi afim de fazer uma comparação pareada e testar a discriminação por espécie. Todas as análises estatísticas foram executadas no R (R Core Team, 2018) com nível de significância de 0,05. Ainda em R foi criado um script (Apêndice C) que possibilita a visualização, manipulação e segmentação em 3D de maneira iterativa a partir dos atributos de curvatura Mean, Gaussian e RMS.

3.3 Resultados e Discussão

As distribuições dos atributos Mean, Gaussian e RMS (Figura 22) não foram normais para todas as imagens estudadas (Anderson-Darling; p -valor $< 0,05$). As estatísticas descritivas de cada imagem para cada atributo de curvatura estão nas tabelas 6, 7 e 8. A partir delas, observou-se que os Scombrídeos (*A. solandri*, *T. albacares* e *T. obesus*) tiveram maiores valores de máximo, média, mediana e desvio padrão, e menores valores de mínimo para as três distribuições. A figura 23 representa melhor essa diferença. O que explica esses maiores espectros de valores é a complexidade da superfície e do contorno dos otólitos destas espécies. Já as demais amostras apresentaram maiores frequências de valores centrados em zero, que representam superfícies planas, levemente curvadas e regulares, como biquara, cirurgia-azul e sardinha-laje (Figura 24).

Estas diferenças entre as distribuições dos atributos de curvatura por espécie foram testadas usando Kruskal-Wallis seguido por *post-hoc* de Nemenyi. As tabelas 9, 10 e 11 apresentam os p -valores para cada comparação e elas indicam que as curvaturas Mean e RMS são capazes de discriminar as espécies. Já a curvatura Gaussian não foi significativa para distinguir *T. albacares* de *A. solandri* (p -valor = 0.057) e *O. oglinum* e *H. plumieri* (p -valor = 0.071).

Existem descritores similares em estudos de análise de forma em 2D. Duarte-Neto et al. (2014) descreveram um parâmetro multifractal, o α_0 , como capaz de caracterizar as flutuações dos contornos dos otólitos, cujo os autores relacionaram às mudanças no metabolismo animal. Já Cañas et al. (2012) e Sadighzadeh et al. (2012) utilizaram a relação perímetro-área (P^2/A) como descritor da complexidade dos contornos dos otólitos. Entretanto, estes três trabalhos usaram imagens em 2D para analisar a linha de contorno e não a superfície dos otólitos como um todo. Enquanto que o presente trabalho analisou imagens em 3D, onde as flutuações das superfícies de ambas as faces e o contorno foram mensuradas.

Figura 22 – As curvaturas Mean, Gaussian e RMS do otólito de *Haemulon plumierii*, onde as cores na superfície estão representados nos respectivos histogramas.

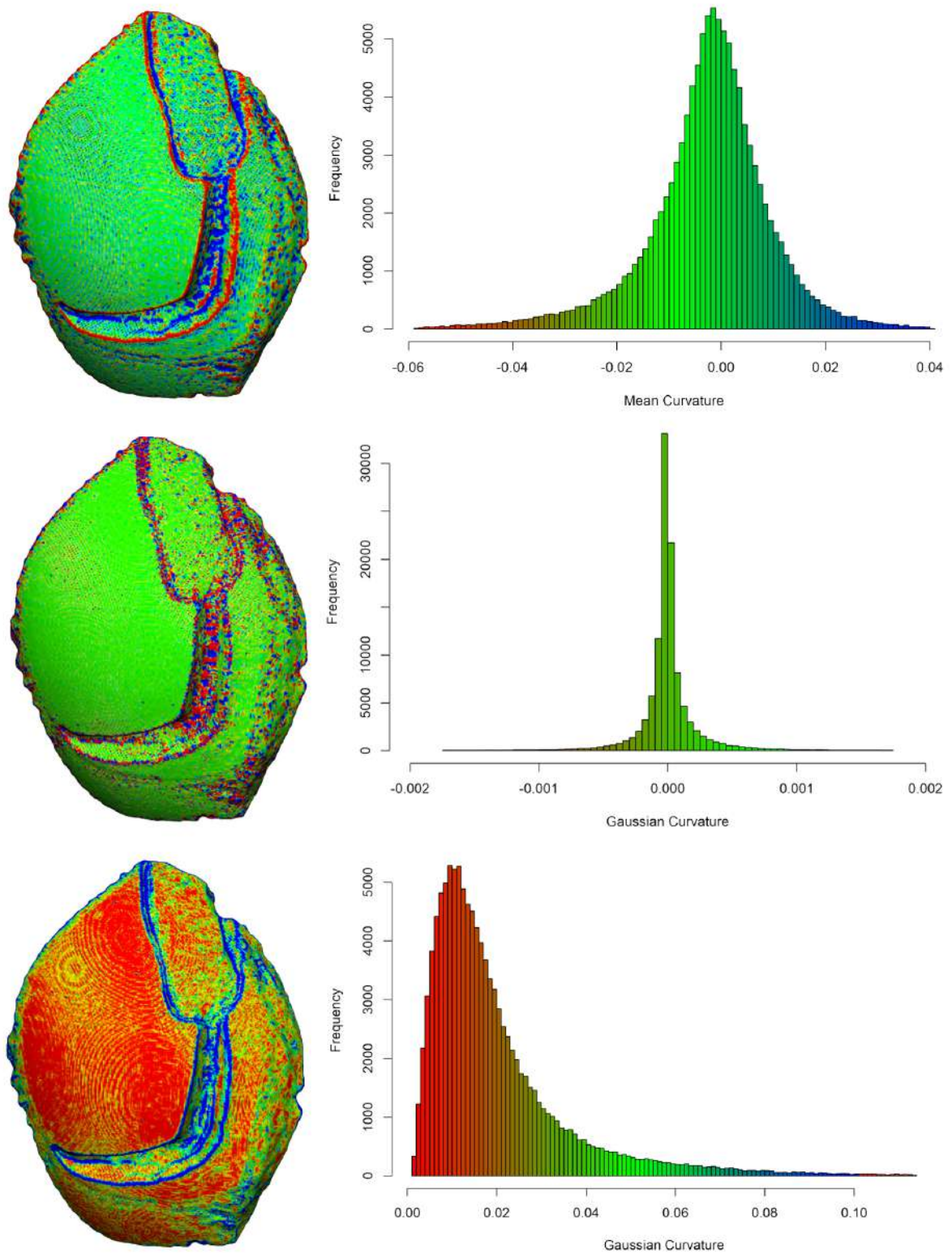


Tabela 6 – Descritores de histogramas de curvatura Mean para todas as imagens. Os valores foram ordenados a partir da idade crescente. Img = Imagem; Comp = Comprimento; Max = Máximo; Min = Mínimo; Med = Média; Medi = Mediana; DP = desvio padrão; Ass = Assimetria e Curt = Curtose.

Img	Comp	Idade	Max	Min	Med	Medi	DP	Ass	Curt
AC36	10.9	1	0.069	-0.076	0.004	0.003	0.018	-0.147	4.787
AC38	22	4	0.055	-0.055	-0.003	-0.003	0.014	-0.036	4.285
AC39	24.9	4	0.048	-0.054	-0.003	-0.003	0.014	-0.064	3.996
AC40	26.2	4	0.108	-0.123	0.003	0.003	0.021	-0.419	8.114
AC37	24	5	0.051	-0.048	0.003	0.003	0.013	0.053	4.088
AC41	25.8	6	0.059	-0.059	0.003	0.003	0.016	-0.060	4.280
AC43	30.1	8	0.055	-0.061	-0.003	-0.003	0.016	-0.108	4.243
AC42	32	15	0.054	-0.057	0.003	0.003	0.015	-0.193	4.147
AS35	118	1.47	0.151	-0.079	0.010	0.006	0.029	1.218	6.163
AS17	131	2.23	0.149	-0.075	0.009	0.005	0.028	1.274	6.657
AS11	139.7	2.89	0.089	-0.117	-0.006	-0.004	0.024	-0.534	5.757
AS12	142.3	3.13	0.075	-0.120	-0.006	-0.004	0.024	-0.753	5.611
AS28	151	4.11	0.139	-0.085	0.006	0.004	0.025	0.886	6.839
AS1294	155	4.73	0.119	-0.098	0.007	0.005	0.026	0.513	5.643
AS02	159	5.53	0.129	-0.105	0.006	0.005	0.029	0.329	5.135
HP150	18.3	8	0.032	-0.065	-0.003	-0.001	0.012	-1.130	6.246
HP118	26.6	14	0.040	-0.059	-0.003	-0.002	0.012	-0.690	5.351
HP09	32.5	20	0.043	-0.057	-0.003	-0.002	0.013	-0.477	4.719
OO134	14.8	0.52	0.080	-0.039	0.005	0.003	0.014	1.331	7.770
OO279	18	0.68	0.051	-0.085	-0.005	-0.003	0.016	-0.950	6.692
OO132	18.9	0.73	0.079	-0.050	0.005	0.003	0.015	0.848	6.270
TA119	119	3	0.113	-0.157	0.005	0.004	0.031	-0.482	6.421
TA22	120	3	0.137	-0.122	-0.005	-0.004	0.028	0.252	6.509
TO89	105.6	3.21	0.135	-0.185	0.003	0.004	0.035	-0.626	7.290
TO55	105.8	3.22	0.137	-0.142	0.006	0.005	0.033	0.056	5.668
TO77	127.3	4.49	0.129	-0.159	0.005	0.005	0.033	-0.431	6.080
TO79	128.7	4.58	0.137	-0.182	0.005	0.004	0.037	-0.511	6.240
TO83	138.7	5.29	0.117	-0.157	0.005	0.004	0.031	-0.527	6.687
TO70	142.7	5.59	0.117	-0.117	-0.006	-0.004	0.028	0.026	5.336
TO78	157.3	6.85	0.151	-0.121	-0.005	-0.004	0.029	0.364	6.868

Tabela 7 – Descritores de histogramas de curvatura Gaussian para todas as imagens. Os valores foram ordenados a partir da idade crescente. Img = Imagem; Comp = Comprimento; Max = Máximo; Min = Mínimo; Med = Média; Medi = Mediana; DP = desvio padrão; Ass = Assimetria e Curt = Curtose.

