

SOLICITAÇÃO DE AUTORIZAÇÃO PARA PESQUISA EM UNIDADES DE CONSERVAÇÃO DO ESTADO DO PARANÁ

Projeto

A Evolução Multifacetada dos Quelípodos: Explorando Forma, Biomecânica e Mecanismos Evolutivos em Decapoda

Responsável Técnico: Prof. Dr. Alexandre Varaschin Palaoro

Departamento de Zoologia

Universidade Federal do Paraná

Caixa Postal 19020

CEP 81531-990

Curitiba - PR

RESUMO

As “pinças” dos decápodes – aqui chamadas de quelípodos - são estruturas morfológicas que possuem uma diversidade de formas e funções ímpar no Reino Animal. Por ser uma estrutura composta por poucos elementos, sendo um dedo móvel que rotaciona devido a ação do músculo que está dentro da mão do quelípedo, seria esperado que a capacidade para diversificação não fosse alta. Apesar disso, encontramos espécies com quelípodos extremamente especializados que podem criar bolhas de cavitação devido a velocidade de fechamento, até outras espécies que possuem quelípodos proporcionalmente mais fortes do que a mordida de crocodilos. O problema é que não sabemos como essa diversificação ocorreu. Sabemos que a diversidade de funções e de forma caminham juntas, porém qual o papel que cada uma delas possui na diversidade ainda é desconhecida. Neste projeto, portanto, meu objetivo principal é explicar como os quelípodos dos decápodes diversificam. Para isso, vou unir biomecânica e biomateriais para entender como cada uma dessas etapas influencia a evolução do quelípedo. Vou estudar todos esses processos em uma família (Aeglidae) de anomuros de água doce endêmicos do sul da América do Sul, focando nas espécies que ocorrem no Estado do Paraná. Essa é uma linhagem de Decapoda (~60 espécies no Brasil e ~15 espécies no PR) que apresenta alta variação morfológica tanto dentro como entre as espécies, ao mesmo tempo que exibem variação na função dos seus quelípodos. Portanto, Aeglidae torna-se um grupo interessante para estudar a evolução dessa estrutura que pode fornecer respostas importantes para entender a evolução dessa estrutura multifuncional que é o quelípedo. Por serem espécies que ocorre em riachos de primeiro ou segunda ordem com boa oxigenação, precisarei acessar as Unidades de Conservação do Estado do Paraná para conseguir coletá-las. Assim que coletá-los, primeiro vou estudar como a força de fechamento está relacionada com os aspectos da biomecânica do quelípedo – i.e., como suas alavancas e músculos interagem para produzir a força final. Em segundo lugar, vou aferir as propriedades dos biomateriais dos quelípodos, como a dureza e a elasticidade (módulo de Young) e aliar esses dados a estrutura tridimensional do quelípedo usando micro-tomografia. Com essas duas variáveis, usarei a análise de elementos finitos (FEA), uma técnica de modelagem de engenharia, para entender como o quelípedo responde a pressões externas. Ao unir biomateriais, biomecânica e morfologia sob o mesmo arcabouço, poderei avaliar a importância de cada aspecto na evolução e diversificação das garras de Aeglidae, ao mesmo tempo em que desenvolvo um arcabouço para estudar as propriedades biomecânicas de estruturas morfológicas em animais. Este projeto foi pensado para que cada projeto traga resultados novos por si só, e para que a combinação traga resultados impactantes sobre a diversificação dos quelípodos. Para a morfologia, testarei o quanto a forma está associada ao desempenho da estrutura e o quanto cada uma das partes mecânicas influencia tanto a forma quanto o desempenho. Para os biomateriais e os modelos FEA, eles serão usados para estudar como o mundo físico pode possibilitar ou limitar a evolução morfológica.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Pouquíssimas estruturas morfológicas no Reino Animal atingiram o nível de diversificação em forma e função similares aos que encontramos nos quelípodos de Decapoda (Lee 1995). Como podemos ver na Figura 1, há quelípodos que possuem dedos alongados e possuem um espaço amplo entre seus dedos, enquanto outros possuem dedos robustos com muitos tubérculos. Ainda nesta figura, podemos ver o exemplo do quelípodo altamente especializado de um camarão pistola (família Alpheidae). Este quelípodo consegue fechar mais rápido que um tiro de pistola que ao fechar cria bolhas de cavitação que podem atordoar ou até matar presas (Versluis et al. 2000). Além disso, os quelípodos são fundamentais para basicamente todas as funções: eles podem ser usados para capturar presas, escavar o substrato, confrontar indivíduos da mesma espécie, atrair indivíduos da mesma espécie, espantar predadores, se defender, e até serem usados em rituais de acasalamento (Mariappan, Balasundaram, and Schmitz 2000). Somando as evidências de forma e função, percebemos que os quelípodos são estruturas multifuncionais fundamentais para a aptidão dos indivíduos e, portanto, são passíveis de pressões seletivas para diversificação (Lee 1995; Wainwright 2007). **Logo, estudar a evolução dos quelípodos é um excelente caminho para entender como os mecanismos evolutivos atuam na evolução morfológica dos metazoários.**