Img	Comp	Idade	Max	Min	Med	Medi	DP	Ass	Curt
AC36	10.9	1	0.005	-0.005	0.000	0.000	0.001	0.267	14.619
AC38	22	4	0.002	-0.002	0.000	0.000	0.000	0.533	11.868
AC39	24.9	4	0.002	-0.002	0.000	0.000	0.000	0.401	9.675
AC40	26.2	4	0.015	-0.015	0.000	0.000	0.001	-0.464	48.212
AC37	24	5	0.001	-0.001	0.000	0.000	0.000	0.249	6.729
AC41	25.8	6	0.003	-0.003	0.000	0.000	0.001	0.808	13.657
AC43	30.1	8	0.003	-0.002	0.000	0.000	0.000	0.814	11.552
AC42	32	15	0.002	-0.003	0.000	0.000	0.000	-0.773	10.373
AS35	118	1.47	0.016	-0.023	0.000	0.000	0.002	-1.596	31.428
AS17	131	2.23	0.017	-0.015	0.000	0.000	0.002	1.060	28.614
AS11	139.7	2.89	0.010	-0.010	0.000	0.000	0.001	0.877	23.820
AS12	142.3	3.13	0.010	-0.009	0.000	0.000	0.001	0.795	23.307
AS28	151	4.11	0.011	-0.013	0.000	0.000	0.001	-0.422	29.451
AS1294	155	4.73	0.011	-0.010	0.000	0.000	0.001	1.317	22.892
AS02	159	5.53	0.015	-0.011	0.000	0.000	0.002	1.554	22.338
HP150	18.3	8	0.002	-0.002	0.000	0.000	0.000	1.289	20.813
HP118	26.6	14	0.002	-0.002	0.000	0.000	0.000	0.482	15.202
HP09	32.5	20	0.002	-0.002	0.000	0.000	0.000	0.515	12.355
OO134	14.8	0.52	0.003	-0.003	0.000	0.000	0.000	1.311	23.560
OO279	18	0.68	0.005	-0.004	0.000	0.000	0.001	1.566	22.022
OO132	18.9	0.73	0.004	-0.003	0.000	0.000	0.001	1.227	20.590
TA119	119	3	0.021	-0.016	0.000	0.000	0.002	1.311	25.270
TA22	120	3	0.023	-0.015	0.000	0.000	0.002	1.952	34.595
TO89	105.6	3.21	0.039	-0.023	0.000	0.000	0.003	2.368	36.604
TO55	105.8	3.22	0.021	-0.021	0.000	0.000	0.003	0.546	21.928
TO77	127.3	4.49	0.027	-0.020	0.000	0.000	0.003	1.269	24.904
TO79	128.7	4.58	0.037	-0.023	0.000	0.000	0.004	1.951	28.056
TO83	138.7	5.29	0.025	-0.015	0.000	0.000	0.002	2.505	32.546
TO70	142.7	5.59	0.015	-0.015	0.000	0.000	0.002	0.532	22.443
TO78	157.3	6.85	0.022	-0.022	0.000	0.000	0.002	-0.134	28.897

Tabela 8 – Descritores de histogramas de curvatura RMS para todas as imagens. Os valores foram ordenados a partir da idade crescente. Img = Imagem; Comp = Comprimento; Max = Máximo; Min = Mínimo; Med = Média; Medi = Mediana; DP = desvio padrão; Ass = Assimetria e Curt = Curtose.

Img	Comp	Idade	Max	Min	Med	Medi	DP	Ass	Curt
AC36	10.9	1	0.158	0.004	0.031	0.025	0.023	1.832	7.228
AC38	22	4	0.116	0.003	0.025	0.02	0.018	1.706	6.544
AC39	24.9	4	0.108	0.003	0.025	0.02	0.016	1.571	6.004
AC40	26.2	4	0.272	0.003	0.034	0.024	0.033	3.234	16.775
AC37	24	5	0.103	0.003	0.024	0.019	0.016	1.648	6.307
AC41	25.8	6	0.126	0.004	0.027	0.022	0.019	1.704	6.562
AC43	30.1	8	0.122	0.003	0.027	0.021	0.019	1.623	6.08
AC42	32	15	0.116	0.004	0.026	0.022	0.018	1.583	6.123
AS35	118	1.47	0.335	0.003	0.047	0.032	0.046	2.333	9.675
AS17	131	2.23	0.282	0.003	0.043	0.028	0.042	2.249	8.736
AS11	139.7	2.89	0.247	0.003	0.039	0.028	0.034	2.289	9.748
AS12	142.3	3.13	0.231	0.004	0.039	0.029	0.034	2.128	8.511
AS28	151	4.11	0.283	0.003	0.04	0.028	0.038	2.576	11.517
AS1294	155	4.73	0.243	0.003	0.041	0.028	0.038	2.032	7.719
AS02	159	5.53	0.267	0.003	0.048	0.035	0.041	1.913	7.404
HP150	18.3	8	0.119	0.003	0.02	0.015	0.016	2.465	10.636
HP118	26.6	14	0.114	0.002	0.02	0.015	0.016	2.137	8.719
HP09	32.5	20	0.112	0.003	0.022	0.017	0.017	1.944	7.714
OO134	14.8	0.52	0.146	0.003	0.022	0.015	0.021	2.61	11.185
OO279	18	0.68	0.16	0.003	0.026	0.018	0.024	2.285	9.176
OO132	18.9	0.73	0.151	0.003	0.025	0.018	0.022	2.401	10.086
TA119	119	3	0.304	0.005	0.049	0.033	0.045	1.956	7.652
TA22	120	3	0.293	0.003	0.045	0.03	0.042	2.202	9.118
TO89	105.6	3.21	0.353	0.003	0.052	0.034	0.051	2.162	8.687
TO55	105.8	3.22	0.322	0.003	0.054	0.038	0.047	2	7.86
TO77	127.3	4.49	0.317	0.003	0.054	0.038	0.047	1.924	7.55
TO79	128.7	4.58	0.342	0.003	0.058	0.042	0.052	1.851	7.104
TO83	138.7	5.29	0.302	0.003	0.048	0.034	0.044	2.115	8.623
TO70	142.7	5.59	0.265	0.005	0.046	0.034	0.04	1.89	7.363
TO78	157.3	6.85	0.311	0.004	0.047	0.032	0.045	2.234	9.042

Figura 23 – Diagramas de caixa da comparação das distribuições das curvaturas Mean, Gaussian e RMS para cada imagem utilizada. As letras acima representam a diferença significativa. AS = *A. solandri*; AC = *A. coeruleus*; HP = *H. plumierii*; OO = *O. oglinum*; TA = *T. albacares* e TO = *T. obesus*.

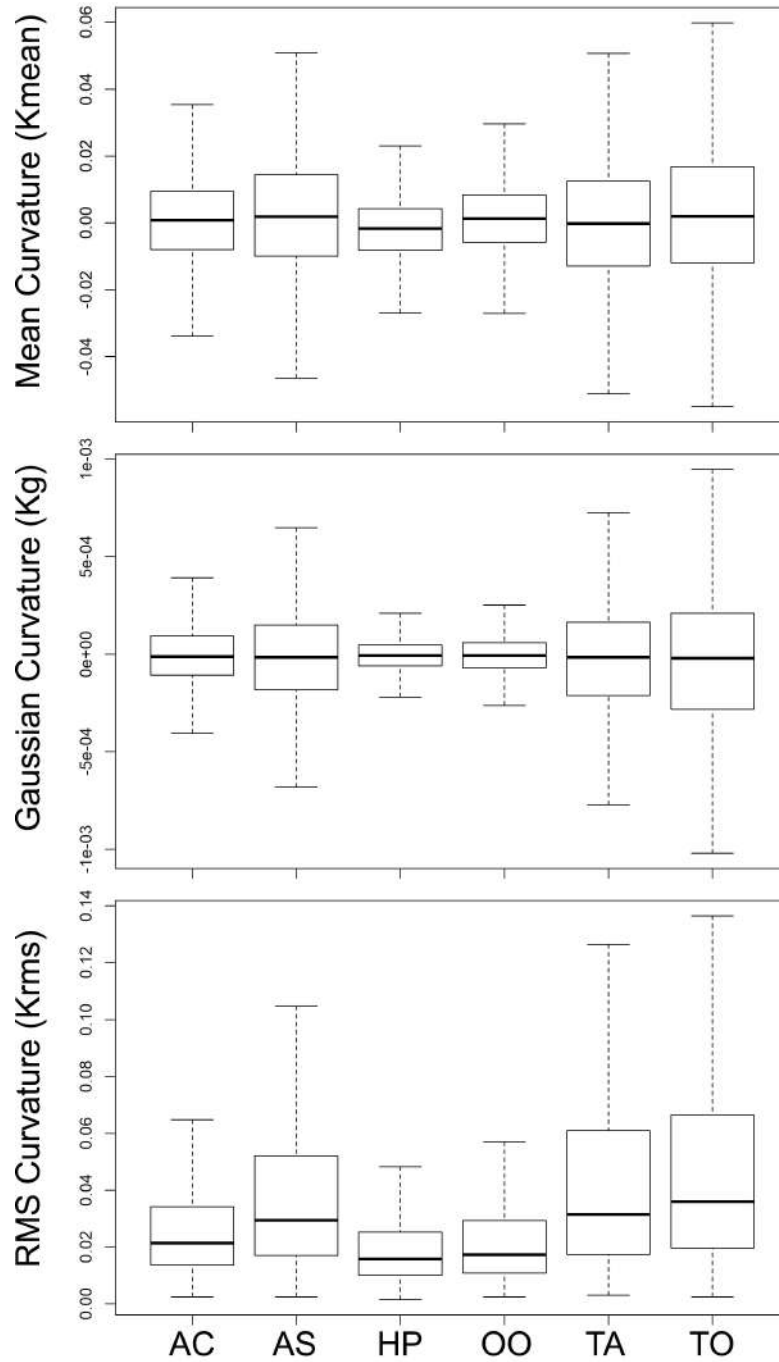


Figura 24 – Comparação das densidades de probabilidades dos atributos de curvaturas Mean, Gaussian e RMS. As imagens dos otólitos são referentes aos valores extremos. As linhas verticais e contínuas cinza indicam o zero no eixo x referentes as curvaturas Mean e Gaussian. AS = *A. solandri*; AC = *A. coeruleus*; HP = *H. plumierii*; OO = *O. oglinum*; TA = *T. albacares* e TO = *T. obesus*.