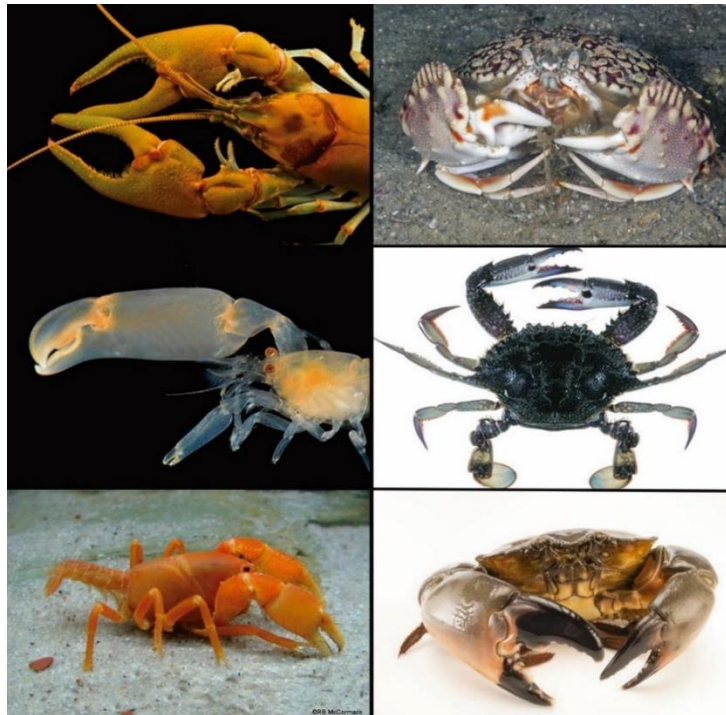


Figura 1. Diversidade de formas de quelípodos em Decapoda (Pancrustacea). Quadros superiores: esquerdo, o lagostim de água doce norte-americano *Cambarus chasmodactylus* James, 1966 (Foto: Joel Sartore); direito, o caranguejo *Calappa flammea* (Herbst, 1794). Quadros do meio: esquerdo, o camarão-pistola *Synalpheus dardeau* (Ríos & Duffy, 2007) (Foto: Arthur Anker); direito, o siri *Callinectes sapidus* Rathbun, 1896. Quadros inferiores: esquerdo, o lagostim escavador *Engaeus cymus* (Clark, 1936); direito, o caranguejo *Menippe mercenaria* (Say, 1818).

Coloquialmente conhecidos como “pinça” ou “garra”, os quelípodos são estruturas morfológicas com poucos elementos constituintes. O quelípodo pode ser dividido em uma parte fixa, composto da *manus* (ou mão) e do dedo fixo, e de uma parte móvel, o dátilo (Figura 2) (Palaoro et al. 2014). Dentro da *manus* encontram-se os músculos responsáveis pela movimentação em plano do dátilo (tanto para abrir quanto para fechar), enquanto o dedo fixo funciona como uma bigorna na qual o dedo móvel se posiciona (Brown, Cassuto, and Loos 1979; Taylor 2001). Do ponto de vista mecânico, o quelípodo é considerado um sistema de alavanca simples, constituído de dois elementos que movimentam a alavanca - as cutículas internas nas quais os músculos se inserem e realizam o movimento de aberto e fechamento - uma alavanca e uma bigorna (Figura 2). A interação entre esses elementos gera o desempenho da estrutura em alguma função ou tarefa (Irschick et al. 2008). Logo, alterações em qualquer elemento pode gerar modificações no desempenho. A modificação mais intuitiva seria no tamanho muscular, com músculos maiores gerando mais força. Porém, modificações na alavanca ou até na correlação entre esses dois elementos podem alterar o desempenho (Palaoro et al. 2020). Essas modificações nas partes mecânicas também podem ser vistas na forma do quelípodo, tornando-o mais arredondado para dar espaço para o músculo, ou até com dedos curtos e robustos (Palaoro et al. 2020). Logo, as partes mecânicas do quelípodo podem modificar diversos aspectos do quelípodo que vão muito além da morfologia. **Estudar como o quelípodo evoluiu irá necessariamente passar pelos passos de uma estrutura hierárquica com mecanismos de retroalimentação (Figura 2) (Wainwright 2007): os elementos morfológicos e suas interações geram o desempenho; o desempenho está relacionado ao quão bem a tarefa ou função será realizada; a função está associada a aptidão do indivíduo; se a função for vital para o indivíduo, poderá exercer pressão de seleção nesses outros níveis e gerar diversificação.**

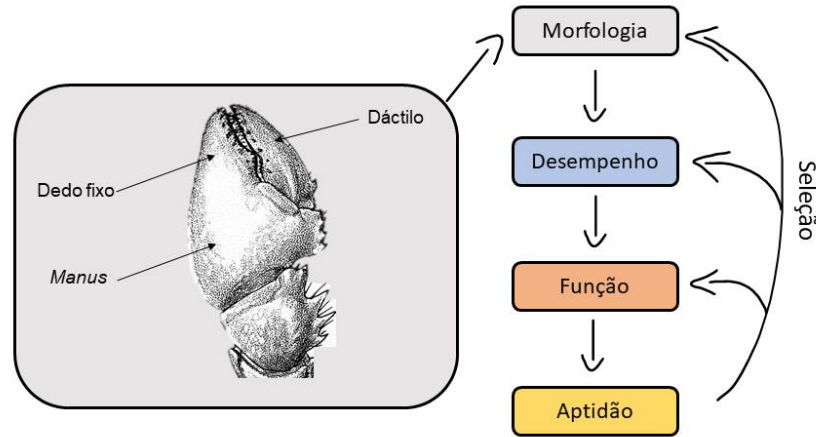


Figura 2. Morfologia externa do quelípodo de um decápode, composto pelo dáctilo, *manus* e dedo fixo. Essas três partes interagem, formando a morfologia do quelípodo. A morfologia, então, influencia o desempenho da estrutura, que influencia a função, a qual influencia a aptidão do indivíduo. Caso a função seja importante para reprodução ou sobrevivência, a aptidão do indivíduo selecionará todos os aspectos dessa cadeia hierárquica.

Com esse arcabouço hierárquico estabelecido, é plausível que a grande diversidade dos quelípodos seja um efeito cascata causado por modificações morfológicas devido as pressões seletivas. Porém, há poucas evidências empíricas sobre cada uma dessas etapas em quelípodos. Há algumas evidências pontuais espalhadas pela literatura como, por exemplo, quelípodos usados predominantemente para quebrar conchas têm morfologia que permite uma maior transmissão de força (i.e., são mais mecanicamente eficientes) que quelípodos usados para capturar outros tipos de presa (Fujiwara and Kawai 2016). Porém, se a morfologia é tão importante para quebrar concha, porque há tanta variação entre os quelípodos que quebram conchas (Davie, Guinot, and Ng 2015)? **Faltam informações sobre o desempenho e a função para entendermos esses passos evolutivos.** Além disso, os quelípodos são importantes em outros aspectos da história natural das espécies simultaneamente. Por exemplo, quelípodos podem ser usados em confrontos agonísticos e em sinalização para atrair parceiros sexuais em uma mesma espécie (Mariappan, Balasundaram, and Schmitz 2000). Como funções distintas que atuam na mesma morfologia irão influenciar (ou serão influenciadas) a evolução da estrutura? **Essas evidências pontuais sinalizam que ainda carecemos de: (1) um plano investigativo empírico que gere informações robustas tanto em nível intra- quanto interespecífico; e (2) do desenvolvimento de um arcabouço teórico mais amplo que incorpore**

evidências novas e já existentes para entendermos as forças que promovem ou restringem a diversificação de quelípodos.

O problema de usar a estrutura hierárquica demonstrado na Figura 2 é a alta quantidade de informações detalhadas necessárias sobre cada etapa da hierarquia. Informações morfológicas necessitam de muitas fotos de muitos indivíduos, o desempenho requer realizar uma medida das em ação em animais vivos, enquanto a função necessita de experimentos comportamentais para descrever e quantificar *como* o indivíduo está usando a morfologia. Por isso, focarei este projeto em um clado que possui uma boa diversidade de quelípodos. **Os anomuros da família Aeglidae são a única linhagem da Infraordem Anomura que invadiram com sucesso os ambientes de águas continentais** (Bueno, Shimizu, and Moraes 2016). **Os membros desta família ocorrem no Sul da América do Sul, indo do município de Claraval, em MG, até o extremo sul da Patagônia chilena. Com aproximadamente 100 espécies, esta família monotípica é, portanto, endêmica do Sul da América do Sul e a maior parte da sua diversidade está situada no Sul do Brasil (cerca de 60 espécies)** (S Santos, Bond-Buckup, and Jara 2019; Bartholomei-Santos et al. 2019). A maioria das espécies possuem quelípodos assimétricos (Figura 3) – algo que ocorre inclusive nas fêmeas das espécies – indicando que as propriedades mecânicas, desempenho e função dos quelípodos diferem (Dalosto and Palaoro 2019). Ambos quelípodos são usados para alimentação, captura de presas e, para os machos, manuseio da fêmea durante a cópula (Dalosto and Palaoro 2019). O quelípodo maior também é bastante usado durante confrontos agonísticos com outros indivíduos da mesma espécie (Palaoro et al. 2020; Dalosto et al. 2019). Inclusive, alguns estudos demonstram que a variação na intensidade dos confrontos agonísticos está relacionada com a evolução biomecânica do quelípodo de algumas espécies de Aeglidae, a qual está fortemente associada a variabilidade da forma do quelípodo (Figura 3) (Palaoro et al. 2020). Portanto, os eglídeos são uma linhagem de Decapoda com uma história evolutiva ímpar. A história natural do grupo está entrelaçada com o quelípodo, devido ao seu uso antes e durante o acasalamento, o que permite um maior entendimento sobre as pressões seletivas que ocorrem nesse grupo. **A combinação entre história natural, diversidade na forma dos quelípodos e diversidade nas funções, faz com que Aeglidae seja uma linhagem interessante para o início de estudos de evolução do quelípodo.**