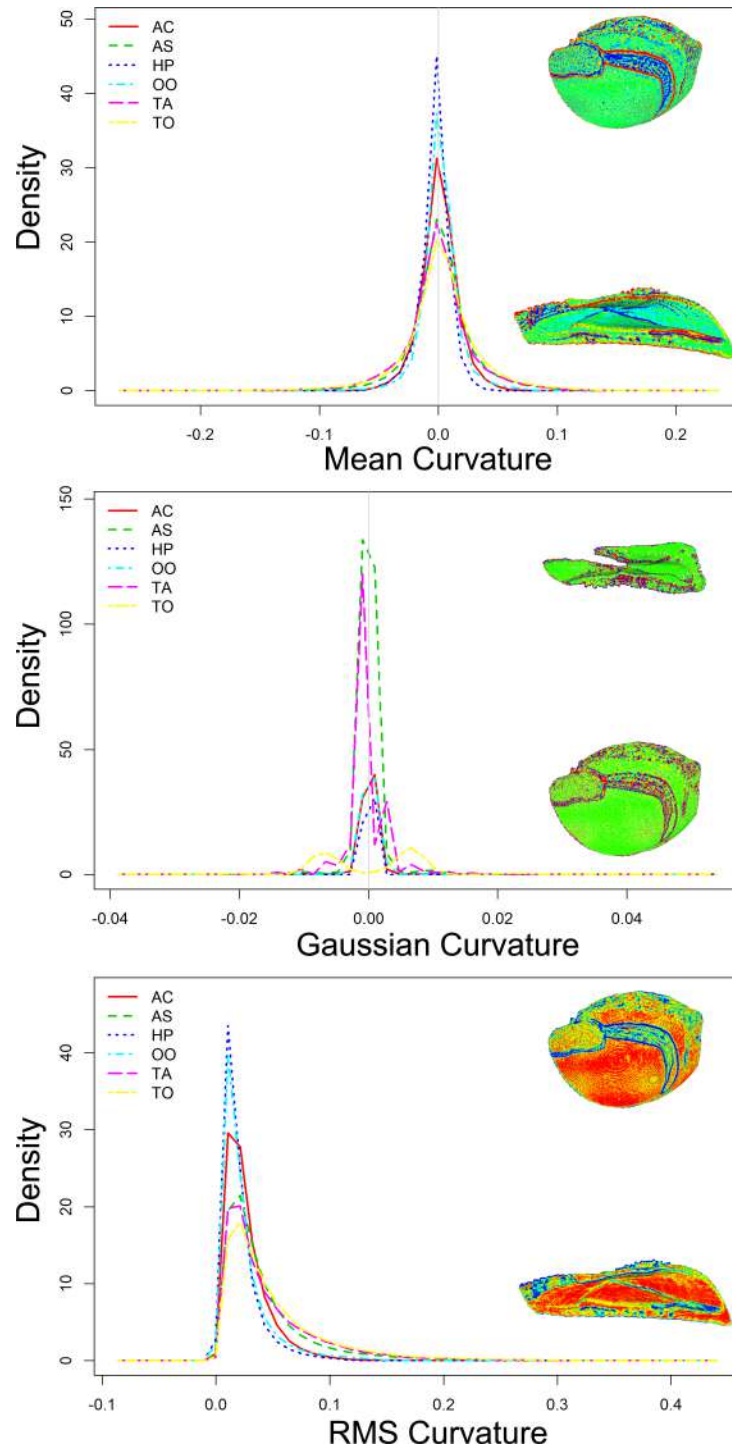


Tabela 9 – p -valores dos testes de Nemenyi para a curvatura Mean. AS = *A. solandri*; AC = *A. coeruleus*; HP = *H. plumierii*; OO = *O. oglinum*; TA = *T. albacares* e TO = *T. obesus*.

	AC	AS	HP	OO	TA
AS	<2.00E-16	-	-	-	-
HP	<2.00E-16	<2.00E-16	-	-	-
OO	<2.00E-16	5.30E-14	<2.00E-16	-	-
TA	<2.00E-16	<2.00E-16	<2.00E-16	<2.00E-16	-
TO	<2.00E-16	0.0034	<2.00E-16	1.60E-09	<2.00E-16

Tabela 10 – p -valores dos testes de Nemenyi para a curvatura Gaussian. AS = *A. solandri*; AC = *A. coeruleus*; HP = *H. plumierii*; OO = *O. oglinum*; TA = *T. albacares* e TO = *T. obesus*.

	AC	AS	HP	OO	TA
AS	<2.00E-16	-	-	-	-
HP	<2.00E-16	<2.00E-16	-	-	-
OO	<2.00E-16	<2.00E-16	0.071	-	-
TA	<2.00E-16	0.057	<2.00E-16	<2.00E-16	-
TO	<2.00E-16	<2.00E-16	<2.00E-16	<2.00E-16	<2.20E-11

Tabela 11 – p -valores dos testes de Nemenyi para a curvatura RMS. AS = *A. solandri*; AC = *A. coeruleus*; HP = *H. plumierii*; OO = *O. oglinum*; TA = *T. albacares* e TO = *T. obesus*.

	AC	AS	HP	OO	TA
AS	<2.00E-16	-	-	-	-
HP	<2.00E-16	<2.00E-16	-	-	-
OO	<2.00E-16	<2.00E-16	<2.00E-16	-	-
TA	<2.00E-16	<2.00E-16	<2.00E-16	<2.00E-16	-
TO	<2.00E-16	<2.00E-16	<2.00E-16	<2.00E-16	<2.00E-16

Diversos estudos utilizaram análise de imagens em 2D com morfometria linear, índices de forma e/ou descritores modernos para discriminar espécies (TUSET et al., 2010; AFANASYEV; ORLOV; ROLSKY, 2017), ontogenia (HÜSSY, 2008; DUARTE-NETO et al., 2014) e estoques pesqueiros (CAMPANA; CASSELMAN, 1993; DUARTE-NETO et al., 2008). Desde o primeiro trabalho usando imagens 3D de otólitos (HAMRIN et al., 1999), apenas um trabalho focou em descrever e aplicar um descritor em 3D (MARTI-PUIG et al., 2015), onde os autores usaram subamostragem dos pontos na superfície do otólito e aplicaram expansão de Fourier para as coordenadas x , y e z destes pontos. Em contrapartida, o presente estudo utilizou todos os pontos amostrados.

Na ontogenia, verificou-se que é possível distinguir as formas dos otólitos por idade usando os atributos de curvatura a partir do teste de Kruskal-Wallis seguido por *post-hoc* de Nemenyi. As figuras 25, 26 e 27 exibem as densidades de probabilidade por imagem para os atributos de curvatura Mean, Gaussian e RMS, respectivamente. A amplitude das curvas indicam a complexidade das formas, enquanto que a altura da curva sugere um formato regular. Já para as distribuições de Mean foi possível identificar que a assimetria representa a predominância dos pontos críticos, assimetria positiva para superfícies ascendentes e negativa para descendentes. Entretanto, a acurácia da classificação variou entre as espécies, entre a diferença das idades e entre os atributos. Assim, a curvatura RMS discriminou corretamente as fases iniciais, de transição e as formas adultas, as quais tendem a permanecer regular o restante da vida.

A partir da figura 28 observou-se que os valores negativos da curvatura Mean representam vales, como o contorno dos otólitos e do *sulcus acusticus*, enquanto que os valores positivos retrataram picos no relevo, como na face externa dos otólitos. Esses e outros valores podem ser usado como critério de segmentação, como no caso do *sulcus acusticus*. O RMS identificou mudanças bruscas, similares ao Mean, mas sem discriminar picos e vales como valores positivos e negativos. Já o atributo Gaussian não descreveu nenhuma estrutura na superfície dos otólitos. Existem diversos atributos de curvatura (ROBERTS, 2001), além da possibilidade da criação de outras usando o K_1 e K_2 . Entretanto, não foi encontrado nenhum trabalho que tenha utilizado curvatura da superfície dos otólitos.

Figura 25 – Comparação das densidades de probabilidades do atributo da curvatura Mean. A legenda de cada gráfico contém os rótulos de cada linha, juntamente com os contrastes (*post-hoc* de Nemenyi < 0.05), indicando diferença significativa entre as imagens. Os números ao lado do contraste são referentes às idades em anos dos respectivos indivíduos. A) *A. solandri*; B) *A. coeruleus*; C) *H. plumierii*; D) *O. oglinum*; E) *T. albacares* e F) *T. obesus*.

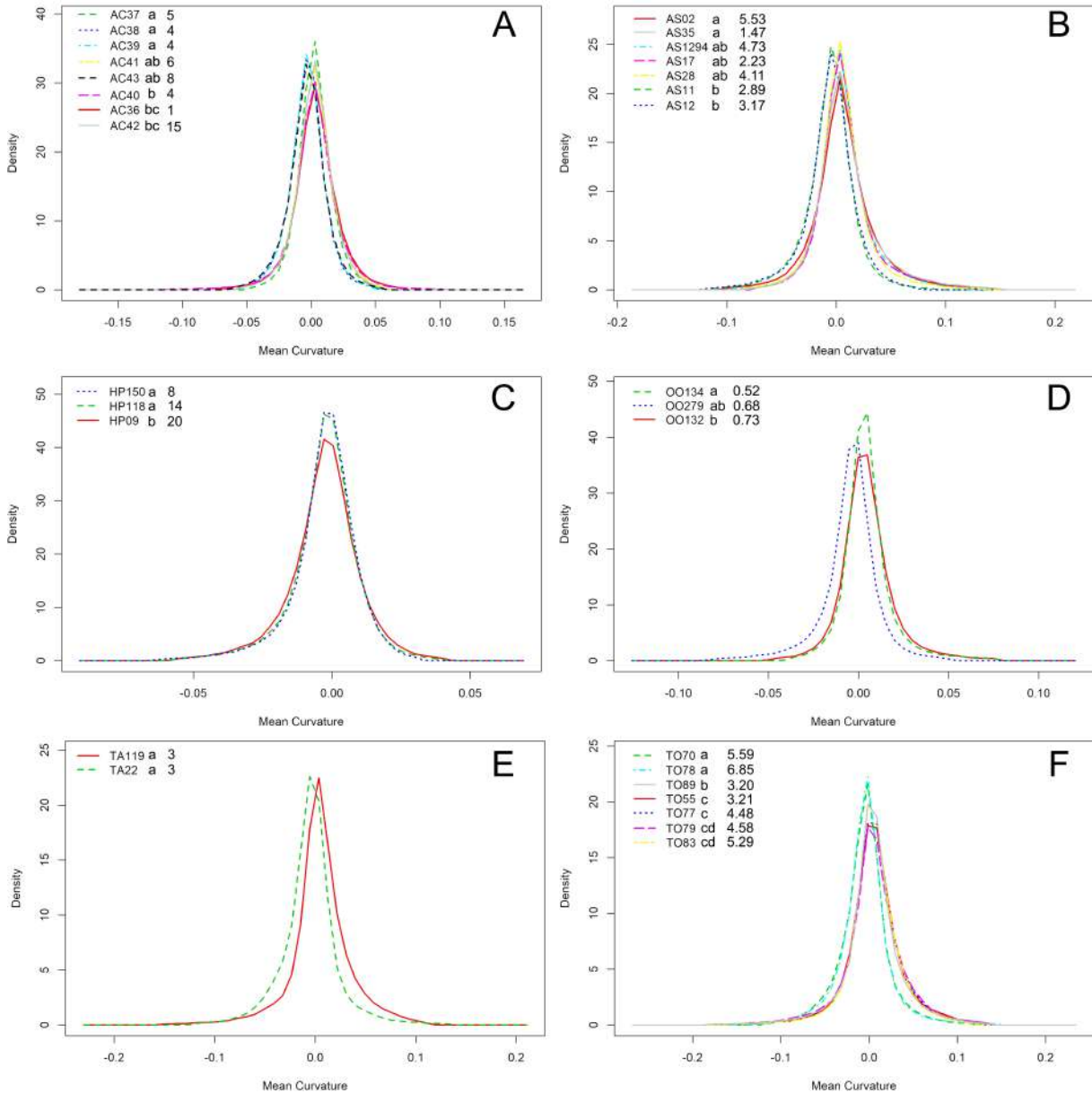


Figura 26 – Comparação das densidades de probabilidades do atributo da curvatura Gaussian. A legenda de cada gráfico contém os rótulos de cada linha, juntamente com os contrastes (*post-hoc* de Nemenyi < 0.05), indicando diferença significativa entre as imagens. Os números ao lado do contraste são referentes às idades em anos dos respectivos indivíduos. A) *A. solandri*; B) *A. coeruleus*; C) *H. plumierii*; D) *O. oglinum*; E) *T. albacares* e F) *T. obesus*.