Figura 3. Diversidade de quelípodos em espécies do gênero *Aegla* Leach 1820. Da esquerda para a direita, linha superior: *Aegla spinipalma* Bond-Buckup & Buckup 1994; *A. inconspicua* Bond-Buckup & Buckup 1994; *A. plana* Buckup & Rossi, 1977 (Fotos: Sandro Santos). Linha média: *A. leptodactyla* Buckup & Rossi, 1977; *A. jarai* Bond-Buckup & Buckup, 1994; *A. camargoi* Buckup & Rossi, 1977 (Fotos: Sérgio Bueno). Linha inferior: *A. schmitti* Hobbs III, 1979; *A. itacolomiensis* Bond-Buckup & Buckup 1994; *A. perobae* Hebling & Rodrigues, 1977 (Fotos: Sérgio Bueno, Sandro Santos e Sérgio Bueno, respectivamente).

Para conseguir avançar nosso conhecimento sobre a evolução de quelípodos, precisarei coletar diversas espécies de eglídeos, principalmente aquelas presentes no Estado do Paraná. Por serem animais que ocorrem principalmente em cabeceiras de riachos de primeira ou segunda ordem e em áreas bem preservadas, nas quais a água é bem oxigenada (Bueno, Shimizu, and Moraes 2016), precisarei acessar diversas Unidades de Conservação do Estado do Paraná para conseguir coletá-las. Para responder as perguntas propostas, dividi o projeto em duas linhas de evidência, ambas retiradas do arcabouço demonstrado na Figura 2. A ideia é as duas linhas de evidência se unam no final para propor uma explicação de diversificação de quelípodos. Como os métodos para cada linha de evidência são distintos, no que segue abaixo, descreverei cada linha de evidência separadamente para ressaltar como cada etapa será executada, bem como facilitando a averiguação da exequibilidade de cada linha.

OBJETIVO GERAL

Montar um arcabouço empírico que nos permita explicar a grande diversidade de quelípodos em Decapoda unindo informações da biologia das espécies com princípios de engenharia e física.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Divido os objetivos específicos em duas linhas de evidência. Na primeira linha de evidência, proponho relacionar as variáveis mecânicas do quelípodo com o seu desempenho, avaliando como mudanças nas alavancas e músculos influenciam a força do mesmo. As variáveis mecânicas nesta linha de evidência são compostas pela vantagem mecânica, volume muscular, área de oclusão e força transmitida. A vantagem mecânica será mensurada através da eficiência com a qual a alavanca interna e externa do quelípodo (distância do músculo até o ponto de rotação do quelípodo e distância do ponto de rotação até o local que ocorre o fechamento, respectivamente) transmitem a força gerada pelo músculo. O volume muscular será mensurado através da área da cutícula na qual o músculo está inserido. A área de oclusão será mensurada como a área interna do quelípodo que efetivamente toca no objeto a ser manipulado. Por último, a força transmitida será mensurada com um transdutor de força que mede a força (em Newtons) com o qual o quelípodo está apertando o sensor.

Na segunda linha de evidência, avaliarei como os biomateriais que compõem o quelípodo e a sua forma auxiliam no desempenho da estrutura; a ideia é estudar como os biomateriais e a forma auxiliam o quelípodo a resistir os estresses de uso (apertar), quanto os estresses de defesa contra predadores e outros indivíduos da mesma espécie (e.g., ser apertado). Os biomateriais serão avaliados conforme o seu módulo de Young (uma métrica que nos informa a quantidade de deformação que ocorre dado um nível de estresse no material). A forma será avaliada com o uso de técnicas de morfometria geométrica.

Em ambas as linhas de evidência investigarei primeiro uma espécie e depois ampliarei para mais espécies dentro da família Aeglididae, avaliando o quanto os padrões mudam entre as espécies de diferentes clados. **Por ser uma pesquisa de cunho evolutivo, um objetivo**

secundário é mapear as espécies de eglídeos do Estado do Paraná, pois várias espécies necessitam ser coletadas e avaliadas. Portanto, este projeto aprofundará o conhecimento da fauna paranaense de Aeglidae, um grupo muito abundante nos nossos riachos, mas pouco conhecidos.

MATERIAIS E METODOLOGIAS

1. Primeira linha de evidência: *Morfologia + desempenho = biomecânica*

1.1. Objetivo

A biomecânica é provavelmente um dos aspectos mais fortemente relacionados com mudanças em forma e função de estruturas morfológicas (Higham et al. 2021). Aumentar a quantidade de músculo para aumentar a força de qualquer estrutura, por exemplo, requer uma mudança na forma da estrutura, uma vez que o músculo necessita de espaço para crescer. Porém, outras modificações podem ocorrer como, por exemplo, encurtamento do tamanho da alavanca que realiza a transmissão da força gerada até o objeto sendo apertado (Brown, Cassuto, and Loos 1979; Taylor 2001). Esse tipo de modificação altera tanto o desempenho quanto a forma do quelípodo de uma maneira distinta quando comparada ao aumento do tamanho do músculo. Apesar de serem diferentes, essas duas modificações podem atingir o mesmo objetivo: aumentar a força do quelípodo. Essa propriedade de várias modificações poderem chegar no mesmo resultado é chamado de *many-to-one-mapping* e já foi intensamente estudada nas mandíbulas de peixes (Wainwright et al. 2005). Portanto, a ideia principal dessa linha de evidência é testar o quanto modificações nos músculos e na alavanca estão relacionadas entre si, e o quanto elas estão relacionadas com o desempenho do quelípodo.