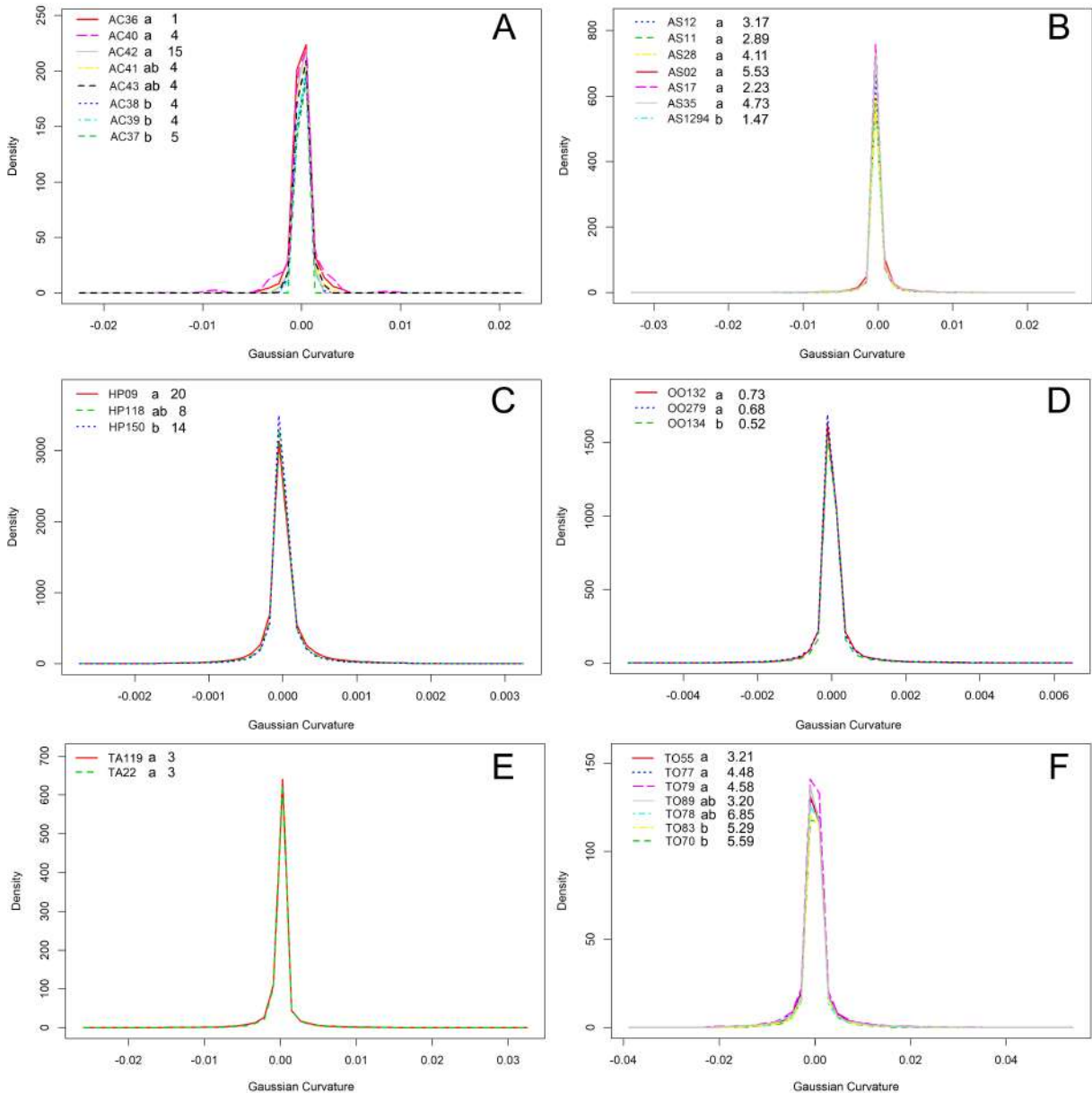


Figura 27 – Comparação das densidades de probabilidades do atributo da curvatura RMS. A legenda de cada gráfico contém os rótulos de cada linha, juntamente com os contrastes (*post-hoc* de Nemenyi < 0.05), indicando diferença significativa entre as imagens. Os números ao lado do contraste são referentes às idades em anos dos respectivos indivíduos. A) *A. solandri*; B) *A. coeruleus*; C) *H. plumierii*; D) *O. oglinum*; E) *T. albacares* e F) *T. obesus*.

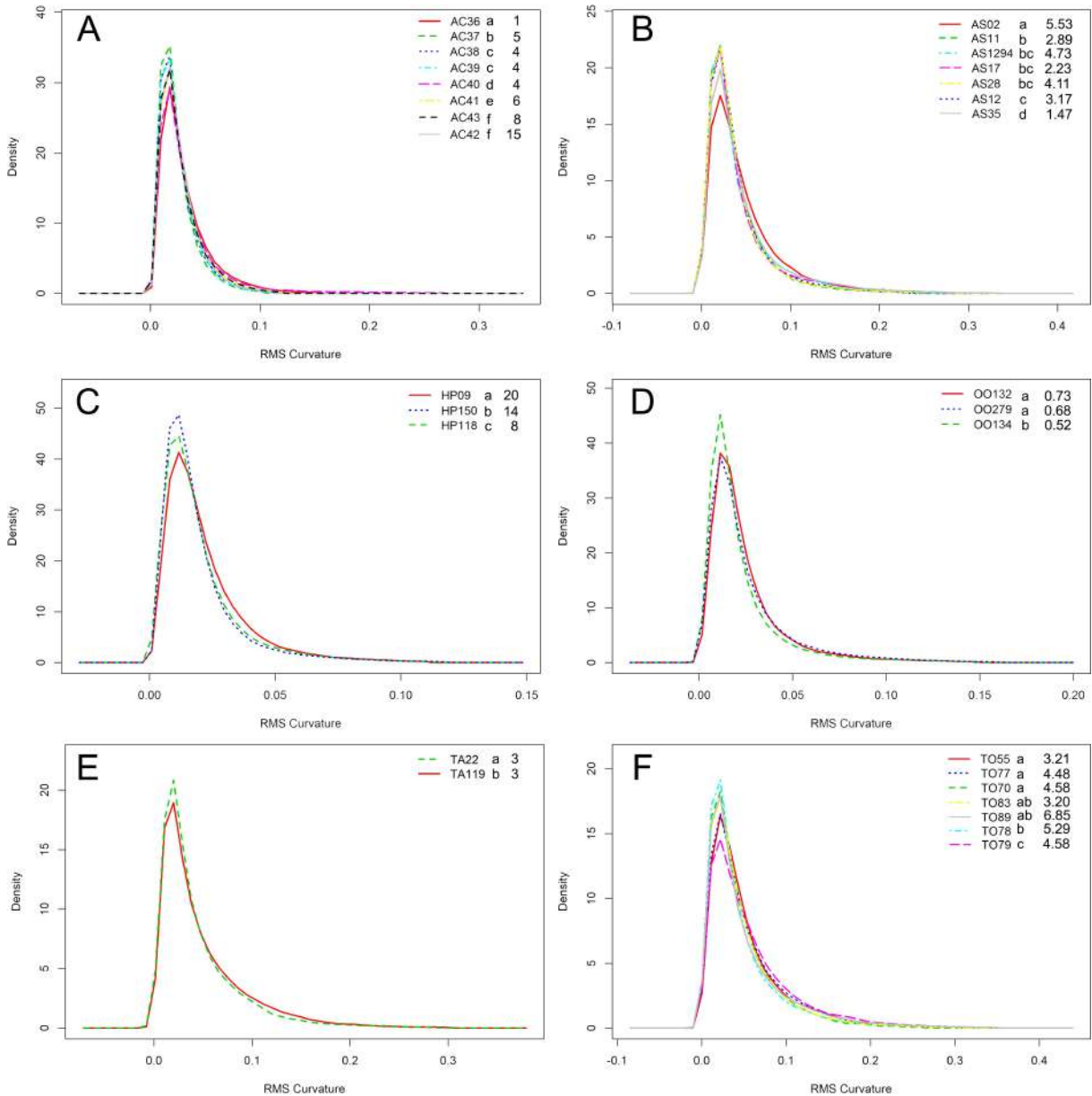
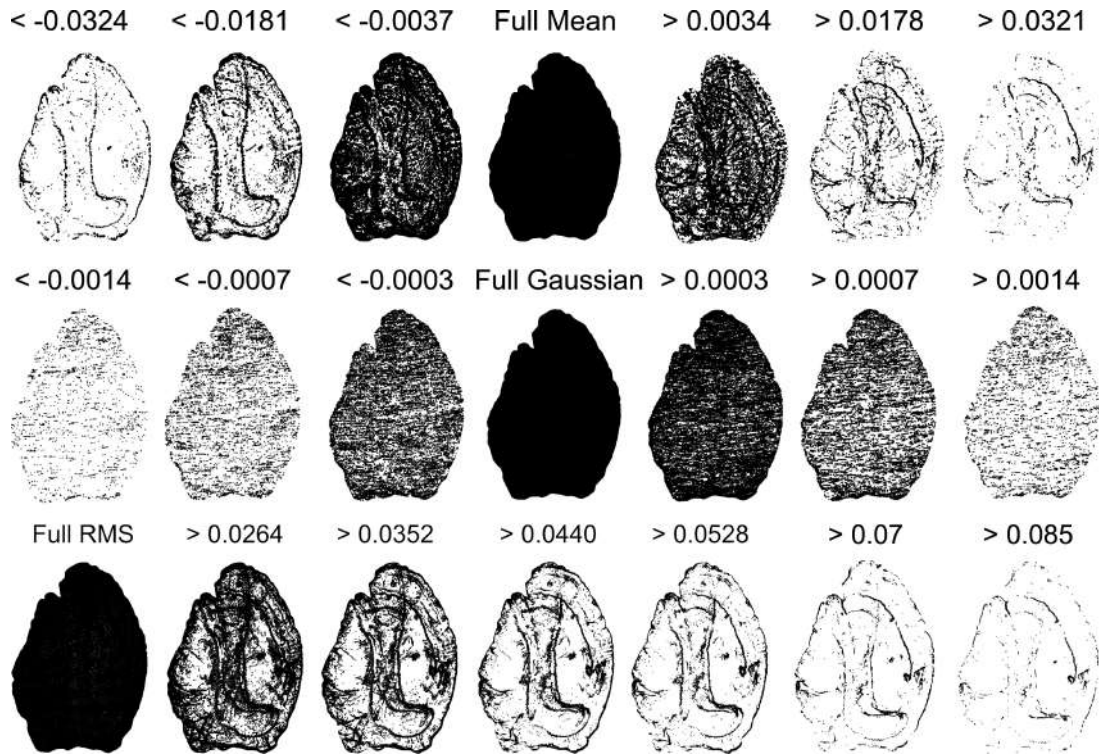


Figura 28 – Segmentação usando os atributos de curvaturas Mean, Gaussian e RMS. As imagens Full Mean, Full Gaussian e Full RMS correspondem a todo espectro de valores. Os números acima das imagens são referentes aos filtros aplicados e seu respectivo resultado.



3.4 Conclusão

Neste trabalho foram utilizados três atributos da curvatura aplicados a otólitos em 3D. Dentre eles, as curvaturas Mean e RMS mostraram-se capazes de diferenciar entre as espécies estudadas e a diferença entre as idades. Ademais, ambas aparentaram poder de segmentação do *sulcus acusticus* e potencial para discernir a complexidade da superfície e do contorno dos otólitos como uma assinatura única para as espécies estudadas. Espera-se ampliar o número de espécies, explorar a curvatura na ontogenia e propor outros atributos como medidas descritivas e classificadoras de otólitos.

4 Considerações Finais

O presente estudo experimentou sistematicamente diversas configurações tomográficas, afim de estabelecer um protocolo de aquisição ótimo para imagens em 3D de otólitos *sagittae* usando tomografia computadorizada convencional. Posteriormente, algumas aplicações e testes foram feitos a partir destas imagens.

No capítulo 2 está descrito com detalhes o procedimento durante a aquisição das imagens tomográficas de otólitos *sagittae*, juntamente com o diagnóstico imparcial para a eleição da configuração ótima dos parâmetros tomográficos. Ao fim, foi definido que voltagens médias (70 e 80 kV) com filtro de alumínio de 0,5 mm de espessura podem ser utilizados para a obtenção das imagens. E, em seguida, algumas possíveis aplicações e comparações sob a perspectiva ontogenética e filogenética.

Já o capítulo 3 deu prosseguimento as possibilidades de aplicações às imagens 3D, onde foi proposto o uso da curvatura da superfície dos otólitos como descritor da forma. Com as distribuições dos seus atributos foi possível discriminar as espécies estudadas, mapear tridimensionalmente o relevo dos otólitos e sugerir esta medida como critério para segmentar o *sulcus acusticus*.

O uso de tomografia computadorizada no estudo de otólitos é recente e ainda pouco estudado. Apesar disto, provou-se que esta ferramenta tem grande potencial para a ictiologia. E tendo em vista a variação nas estruturas externas mapeadas pela curvatura e na complexidade interna da radiodensidade, se faz necessário explorar diferentes espécies, habitats e os outros pares de otólitos (*lapillus* e *asteriscus*).

Referências Bibliográficas

- ADDADI, L.; RAZ, S.; WEINER, S. Taking advantage of disorder: amorphous calcium carbonate and its roles in biomineralization. **Advanced Materials**, Wiley Online Library, v. 15, n. 12, p. 959–970, 2003.
- AFANASYEV, P.; ORLOV, A.; ROLSKY, A. Y. Otolith shape analysis as a tool for species identification and studying the population structure of different fish species. **Biology Bulletin**, Springer, v. 44, n. 8, p. 952–959, 2017.
- ALEXANDER, R. Physical aspects of swimbladder function. **Biological Reviews**, Wiley Online Library, v. 41, n. 1, p. 141–176, 1966.
- ARNERI, E. et al. Fish ageing by otolith shape analysis: Final report to the european commission. [sn], 2002.
- ASSIS, C. The lagenar otoliths of teleosts: their morphology and its application in species identification, phylogeny and systematics. **Journal of Fish Biology**, Wiley Online Library, v. 62, n. 6, p. 1268–1295, 2003.
- ASZÓDI, A. et al. Mammalian skeletogenesis and extracellular matrix. what can we learn from knockout mice? **Cell structure and function**, Japan Society for Cell Biology, v. 25, n. 2, p. 73–84, 2000.
- BAILEY, K. et al. Three-dimensional imaging of walleye pollock otoliths: reconstruction from serial sections and fluorescent laser cytometry. **Journal of fish biology**, Wiley Online Library, v. 47, n. 4, p. 671–678, 1995.
- BARRETT, J. F.; KEAT, N. Artifacts in ct: recognition and avoidance 1. **Radiographics**, Radiological Society of North America, v. 24, n. 6, p. 1679–1691, 2004.
- BIGNAMI, S. et al. Ocean acidification alters the otoliths of a pantropical fish species with implications for sensory function. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, National Acad Sciences, v. 110, n. 18, p. 7366–7370, 2013.
- BOAS, F. E.; FLEISCHMANN, D. Ct artifacts: causes and reduction techniques. **Imaging in Medicine**, Future Medicine, v. 4, n. 2, p. 229–240, 2012.
- BOLLES, K. L.; BEGG, G. A. Distinction between silver hake (*merluccius bilinearis*) stocks in us waters of the northwest atlantic based on whole otolith morphometrics. **Fishery Bulletin**, National Marine Fisheries Service, v. 98, n. 3, p. 451–451, 2000.
- BORELLI, G. et al. Biochemical relationships between endolymph and otolith matrix in the trout (*oncorhynchus mykiss*) and turbot (*psetta maxima*). **Calcified tissue international**, Springer, v. 69, n. 6, p. 356–364, 2001.

- BOWEN, C. A. et al. Vateritic sagitta in wild and stocked lake trout: applicability to stock origin. **Transactions of the American Fisheries Society**, Taylor & Francis, v. 128, n. 5, p. 929–938, 1999.
- BRADBURY, I. R. et al. Resolving natal tags using otolith geochemistry in an estuarine fish, rainbow smelt *osmerus mordax*. **Marine Ecology Progress Series**, v. 433, p. 195–204, 2011.
- BROWNING, Z. S. et al. The effect of otolith malformation on behavior and cortisol levels in juvenile red drum fish (*sciaenops ocellatus*). **Comparative Medicine**, American Association for Laboratory Animal Science, v. 62, n. 4, p. 251–256, 2012.
- BUDOFF, M. J.; SHINBANE, J. S. **Cardiac CT imaging: diagnosis of cardiovascular disease**. [S.l.]: Springer, 2016.
- BUZUG, T. M. **Computed tomography: from photon statistics to modern cone-beam CT**. [S.l.]: Springer Science & Business Media, 2008.
- CADRIN, S. X.; KERR, L. A.; MARIANI, S. **Stock identification methods: applications in fishery science**. [S.l.]: Academic Press, 2013.
- CAMPANA, S. Accuracy, precision and quality control in age determination, including a review of the use and abuse of age validation methods. **Journal of fish biology**, Wiley Online Library, v. 59, n. 2, p. 197–242, 2001.
- CAMPANA, S. E. Feeding periodicity and the production of daily growth increments in otoliths of steelhead trout (*salmo gairdneri*) and starry flounder (*platichthys stellatus*). **Canadian Journal of Zoology**, NRC Research Press, v. 61, n. 7, p. 1591–1597, 1983.
- CAMPANA, S. E. Chemistry and composition of fish otoliths: pathways, mechanisms and applications. **Marine Ecology Progress Series**, v. 188, p. 263–297, 1999.
- CAMPANA, S. E. **Photographic Atlas of Fish Otoliths of the Northwest Atlantic Ocean Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences No. 133**. [S.l.]: NRC Research Press, 2004.
- CAMPANA, S. E.; CASSELMAN, J. M. Stock discrimination using otolith shape analysis. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, NRC Research Press, v. 50, n. 5, p. 1062–1083, 1993.
- CAMPANA, S. E.; NEILSON, J. D. Microstructure of fish otoliths. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, NRC Research Press, v. 42, n. 5, p. 1014–1032, 1985.
- CAMPANA, S. E.; THORROLD, S. R. Otoliths, increments, and elements: keys to a comprehensive understanding of fish populations? **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, NRC Research Press, v. 58, n. 1, p. 30–38, 2001.
- CAMPANA, S. E. et al. Comparison of accuracy, precision, and sensitivity in elemental assays of fish otoliths using the electron microprobe, proton-induced x-ray emission, and laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, NRC Research Press, v. 54, n. 9, p. 2068–2079, 1997.

- CANÑÁS, L. et al. Use of the otolith shape analysis in stock identification of anglerfish (*lophius piscatorius*) in the northeast atlantic. **ICES Journal of Marine Science**, Oxford University Press, v. 69, n. 2, p. 250–256, 2012.
- CARDINALE, M. et al. Effects of sex, stock, and environment on the shape of known-age atlantic cod (*gadus morhua*) otoliths. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, NRC Research Press, v. 61, n. 2, p. 158–167, 2004.
- CARLSTRÖM, D. A crystallographic study of vertebrate otoliths. **Biological bulletin**, JSTOR, v. 125, n. 3, p. 441–463, 1963.
- CASSELMAN, J. M. Growth and relative size of calcified structures of fish. **Transactions of the American Fisheries Society**, Taylor & Francis, v. 119, n. 4, p. 673–688, 1990.
- CASTONGUAY, M.; SIMARD, P.; GAGNON, P. Usefulness of fourier analysis of otolith shape for atlantic mackerel (*scomber scombrus*) stock discrimination. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, NRC Research Press, v. 48, n. 2, p. 296–302, 1991.
- CIGNONI, P. et al. MeshLab: an Open-Source Mesh Processing Tool. In: SCARANO, V.; CHIARA, R. D.; ERRA, U. (Ed.). **Eurographics Italian Chapter Conference**. [S.l.]: The Eurographics Association, 2008. ISBN 978-3-905673-68-5.
- CURIN-OSORIO, S.; CUBILLOS, L. A.; CHONG, J. On the intraspecific variation in morphometry and shape of sagittal otoliths of common sardine, *strangomera bentincki*, off central-southern chile. **Scientia Marina**, v. 76, n. 4, p. 659–666, 2012.
- DAVID, A. W.; GRIMES, C. B.; ISELY, J. J. Vaterite sagittal otoliths in hatchery-reared juvenile red drums. **The Progressive Fish-Culturist**, Taylor & Francis, v. 56, n. 4, p. 301–303, 1994.
- DEVRIES, D. A.; GRIMES, C. B.; PRAGER, M. H. Using otolith shape analysis to distinguish eastern gulf of mexico and atlantic ocean stocks of king mackerel. **Fisheries Research**, Elsevier, v. 57, n. 1, p. 51–62, 2002.
- DIEZ, M. E. et al. Shell damage in the tehuelche scallop *aequipecten tehuelchus* caused by *polydora rickettsi* (polychaeta: Spionidae) infestation. **Journal of invertebrate pathology**, Elsevier, v. 114, n. 2, p. 107–113, 2013.
- DISSPAIN, M. C.; ULM, S.; GILLANDERS, B. M. Otoliths in archaeology: methods, applications and future prospects. **Journal of Archaeological Science: Reports**, Elsevier, v. 6, p. 623–632, 2016.
- DU, C.-J. et al. 3d time series analysis of cell shape using laplacian approaches. **BMC bioinformatics**, BioMed Central Ltd, v. 14, n. 1, p. 296, 2013.
- DUARTE-NETO, P.; HIGA, F. M.; LESSA, R. P. Age and growth estimation of bigeye tuna, *thunnus obesus* (teleostei: Scombridae) in the southwestern atlantic. **Neotropical Ichthyology**, SciELO Brasil, v. 10, n. 1, p. 148–158, 2012.