1.2. Métodos

1.2.1. Variáveis a serem mensuradas

O primeiro passo é usar o medidor de força de fechamento para aferir a força dos quelípodos de indivíduos de Aeglidae. O aparelho consiste em duas placas conectadas a uma célula de carga que transforma a deformação das placas em voltagem. A voltagem emitida pela célula de carga é então passada para um conversor que transforma a voltagem em Newtons (Rühr and Blanke

2022). **Como eu já possuo este aparelho, não prevejo que esta etapa seja um percalço para a execução do projeto.**

Após aferir a força dos indivíduos, pretendo sacrificá-los ou autotomizar seus quelípodos para medir a musculatura e as alavancas em laboratório. A musculatura será medida de duas formas. A primeira forma se caracteriza por pesar o quelípodo ainda intacto e depois de usar KOH para digerir a musculatura. A diferença deste peso é a quantidade de músculo que havia dentro do quelípodo. A segunda forma se caracteriza por usar o quelípodo com a musculatura já digerida, cortá-lo ao meio e medir a cutícula central (chamada apodema) (Benso-Lopes, Santos, and Palaoro 2019). O apodema é a cutícula na qual o músculo está inserido e realiza trabalho, fechando o quelípodo quando contraído. A área desta cutícula está fortemente associada com a seção transversal do músculo, dando uma medida robusta sobre o quanto de trabalho é realizado pelo músculo (Taylor 2001).

Para medir as alavancas, fotografarei a lateral dos quelípodos para medir tanto a alavanca interna (distância do apodema até o ponto de rotação) quanto a alavanca externa (distância do ponto de rotação até o tubérculo do dátilo). A divisão entre essas duas alavancas resulta em uma medida de eficiência das alavancas em transformar o trabalho do músculo em força real na hora de apertar (Palaoro et al. 2020). Por último, usarei ferramentas da morfometria geométrica para separar a forma do quelípodo do tamanho e poder usar as duas variáveis independentemente nas análises. Com esses dados coletados, conseguirei testar o quanto a morfologia do quelípodo está relacionado com o desempenho real do quelípodo, além de testar o quanto a morfologia está relacionada a forma.

Para medir a forma, usarei as mesmas fotografias da lateral dos quelípodos para usar técnicas de morfometria geométrica e representar a forma do quelípodo. Toda a parte de morfometria geométrica já foram realizada para outras espécies anteriormente por mim e, portanto, realizarei o mesmo procedimento (Palaoro et al. 2020; Palaoro, Muniz, and Santos 2020).

1.2.2. Espécies e coletas

Em um primeiro momento, pretendo realizar os testes na espécie *Aegla schmitti* que ocorre em abundância nas cercanias de Curitiba, como já demonstrado em vários trabalhos publicados pela Prof. Dra. Setuko Masunari. **O principal ponto de coleta desta espécie será no Parque Estadual Pico do Marumbi (Mananciais da Serra), pois lá se indivíduos dessa espécie são encontrados em abundância.** Após realizar todos os testes com esta espécie, tanto com machos como com fêmeas, irei expandir as coletas para outras espécies. Irei focar principalmente nas espécies paranaenses, como, por exemplo, *Aegla okora*, *Aegla castro*, *Aegla parana*, *Aegla lancinhas*, *Aegla loyolai*, *Aegla meloi*, *Aegla parva*, *Aegla lata* e *Aegla marginata*, pois todas são encontradas no Paraná, reforçando assim a diversidade no Estado. **Como essas espécies são encontradas em diversos pontos do Paraná, necessitarei acesso a diversas Unidades de Conservação do Estado do Paraná, a saber: Estação Ecológica do Caiuá, Floresta Estadual do Passa Dois, Parque Estadual Bosque das Araucárias, Parque Estadual da Cabeça do Cachorro, Parque Estadual do Cerrado, Parque Estadual do Guartelá, Parque Estadual de Amaporã, Parque Estadual de Ibicatu, Parque Estadual de São Camilo, Parque Estadual do penhasco Verde, Parque Estadual e Estação Ecológica da Ilha do Mel, Parque Estadual Mata dos Godoy, Três Barras do Paraná, Parque Estadual de Vila Velha, Parque Estadual de Vila Rica do Espírito Santo, Parque Estadual da Graciosa, Parque Estadual do Vale do Codó e Parque Estadual das Lauráceas. Portanto, este presente projeto abrange toda a diversidade de eglídeos do Estado do Paraná.**

Os métodos de coleta serão principalmente a busca ativa, a qual consiste em revirar pedras dentro de riachos de primeira ou segunda ordem lentamente e capturando os animais com as mãos. Também utilizaremos um puçá, o qual será ajustado a jusante do ponto de interesse; no ponto de interesse, iremos revirar as rochas e cascalhos a fim de que os indivíduos que se encontrem ali desçam até as redes. Por último, de armadilhas tipo covo iscadas com fígado de frango. As armadilhas são posicionadas em pontos estratégicos dentro do riacho no final da tarde de um dia e são removidos no dia seguinte pela manhã.

1.2.2. Análises estatísticas

Com todos os dados coletados, irei realizar as análises comparativas. Para isso, usarei de filogenias recentes publicadas para a família (Bartholomei-Santos et al. 2019). Nesta árvore, irei modelar a evolução das características morfológicas e de desempenho mensuradas usando métodos como *phylogenetic generalised least squares* (PGLS) implementado no software R (Revell

2012; R Core Team 2021). A forma, porém, terá de ser analisada usando o pacote *geomorph* por serem dados multidimensionais e não suportados pela PGLS (Adams and Otárola-Castillo 2013).

A segunda etapa da análise é testar a evolução da covariância dos elementos do quelípodo (e.g., alavancas e músculos) usando métodos como o *ratematrix*, também implementando no R (Caetano and Harmon 2017). Esta análise avalia não só como uma característica está evoluindo, mas também como a covariância das variáveis está evoluindo. Com isso, conseguimos correlacionar a história evolutiva de uma linhagem com modificações na covariância das partes do quelípodos. Com essas duas análises, é possível testar qual o caminho mais frequentemente trilhado na evolução dos quelípodos em Aeglidae.

2. Segunda linha de evidência: Biomateriais

2.1. Objetivos e breve introdução a biomateriais

Muitas vezes estudamos estruturas morfológicas de um ponto de vista ativo: a estrutura realiza a ação em um objeto. Porém, algumas vezes a estrutura morfológica é alvo de uma ação como, por exemplo, um predador atacando a estrutura. Portanto, tanto quanto a agilidade ou a força transmitida para um objeto, a morfologia, forma e desempenho de um quelípodo podem estar relacionadas a sua capacidade de lidar com pressões externas (Campbell and Dean 2019). Estudar biomateriais torna-se fundamental nesse ponto de vista. Como não estamos acostumados a pensar em biomateriais, irei adicionar uma parte mais extensa sobre o tema abaixo.

As propriedades dos biomateriais podem permitir que os animais superem desafios do mundo físico, mas também podem limitar o que as estruturas morfológicas podem fazer (Higham et al. 2021). As propriedades podem nos dizer como um material lida com estresses, como flexão, torção e compressão. Ao estudar suas propriedades, podemos compreender a resistência máxima do material (ou seja, a força na fratura), a tenacidade, o quanto ele se deforma sob estresse (ou seja, a tensão) e muitas outras propriedades que nos permitem inferir as capacidades do material para lidar com o mundo biológico (Campbell and Dean 2019). Embora as propriedades surjam da composição e da estrutura do material, elas podem ser investigadas em uma escala macro usando testes mecânicos de engenharia, como testes de

tração ou compressão (Vincent and Wegst 2004). Ossos são um exemplo bem estudado de como os biomateriais podem evoluir de acordo com as demandas funcionais e sob restrições evolutivas (Erickson, Catanese III, and Keaveny 2002). Por exemplo, os fêmures dos vertebrados que caminham em terra precisam resistir às altas cargas que o peso pode impor sobre eles sem se deformarem, já que a deformação pode prejudicar a conexão articular com os quadris ou com o restante da perna, afetando negativamente o ajuste do indivíduo (Erickson, Catanese III, and Keaveny 2002). Do ponto de vista do material, isso requereria um material com alta rigidez (ou seja, alto módulo de Young) que possa absorver estresse (força sobre área) sem muita deformação (quanto ele se deforma; Figura 4, curva 1) (Anderson and Kawano 2022). Ao observar a curva de tensão-deformação na Figura 4, podemos identificar materiais com alto módulo de Young que têm uma relação mais acentuada entre estresse e deformação (Figura 4, curva 1). O problema com materiais de alto módulo de Young é que eles não conseguem absorver muita energia. A energia, na relação tensão-deformação, é a área sob a curva (Figura 4). Materiais com um módulo de Young menor podem absorver muito mais energia, mas se deformam mais e, conseqüentemente, têm menor rigidez (Figura 4, curva 2). Devido às forças constantes e previsíveis impostas pelos animais vertebrados durante a caminhada/corrida, os fêmures evoluíram com biomateriais que normalmente mostram um alto módulo de Young que, embora mais suscetível a fraturas, são menos propensos a deformações ao longo da vida dos animais. Não surpreendentemente, as propriedades dos materiais dos fêmures são conservadas ao longo da evolução dos vertebrados (Erickson, Catanese III, and Keaveny 2002).