- DUARTE-NETO, P. et al. The use of sagittal otoliths in discriminating stocks of common dolphinfish (*Coryphaena hippurus*) off northeastern Brazil using multishape descriptors. **ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil**, Oxford University Press, v. 65, n. 7, p. 1144–1152, 2008.
- DUARTE-NETO, P. et al. Multifractal properties of a closed contour: A peek beyond the shape analysis. **PloS one**, Public Library of Science, v. 9, n. 12, p. e115262, 2014.
- DUNKELBERGER, D. G.; DEAN, J. M.; WATABE, N. The ultrastructure of the otolithic membrane and otolith in the juvenile mummichog, *Fundulus heteroclitus*. **Journal of Morphology**, Wiley Online Library, v. 163, n. 3, p. 367–377, 1980.
- FAY, R. R.; POPPER, A. N. Structure and function in teleost auditory systems. In: **Comparative studies of hearing in vertebrates**. [S.l.]: Springer, 1980. p. 3–42.
- FERMIN, C. et al. Otoconia biogenesis, phylogeny, composition and functional attributes. **Histology and histopathology**, v. 13, p. 1103–1154, 1998.
- FISHER, M.; HUNTER, E. Digital imaging techniques in otolith data capture, analysis and interpretation. **Marine Ecology Progress Series**, v. 598, p. 213–231, 2018.
- FÜRST, A. et al. Effect of age on bone mineral density and micro architecture in the radius and tibia of horses: an extreme computed tomographic study. **BMC veterinary research**, BioMed Central, v. 4, n. 1, p. 1, 2008.
- GAGLIANO, M.; MCCORMICK, M. I. Feeding history influences otolith shape in tropical fish. **Marine Ecology Progress Series**, v. 278, p. 291–296, 2004.
- GARBOCZI, E. J. Three-dimensional mathematical analysis of particle shape using x-ray tomography and spherical harmonics: Application to aggregates used in concrete. **Cement and concrete research**, Elsevier, v. 32, n. 10, p. 1621–1638, 2002.
- GAULDIE, R. Vaterite otoliths from chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research**, Taylor & Francis, v. 20, n. 2, p. 209–217, 1986.
- GAULDIE, R.; NELSON, D. Otolith growth in fishes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, Elsevier, v. 97, n. 2, p. 119–135, 1990.
- GAUTHIER, S. et al. Digitized 3d mesh segmentation based on curvature analysis. **Electronic Imaging**, Society for Imaging Science and Technology, v. 2017, n. 20, p. 33–38, 2017.
- GREEN, B. S. et al. Introduction to otoliths and fisheries in the tropics. **Tropical Fish Otoliths: Information for Assessment, Management and Ecology**, Springer Netherlands, p. 1–22, 2009.
- GRODSTEIN, G. W. **X-ray attenuation coefficients from 10 keV to 100 MeV**. [S.l.], 1957.

- HAMEED, D. A. et al. Comparing non contrast computerized tomography criteria versus dual x-ray absorptiometry as predictors of radio-opaque upper urinary tract stone fragmentation after electromagnetic shockwave lithotripsy. **Urolithiasis**, Springer, v. 41, n. 6, p. 511–515, 2013.
- HAMRIN, S. et al. A new method for three-dimensional otolith analysis. **Journal of fish biology**, Wiley Online Library, v. 54, n. 1, p. 223–225, 1999.
- HAWKINS, W.; LEICHTNER, P.; YANG, N.-C. The circular harmonic transform for spect reconstruction and boundary conditions on the fourier transform of the sinogram. **IEEE transactions on medical imaging**, IEEE, v. 7, n. 2, p. 135–138, 1988.
- HOFF, G. R.; FUIMAN, L. A. Morphometry and composition of red drum otoliths: changes associated with temperature, somatic growth rate, and age. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, Elsevier, v. 106, n. 2, p. 209–219, 1993.
- HSIEH, J. Computed tomography: principles, design, artifacts, and recent advances. In: SPIE BELLINGHAM, WA. [S.l.], 2009.
- HÜSSY, K. Otolith shape in juvenile cod (*gadus morhua*): Ontogenetic and environmental effects. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, Elsevier, v. 364, n. 1, p. 35–41, 2008.
- JALAGUIER-COUDRAY, A. et al. Contribution of fdg pet/ct for the optimization of the management of additional lesions detected on local staging breast mri. **American Journal of Roentgenology**, Am Roentgen Ray Soc, v. 206, n. 4, p. 891–900, 2016.
- JAVOR, B.; LO, N.; VETTER, R. Otolith morphometrics and population structure of pacific sardine (*sardinops sagax*) along the west coast of north america. **Fishery Bulletin**, v. 109, n. 4, p. 402–415, 2011.
- JENKINS, G. Age, growth rate, and growth trajectory determined from otolith microstructure of southern bluefin tuna *thunnus maccoyii* larvae. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 63, p. 93–104, 1990.
- JOLIVET, A. **Compréhension des mécanismes de Biominéralisation: quantification spatialisée des fractions minérale et organique et influence de facteurs environnementaux**. Tese (Doutorado) — Université de Brest, 2009.
- KAK, A.; SLANEY, M. Principles of computerized tomographic imaging (philadelphia, pa: Society for industrial and applied mathematics). 2001.
- KLEIN, P.; RICHARD, L.; JAMES, H. 3d curvature attributes: a new approach for seismic interpretation. **First break**, v. 26, n. 4, 2008.
- KUDO, H.; SAITO, T. Sinogram recovery with the method of convex projections for limited-data reconstruction in computed tomography. **JOSA A**, Optical Society of America, v. 8, n. 7, p. 1148–1160, 1991.

- LADICH, F.; SCHULZ-MIRBACH, T. Diversity in fish auditory systems: One of the riddles of sensory biology. **Front. Ecol. Evol.** 4: 28. doi: 10.3389/fevo, 2016.
- LAGARDÈRE, F. et al. Examination of otolith morphology and microstructure using laser scanning microscopy. **Recent Developments in Fish Otolith Research. Belle W. Baruch Library in Marine Science, University of South Carolina, Hilton Head**, v. 19, p. 7–27, 1995.
- LECHNER, W. et al. Ontogenetic development of weberian ossicles and hearing abilities in the african bullhead catfish. **PLoS One**, Public Library of Science, v. 6, n. 4, p. e18511, 2011.
- LECHNER, W.; LADICH, F. Size matters: diversity in swimbladders and weberian ossicles affects hearing in catfishes. **Journal of Experimental Biology**, The Company of Biologists Ltd, v. 211, n. 10, p. 1681–1689, 2008.
- LECOMTE-FINIGER, R. L'otolithe: la boîte noire des téléostéens. **L'Année Biologique**, Elsevier, v. 38, n. 2, p. 107–122, 1999.
- LEGUÍA, J. et al. Otolith shape analysis as a tool for stock identification of the southern blue whiting, micromesistius australis/análisis morfométrico de los otolitos como herramienta para la identificación de stock de la merluza de tres aletas, micromesistius australis. **Latin American Journal of Aquatic Research**, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, v. 41, n. 3, p. 479, 2013.
- LESSA, R. et al. Otolith microstructure analysis with otc validation confirms age overestimation in atlantic thread herring opisthonema oglinum from north-eastern brazil. **Journal of Fish Biology**, Wiley Online Library, v. 73, n. 7, p. 1690–1700, 2008.
- LIMBURG, K. E. et al. In search of the dead zone: use of otoliths for tracking fish exposure to hypoxia. **Journal of Marine Systems**, Elsevier, v. 141, p. 167–178, 2015.
- LIPPMANN, F. Crystal chemistry of sedimentary carbonate minerals. In: **Sedimentary Carbonate Minerals**. [S.l.]: Springer, 1973. p. 5–96.
- LOMBARTE, A. et al. A web-based environment for shape analysis of fish otoliths. the aforo database. **Scientia Marina**, v. 70, n. 1, p. 147–152, 2006.
- LOWE, T. et al. Metamorphosis revealed: time-lapse three-dimensional imaging inside a living chrysalis. **Journal of the Royal Society Interface**, The Royal Society, v. 10, n. 84, p. 20130304, 2013.
- MAPP, J. et al. Three-dimensional rendering of otolith growth using phase contrast synchrotron tomography. **Journal of fish biology**, Wiley Online Library, v. 88, n. 5, p. 2075–2080, 2016.
- MARTI-PUIG, P. et al. New parameterisation method for three-dimensional otolith surface images. **Marine and Freshwater Research**, CSIRO, 2015.
- MCBRIDE, R. S.; RICHARDSON, A. K.; MAKI, K. L. Age, growth, and mortality of wahoo, acanthocybium solandri, from the atlantic coast of florida and the bahamas. **Marine and Freshwater Research**, CSIRO, v. 59, n. 9, p. 799–807, 2008.

- MONTEIRO, L. R. et al. Allometric changes and shape differentiation of sagitta otoliths in sciaenid fishes. **Fisheries Research**, Elsevier, v. 74, n. 1, p. 288–299, 2005.
- MOTTA, C. M. et al. Morphological and biochemical analyses of otoliths of the ice-fish *Chionodraco hamatus* confirm a common origin with red-blooded species. **Journal of anatomy**, Wiley Online Library, v. 214, n. 1, p. 153–162, 2009.
- MUGIYA, Y. Phase difference between calcification and organic matrix formation in the diurnal growth of otoliths in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Fish. Bull.:(United States)**, Hokkaido Univ., Japan, v. 85, n. 3, 1987.
- MUGIYA, Y.; UCHIMURA, T. Otolith resorption induced by anaerobic stress in the goldfish, *Carassius auratus*. **Journal of Fish Biology**, Wiley Online Library, v. 35, n. 6, p. 813–818, 1989.
- NOEVER, C.; KEILER, J.; GLENNER, H. First 3d reconstruction of the rhizocephalan root system using microCT. **Journal of Sea Research**, Elsevier, 2015.
- NORTHWOOD, D. O.; LEWIS, D. Transformation of vaterite to calcite during grinding. **The American Mineralogist**, v. 53, p. 2089–2092, 1968.
- PACKARD, M. J.; HIRSCH, K. F.; IVERSON, J. B. Structure of shells from eggs of kinosternid turtles. **Journal of Morphology**, Wiley Online Library, v. 181, n. 1, p. 9–20, 1984.
- PANFILI, J. et al. Manual of fish sclerochronology. 2002.
- PARISI-BARADAD, V. et al. Otolith shape contour analysis using affine transformation invariant wavelet transforms and curvature scale space representation. **Marine and Freshwater Research**, CSIRO, v. 56, n. 5, p. 795–804, 2005.
- PARISI-BARADAD, V. et al. Automated taxon identification of teleost fishes using an otolith online database—aforo. **Fisheries Research**, Elsevier, v. 105, n. 1, p. 13–20, 2010.
- PIERA, J. et al. Otolith shape feature extraction oriented to automatic classification with open distributed data. **Marine and Freshwater Research**, CSIRO, v. 56, n. 5, p. 805–814, 2005.
- PISAM, M.; JAMMET, C.; LAURENT, D. First steps of otolith formation of the zebrafish: role of glycogen? **Cell and tissue research**, Springer, v. 310, n. 2, p. 163–168, 2002.
- PLATT, C.; POPPER, A. N. Fine structure and function of the ear. In: **Hearing and sound communication in fishes**. [S.l.]: Springer, 1981. p. 3–38.
- PONTON, D. Is geometric morphometrics efficient for comparing otolith shape of different fish species? **Journal of Morphology**, Wiley Online Library, v. 267, n. 6, p. 750–757, 2006.
- POPPER, A. N.; FAY, R. R. **Comparative studies of hearing in vertebrates**. [S.l.]: Springer-Verlag, 1980.