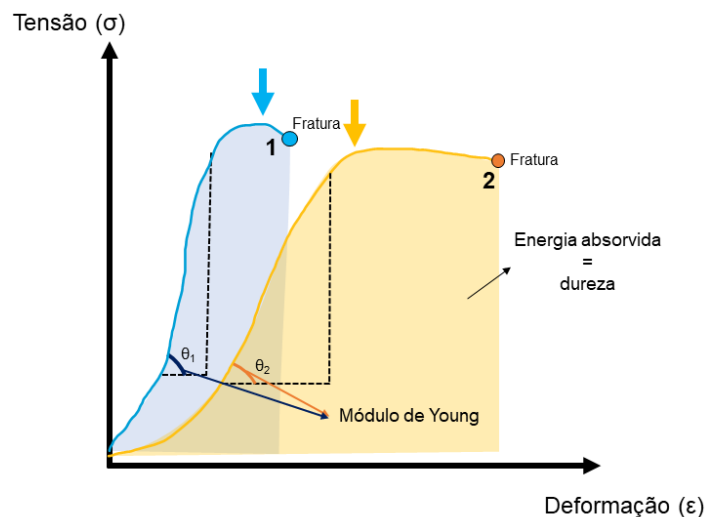


Figura 4. A relação tensão-deformação revela as propriedades de dois materiais hipotéticos. O Material 1 (azul) acumula mais tensão por deformação do que o Material 2 (amarelo). Quanto maior a tensão por deformação, mais inclinada é a relação entre tensão e deformação (θ_1), o que significa que ele possui um alto módulo de Young - uma medida de rigidez do material. O Material 2, por sua vez, tem um módulo de Young menor (θ_2), o que significa que ele absorve mais energia do que o Material 1, mas se deforma mais por unidade de tensão. A energia que esses dois materiais absorvem antes de fraturar - ou seja, a tenacidade - pode ser vista como a área sob cada curva. As linhas tracejadas são as projeções das respostas dos materiais no eixo x-y, usadas simplesmente para calcular o ângulo da relação entre tensão e deformação (θ_1 e θ_2). As duas setas indicam a resistência (*ultimate strength*) do material, também conhecida como a quantidade máxima de tensão que o material pode suportar. Assim, o Material 1 seria uma boa representação esquemática de um fêmur, porque ele suporta muita tensão com pouca deformação, exibindo um alto módulo de Young. O Material 2, por sua vez, é mais resistente e pode ser visto como a representação de uma galhada de cervo, pois suporta a tensão através de deformação (ou seja, deformando-se), mas também permite que o material absorva mais energia. Outras variáveis, como deformação elástica ou plástica, foram omitidas deste gráfico para maior clareza.

Para outros tipos de ossos, ter um alto módulo de Young pode ser problemático. Por exemplo, os cervídeos machos constantemente colidem suas galhadas contra as galhadas de oponentes durante lutas (Hoem et al. 2007). A energia transferida através desses impactos é maior do que aquela enfrentada pelos ossos que suportam a caminhada/corrida do animal. Uma estrutura com alta rigidez é mais propensa a quebrar diante de forças fortes e imprevisíveis, como as impostas pelos oponentes, comprometendo profundamente a aptidão indivíduo, uma vez que veados com galhadas quebradas têm menor probabilidade de se reproduzir (Shah, DesJardins, and Blob 2008; Blob and Snelgrove 2006). Com base nessas demandas funcionais, um material com um módulo de Young menor (ou seja, menor rigidez) seria muito mais eficiente para lidar com os estresses e deformações das lutas com as galhadas (Blob and Snelgrove 2006). Do ponto de vista da engenharia, seria mais fácil projetar um novo material que possa lidar com as tensões e deformações da luta. No entanto, a galhada ainda é um osso e está limitada pelos materiais que compõem um osso. Ao alterar a estrutura do osso (e.g., como as moléculas estão organizadas e quanto ar ele contém), as galhadas de fato possuem menor rigidez quando comparadas aos fêmures (Blob and Snelgrove 2006). **Portanto, os biomateriais podem estar sujeitos à seleção, assim como qualquer outra característica, mas frequentemente são ignorados. A chave é compreender como as propriedades desses**

biomateriais se unem às suas demandas funcionais. Quando essas duas peças estão conectadas, podemos entender o que o material é capaz e incapaz de fazer, gerando efetivamente uma regra geral de como o material pode ser utilizado e evoluir.

2.2. Métodos

2.2.1. Variáveis a serem mensuradas

Para testar os biomateriais dos quelípodos, **eu irei utilizar o microdurômetro (ou o nanodurômetro, dependendo da disponibilidade) no Laboratório de Propriedades Nanomecânicas do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais da UFPR, sob coordenação do Prof. Dr. Carlos Lepienski. Já conversei com o Dr. Lepienski sobre os equipamentos e ele me garantiu acesso.** Para o nanodurômetro, tudo que necessito é uma pequena amostra do exoesqueleto para realizar o teste. O aparelho tenta criar uma pequena indentação no material de interesse. Como se sabe as características do material que realiza a indentação (tipicamente diamante), baseado na profundidade da indentação que foi causada no material, é possível calcular o quanto de energia foi absorvida e o módulo de Young do material (Amini et al. 2018). Realizarei estes testes tanto em pelo menos três amostras de exoesqueleto do mesmo quelípodo e três amostras do exoesqueleto do mesmo local do cefalotórax para ter uma medida de precisão. Além disso, cada amostra será testada ao menos 5 vezes para ter uma medida de precisão de cada amostra. Assim, terei uma medida de precisão de cada pedaço de exoesqueleto testado e uma medida de precisão do indivíduo.