- POPPER, A. N.; FAY, R. R. Sound detection and processing by fish: critical review and major research questions (part 1 of 2). **Brain, behavior and evolution**, Karger Publishers, v. 41, n. 1, p. 14–25, 1993.
- POPPER, A. N.; HOXTER, B. Growth of a fish ear: 1. quantitative analysis of hair cell and ganglion cell proliferation. **Hearing research**, Elsevier, v. 15, n. 2, p. 133–142, 1984.
- POPPER, A. N.; LU, Z. Structure–function relationships in fish otolith organs. **Fisheries research**, Elsevier, v. 46, n. 1, p. 15–25, 2000.
- POPPER, A. N.; PLATT, C. Sensory surface of the saccule and lagena in the ears of ostariophysan fishes. **Journal of Morphology**, Wiley Online Library, v. 176, n. 2, p. 121–129, 1983.
- POPPER, A. N.; RAMCHARITAR, J.; CAMPANA, S. E. Why otoliths? insights from inner ear physiology and fisheries biology. **Marine and freshwater Research**, CSIRO, v. 56, n. 5, p. 497–504, 2005.
- POSTNOV, A.; SASOV, A. et al. 3d in-vivo x-ray microtomography of living snails. **Journal of microscopy**, Wiley Online Library, v. 205, n. 2, p. 201–204, 2002.
- POSTNOV, A. et al. Quantitative analysis of bone mineral content by x-ray microtomography. **Physiological measurement**, IOP Publishing, v. 24, n. 1, p. 165, 2003.
- R Core Team. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna, Austria, 2018. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>.
- REIMER, T. et al. High prevalence of vaterite in sagittal otoliths causes hearing impairment in farmed fish. **Scientific reports**, Nature Publishing Group, v. 6, 2016.
- ROBERTS, A. Curvature attributes and their application to 3d interpreted horizons. **First break**, Wiley Online Library, v. 19, n. 2, p. 85–100, 2001.
- ROSE, A. The sensitivity performance of the human eye on an absolute scale. **JOSA**, Optical Society of America, v. 38, n. 2, p. 196–208, 1948.
- ROSSI-WONGTSCHOWSKI, C. et al. Coss-brasil: Coleção de otólitos de peixes marinhos da região sudeste-sul do brasil. **São Paulo: Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo**, 2016.
- ROSSI-WONGTSCHOWSKI, C. L. D. B. et al. Atlas of marine bony fish otoliths (sagittae) of southeastern-southern brazil part i: Gadiformes (macrouridae, moridae, bregmacerotidae, phycidae and merlucciidae); part ii: Perciformes (carangidae, sciaenidae, scombridae and serranidae). **Brazilian Journal of Oceanography**, SciELO Brasil, v. 62, n. SPE1, p. 1–103, 2014.
- SADIGHZADEH, Z. et al. Comparison of different otolith shape descriptors and morphometrics for the identification of closely related species of lutjanus spp. from the persian gulf. **Marine Biology Research**, Taylor & Francis, v. 8, n. 9, p. 802–814, 2012.

- SANTANA, F.; MORIZE, E.; LESSA, R. Age and growth of the spotted goatfish, *pseudupeneus maculatus* (bloch, 1793) in brazil, validated through marginal increment and oxytetracycline dyes in the sagittae. **Journal of Applied Ichthyology**, Wiley Online Library, v. 22, n. 2, p. 132–137, 2006.
- SANTANA, F. M. et al. Otolith micro-and macrostructure analysis to improve accuracy of growth parameter estimation for white mullet *mugil curema*. **Aquatic Biology**, v. 7, n. 3, p. 199–206, 2009.
- SASAGAWA, T.; MUGIYA, Y. Biochemical properties of water-soluble otolith proteins and the immunobiochemical detection of the proteins in serum and various tissues in the tilapia *oreochromis niloticus*. **Fisheries science**, The Japanese Society of Fisheries Science, v. 62, n. 6, p. 970–976, 1996.
- SCHOEPF, U. J.; COSTELLO, P. Ct angiography for diagnosis of pulmonary embolism: state of the art 1. **Radiology**, Radiological Society of North America, v. 230, n. 2, p. 329–337, 2004.
- SCHUIJF, A.; BUWALDA, R. J. Underwater localization—a major problem in fish acoustics. In: **Comparative studies of hearing in vertebrates**. [S.l.]: Springer, 1980. p. 43–77.
- SCHULZ-MIRBACH, T. et al. A unique swim bladder-inner ear connection in a teleost fish revealed by a combined high-resolution microtomographic and three-dimensional histological study. **BMC biology**, BioMed Central Ltd, v. 11, n. 1, p. 75, 2013.
- SCHULZ-MIRBACH, T.; HESS, M.; PLATH, M. Inner ear morphology in the atlantic molly *poecilia mexicana*—first detailed microanatomical study of the inner ear of a cyprinodontiform species. **PLoS One**, Public Library of Science, v. 6, n. 11, p. e27734, 2011.
- SCHULZ-MIRBACH, T. et al. Are accessory hearing structures linked to inner ear morphology? insights from 3d orientation patterns of ciliary bundles in three cichlid species. **Frontiers in zoology**, BioMed Central, v. 11, n. 1, p. 1, 2014.
- SCHULZ-MIRBACH, T.; METSCHER, B.; LADICH, F. Relationship between swim bladder morphology and hearing abilities—a case study on asian and african cichlids. **PLoS One**, Public Library of Science, v. 7, n. 8, p. e42292, 2012.
- SECOR, D. H.; HENDERSON-ARZAPALO, A.; PICCOLI, P. Can otolith microchemistry chart patterns of migration and habitat utilization in anadromous fishes? **Journal of experimental marine Biology and Ecology**, Elsevier, v. 192, n. 1, p. 15–33, 1995.
- SIMPSON, T. L. Silicification processes in sponges: *Geodia asters* and the problem of morphogenesis of spicule shape. In: **Origin, Evolution, and Modern Aspects of Biomineralization in Plants and Animals**. [S.l.]: Springer, 1989. p. 125–136.
- SPONAUGLE, S. Daily otolith increments in the early stages of tropical fish. In: **Tropical Fish Otoliths: Information for Assessment, Management and Ecology**. [S.l.]: Springer, 2009. p. 93–132.

SPONAUGLE, S. **Tropical Fish Otoliths: Information for Assessment, Management and Ecology. Reviews: Methods and Technologies in Fish Biology and Fisheries**, eds Green BS, Mapstone BD, Carlos G, Begg GA. [S.l.]: Springer, New York, 2009.

STARRS, D.; EBNER, B. C.; FULTON, C. J. All in the ears: unlocking the early life history biology and spatial ecology of fishes. **Biological Reviews**, Wiley Online Library, 2014.

STÉQUERT, B.; PANFILI, J.; DEAN, J. Age and growth of yellowfin tuna, *thunnus albacares*, from the western indian ocean, based on otolith microstructure. **Oceanographic Literature Review**, v. 12, n. 43, p. 1275, 1996.

STRANSKY, C. Morphometric outlines. **Stock identification methods. 2nd ed. London, UK: Elsevier**, p. 129–140, 2013.

STYNDER, D. D.; KUPCZIK, K. Tooth root morphology in the early pliocene african bear *agriotherium africanum* (mammalia, carnivora, ursidae) and its implications for feeding ecology. **Journal of Mammalian Evolution**, Springer, v. 20, n. 3, p. 227–237, 2013.

TANAKA, H. T.; IKEDA, M.; CHIAKI, H. Curvature-based face surface recognition using spherical correlation. principal directions for curved object recognition. In: **IEEE. Automatic Face and Gesture Recognition, 1998. Proceedings. Third IEEE International Conference on**. [S.l.], 1998. p. 372–377.

THORROLD, S. R.; JONES, C. M.; CAMPANA, S. E. Response of otolith microchemistry to environmental variations experienced by larval and juvenile atlantic croaker (*micropogonias undulatus*). **Limnology and Oceanography**, v. 42, n. 1, p. 102–111, 1997.

TRACEY, S. R.; LYLE, J. M.; DUHAMEL, G. Application of elliptical fourier analysis of otolith form as a tool for stock identification. **Fisheries Research**, Elsevier, v. 77, n. 2, p. 138–147, 2006.

TUSET, V. M.; LOMBARTE, A.; ASSIS, C. A. Otolith atlas for the western mediterranean, north and central eastern atlantic. **Scientia Marina**, v. 72, n. S1, p. 7–198, 2008.

TUSET, V. M. et al. Comparative morphology of the sagittal otolith in *serranus* spp. **Journal of Fish Biology**, Wiley Online Library, v. 63, n. 6, p. 1491–1504, 2003.

TUSET, V. M. et al. Shape indices to identify regional differences in otolith morphology of comber, *serranus cabrilla* (l., 1758). **Journal of Applied Ichthyology**, Wiley Online Library, v. 19, n. 2, p. 88–93, 2003.

TUSET, V. M. et al. Using sagittal otoliths and eye diameter for ecological characterization of deep-sea fish: *Aphanopus carbo* and *a. intermedius* from ne atlantic waters. CSIC-Instituto de Ciencias del Mar (ICM), 2010.

- VELICHKO, A.; HOLZAPFEL, C.; MÜCKLICH, F. 3d characterization of graphite morphologies in cast iron. **Advanced Engineering Materials**, Wiley Online Library, v. 9, n. 1-2, p. 39–45, 2007.
- WAINWRIGTH, S. A. Skeletal organization in the coral, pocillopora damicornis. **Journal of Cell Science**, The Company of Biologists Ltd, v. 3, n. 66, p. 169–183, 1963.
- WALDRON, M. E.; KERSTAN, M. Age validation in horse mackerel (*trachurus trachurus*) otoliths. **ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil**, Oxford University Press, v. 58, n. 4, p. 806–813, 2001.
- WEBER, E. H. *De Aure et Auditu Hominis et Animalium. Part I. De aure Animalium Aquatilium*. [S.l.: s.n.], 1820.
- WILLIS, K. L. et al. Middle ear cavity morphology is consistent with an aquatic origin for testudines. **PloS one**, Public Library of Science, v. 8, n. 1, p. e54086, 2013.
- YAN, L.-n. et al. Tentative application of computed tomography to study of otoliths and their responses to environment variations. **Frontiers of Materials Science in China**, Springer, v. 3, n. 2, p. 187–193, 2009.

Apêndices

A - Extração das coordenadas x , y e z

```
1 library("Momocs")
2 library("jpeg")
3 library("tiff")
4 library("autothresldr")
5 library("ijttiff")
6
7 # Vetor onde será armazenado os valores de HU
8 HU<-seq()
9
10 # Matriz onde serão armazenados as coordenadas e valores de HU
11 xyzHU<-matrix(NA, ncol=4)
12
13 for(i in 1:length(Images)){
14   # Seja Images um vetor de imagens em .tiff e i o índice da imagem
15   X<-ijttiff::read_tif(Images[i])
16
17   # Binarização baseado no método de Otsu
18   threshold<-auto_thresh(X,method = "Otsu")[1]
19   x<-ifelse(X[, ,1,1]<threshold,1,0)
20
21   # Converter a imagem binarizada em .jpeg para o passo seguinte
22   y<-writeJPEG(x,target = raw(),quality = 1,bg ="white")
23
24   # Definir os pixels do contorno baseado no chain-code
25   coo<-import_jpg1(y,threshold = 0.1)
26
27   # Extraíndo os valores de HU referentes as coordenadas  $x$  e  $y$  da imagem  $i$ 
28   HU<-c(HU, X[coo[,1],coo[,2],1,1])
29
30   # Salvando as coordenadas e seus respectivos valores
31   xyzHU<-rbind(xyzHU, cbind(coo,HU))
32 }
```

B - Contagem dos anéis de crescimento assistida por tomografia

```

1 library("Momocs")
2 library("jpeg")
3 library("tiff")
4 library("autothresholdr")
5 library("ijttiff")
6
7 Img<-ijttiff::read_tif(Images[I])[,,1,1] # Ler a imagem I
8
9 # Binarizacao baseado em Otsu
10 threshold<-auto_thresh(Img, method = "otsu")[1]
11 Mask<-ifelse(Img<threshold,NA,1) # Criacao de uma mascara
12 Img3<-Img*Mask # Transformando o fundo em NA
13
14 image.plot(Img3) # Plotando a imagem sem fundo e em escala RGB
15
16 # Definindo o retangulo de busca do nucleo
17 # 0 primeiro ponto é o canto superior esquerdo
18 # e o segundo é o inferior direito
19 P<-locator(2)
20 X<-round(P$x*dim(Img3)[1],0)
21 Y<-round(P$y*dim(Img3)[2],0)
22
23 Sq<-Img3[X[2]:X[1],Y[2]:Y[1]]
24 SqMin<-which(Sq == min(Sq, na.rm = T), arr.ind = TRUE)
25
26 X0<-SqMin[1]/(diff(range(X[1]:X[2]))+1)
27 Y0<-SqMin[2]/(diff(range(Y[1]:Y[2]))+1)
28
29 # Seja P1 o ponto com menor densidade (núcleo)
30 P1<-c(X[2]-SqMin[1],Y[2]+SqMin[2])/dim(Img3)
31 points(P1[1],P1[2], pch=16)
32
33 K<-5 # Seja K o número de linhas a serem traçadas
34 P2<-locator(Eixo) # Seja Eixo o número de eixos de leitura dos anéis.
35 # P2 será o do meio. Assim todos os pontos serão equidistantes.
36 P2<-as.data.frame(P2)
37 points(P2$x,P2$y, pch=16)
38
39 # Seja D a distância angular entre as retas.
40 # Neste trabalho foi usando D = 1 grau.
41 D<-1
42
43 for(i in 1:((K-1)/2)){
44 # Definindo os K pontos baseados em P2 e D.

```

```

45 for(j in 1:Eixo){
46   if(j==1){
47     e<-sqrt((P2[j,1]-P1[1])^2 + (P2[j,2]-P1[2])^2)
48     a<-D*i*(pi/180)
49     theta<-abs(atan((P2[j,2]-P1[2])/(P2[j,1]-P1[1])))
50
51     p3x<-P1[1]+e*cos(theta-a)
52     p3y<-P1[2]+e*sin(theta-a)
53     p4x<-P1[1]+e*cos(theta+a)
54     p4y<-P1[2]+e*sin(theta+a)
55
56     if(P2[j,1]<P1[1]){
57       p3x<-P1[1]+e*cos(theta-a) - 2*(p3x-P1[1])
58       p4x<-P1[1]+e*cos(theta+a) - 2*(p4x-P1[1])
59     }
60
61     if(P2[j,2]<P1[2]){
62       p3y<-P1[2]+e*sin(theta-a) - 2*(p3y-P1[2])
63       p4y<-P1[2]+e*sin(theta+a) - 2*(p4y-P1[2])
64     }
65   }
66
67   if(j==2){
68     e<-sqrt((P2[j,1]-P2[j-1,1])^2 + (P2[j,2]-P2[j-1,2])^2)
69     a<-D*i*(pi/180)
70     theta<-atan((P2[j,2]-P2[j-1,2])/(P2[j,1]-P2[j-1,1]))
71
72     p3x<-P2[j-1,1]+e*cos(theta-a)
73     p3y<-P2[j-1,2]+e*sin(theta-a)
74     p4x<-P2[j-1,1]+e*cos(theta+a)
75     p4y<-P2[j-1,2]+e*sin(theta+a)
76
77     if(P2[j,1]<P2[j-1,1]){
78       p3x<-P2[j-1,1]+e*cos(theta-a) - 2*(p3x-P2[j-1,1])
79       p4x<-P2[j-1,1]+e*cos(theta+a) - 2*(p4x-P2[j-1,1])
80       p3y<-P2[j-1,2]+e*sin(theta-a) - 2*(p3y-P2[j-1,2])
81       p4y<-P2[j-1,2]+e*sin(theta+a) - 2*(p4y-P2[j-1,2])
82     }
83
84     points(p3x, p3y, col="blue", pch=16)
85     points(p4x, p4y, col="blue", pch=16)
86
87     P2<-rbind(P2,c(p3x,p3y), c(p4x, p4y))
88   }
89 }
90
91 # Rastreado os pixels entre P1 e os K pontos e armazenando em NC
92 NCfinal<-matrix(NA,ncol=K,
93                 nrow=round(sqrt(dim(Img3)[1]^2 +
94                               dim(Img3)[2]^2),0))
95 for(k in 1:K){
96   p2<-c(P2$x[k],P2$y[k])
97
98   p1<-P1*dim(Img3)

```

```

99     p2<-round(p2*dim(Img3),0)
100
101     DeltaX<-p2[1]-p1[1]
102     DeltaY<-p2[2]-p1[2]
103
104     if(abs(DeltaX)>abs(DeltaY)){step<-abs(DeltaX)}
105     if(abs(DeltaX)<=abs(DeltaY)){step<-abs(DeltaY)}
106
107     Xinc<-DeltaX/step
108     Yinc<-DeltaY/step
109
110     if(Eixo>1){
111         p3<-c(P2$x[k+K],P2$y[k+K])
112         p3<-round(p3*dim(Img3),0)
113         DeltaXp3<-p3[1]-p2[1]
114         DeltaYp3<-p3[2]-p2[2]
115         if(abs(DeltaXp3)>abs(DeltaYp3)){stepp3<-abs(DeltaXp3)}
116         if(abs(DeltaXp3)<=abs(DeltaYp3)){stepp3<-abs(DeltaYp3)}
117         Xincp3<-DeltaXp3/stepp3
118         Yincp3<-DeltaYp3/stepp3
119     }
120 }
121
122 NCfinal<-seq()
123 NCfinalp3<-seq()
124 NC2<-matrix(NA, ncol=3)
125
126 for(i in 1:K){
127     if(Eixo==1){
128         NCfinal<-smth.gaussian(NC[,i],
129                               window = 5) #Com filtro
130         NCfinal<-na.omit(NCfinal)
131         NCfinal<-cbind(seq(0, length(NCfinal),1),
132                       NCfinal,
133                       rep(1, length(NCfinal)))
134         NCfinal<-NCfinal[-nrow(NCfinal),]
135         NC2<-rbind(NC2,NCfinal)
136     }
137
138     # Nomeando as colunas e convertendo as distância de pixel para micrômetros
139     names(NC2)<-c("x","HU", "Axis")
140     NC2$Axis<-as.factor(NC2$Axis)
141     NC2$x<-NC2$x*Voxel
142 }

```

C - Segmentação em 3D

```

1 library("rgl")
2 library("Rvcg")
3 library("manipulate")
4
5 Data<-vcgPlyRead(PLY)           # Seja uma imagem com extensão .ply
6 Curvatures<-vcgCurve(Data)     # Calculando as curvaturas
7 X<-Data$vb[1,]                 # Coordenadas de X
8 Y<-Data$vb[2,]                 # Coordenadas de Y
9 Z<-Data$vb[3,]                 # Coordenadas de Z
10 Mean<-Curvatures$meanvb      # Atributo Mean
11 Gaussian<-Curvatures$gaussitmax # Atributo Gaussian
12 RMS<-Curvatures$RMSvb        # Atributo RMS
13
14 # Data.frame com as coordenadas e seus atributos de curvatura
15 Data2<-as.data.frame(cbind(X,Y,Z, Mean, Gaussian, RMS))
16
17 # Definindo os valores iniciais para reconstrução.
18 # Ou seja, todo o espectro de valores das três distribuições.
19 # Estas variáveis serão usadas como
20 # critérios para os filtros seguintes.
21 MeanMin<-min(Data2$Mean)
22 MeanMax<-max(Data2$Mean)
23 RMSMin<-min(Data2$RMS)
24 RMSMax<-max(Data2$RMS)
25 GauMin<-min(Data2$Gaussian)
26 GauMax<-max(Data2$Gaussian)
27
28 # Para com o data.frame original, crie outro manipulável.
29 Data3<-as.matrix(subset(Data2[,1:3],
30                       Data2$Mean>=MeanMin &
31                       Data2$Mean<=MeanMax &
32                       Data2$RMS>=RMSMin &
33                       Data2$RMS<=RMSMax &
34                       Data2$Gaussian>=GauMin &
35                       Data2$Gaussian<=GauMax))
36
37 points3d(Data3)                # Plotando em 3D os pontos selecionados.
38
39 # Começando a iteração
40 manipulate({
41   # Filtrando os pontos baseado nas variáveis de filtro
42   Data3<-as.matrix(subset(Data2[,1:3],
43                           Data2$Mean>=MeanMin & Data2$Mean<=MeanMax &
44                           Data2$RMS>=RMSMin & Data2$RMS<=RMSMax &
45                           Data2$Gaussian>=GauMin & Data2$Gaussian<=GauMax))
46
47   rgl.clear()                  # Destruindo a imagem passada

```

```

48 points3d(Data3) # Plotando os pontos que satisfazem os filtros
49
50 # Configuração da janela gráfica para exibir as
51 # três distribuições juntamente com os
52 # limites mínimo (linha azul) e máximo (linha vermelha).
53 par(mfrow=c(3,1))
54 hist(Data2$Mean, breaks = 1000,
55      main="", xlab="Mean Curvature")
56 abline(v=MeanMin, col="blue")
57 abline(v=MeanMax, col="red")
58
59 hist(Data2$RMS, breaks = 1000,
60      main="", xlab="RMS Curvature")
61 abline(v=RMSMin, col="blue")
62 abline(v=RMSMax, col="red")
63
64 hist(Data2$Gaussian, breaks = 1000,
65      main="", xlab="Gaussian Curvature")
66 abline(v=GauMin, col="blue")
67 abline(v=GauMax, col="red")
68 },
69 # Manipulação dos valores de segmentação
70 MeanMin = slider(min(Data2$Mean),
71                 max(Data2$Mean),
72                 initial=MeanMin,
73                 step = diff(range(Data2$Mean))/1000),
74
75 MeanMax = slider(min(Data2$Mean),
76                 max(Data2$Mean),
77                 initial=MeanMax,
78                 step = diff(range(Data2$Mean))/1000),
79
80 RMSMin  = slider(min(Data2$RMS),
81                 max(Data2$RMS),
82                 initial=RMSMin,
83                 step = diff(range(Data2$RMS))/1000),
84
85 RMSMax  = slider(min(Data2$RMS),
86                 max(Data2$RMS),
87                 initial=RMSMax,
88                 step = diff(range(Data2$RMS))/1000),
89
90 GauMin  = slider(min(Data2$Gaussian),
91                 max(Data2$Gaussian),
92                 initial=GauMin,
93                 step = diff(range(Data2$Gaussian))/10000),
94
95 GauMax  = slider(min(Data2$Gaussian),
96                 max(Data2$Gaussian),
97                 initial=GauMax,
98                 step = diff(range(Data2$Gaussian))/10000)
99 )

```