A segunda variável a ser obtida é uma representação 3D do quelípodo para modelar como a estrutura responde a tensão dada as características que foram medidas nos testes de materiais. Para fazer isso, necessitarei de micro-tomografia computadorizada dos quelípodos. Para realizar as tomografias, há dois caminhos. Primeiro, vou tentar realizar as micro-tomografias pela Universidade Federal do Paraná. Há um micro-tomógrafo ligado ao Departamento de Física. Porém, como nunca usei o aparelho, não sei se há a possibilidade de realizar as tomografias por lá. Segundo, caso não consiga na instituição, usarei o micro-tomógrafo do Museu de Zoologia de São Paulo. Já escaneei materiais lá e sei dos trâmites para realizar todos os processos para viabilizar o escaneamento. Além disso, posso pegar indivíduos emprestados da coleção de carcinologia do museu, eliminando boa parte do processo de coleta.

2.2.2. Coletas e espécies

Para realizar tanto as análises de biomateriais como as microtomografias usaremos os indivíduos coletados na linha de evidência anterior. Portanto, essa segunda linha de evidência também requer acesso as Unidades de Conservação do Estado do Paraná, a saber: Estação Ecológica do Caiuá, Floresta Estadual do Passa Dois, Parque Estadual Bosque das Araucárias, Parque Estadual da Cabeça do Cachorro, Parque Estadual do Cerrado, Parque Estadual do Guartelá, Parque Estadual de Amaporã, Parque Estadual de Ibicatu, Parque Estadual de São Camilo, Parque Estadual do penhasco Verde, Parque Estadual e Estação Ecológica da Ilha do Mel, Parque Estadual Mata dos Godoy, Três Barras do Paraná, Parque Estadual de Vila Velha, Parque Estadual de Vila Rica do Espírito Santo, Parque Estadual da Graciosa, Parque Estadual do Vale do Codó, Parque Estadual das Lauráceas e Estadual Pico do Marumbi (Mananciais da Serra). Os métodos de coleta também serão os mesmos. Todos os indivíduos serão armazenados em freezer comum para que não haja alteração do biomaterial devido a desidratação. Antes de os testes serem realizados, retiraremos os indivíduos do freezer e manteremos os indivíduos em soro fisiológico até descongelarem. Esse procedimento evita que a estrutura molecular do material seja alterada. Para a microtomografia, escanaremos um indivíduo por espécie. Como estamos interessados nas estruturas duras (e.g., exoesqueleto, cutículas), não há necessidade de preparação da amostra.

2.2.3. Análises estatísticas

Para os dados de biomateriais, testarei como o módulo de Young, fratura e a dureza (Figure 4) se relacionam com tamanho do quelípedo e sexo do indivíduo. O intuito dessa análise é testar se há modificações no material ao longo da ontogenia ou se é dependente do sexo do indivíduo. Após a análise ser realizada para *A. schmitti*, realizaremos a mesma análise para as outras espécies coletadas. As análises evolutivas serão realizadas da mesma forma como relatadas na linha de evidência anterior.

Após conseguir as microtomografias e transformar os quelípedo em malhas 3D, irei realizar a análise de elementos finitos (*finite element analysis, FEA*). As características dos materiais que foram acessadas anteriormente são adicionadas como camadas em um software open source, como o FEBio ou VOX-FE (Maas et al. 2012). Para esta etapa, contarei com a ajuda

de um aluno de pós-graduação egresso da UFPR, Dr. Cristian Klunk, e do Prof. Dr. Marco André Argenta do Departamento de Construção Civil. Ambos têm experiência com esta análise em materiais biológicos. Para aumentar a precisão da simulação, vou adicionar o músculo de fechamento do quelípodo aos modelos como um vetor entre o ponto de rotação do dátilo e a área do dátilo que aperta o oponente. Para poder comparar os modelos, padronizarei o valor das forças aplicadas usando a mesma abordagem descrita por (Marcé Nogué et al. 2013). Todas as variáveis necessárias, como a área de fixação do músculo, a espessura do exoesqueleto e a força de fechamento serão obtidas na fase anterior ou na Linha de Evidência isso. Com os modelos de Análise de Elementos Finitos (FEA) construídos, calcularei o estresse de Von Mises distribuído ao longo da malha 3D do quelípodo (Marcé-Nogué 2022). O estresse de Von Mises descreve a quantidade de estresse que diferentes partes de uma estrutura suportam quando uma força conhecida é aplicada, levando em conta o ponto de fratura do biomaterial que compõe essa estrutura (Marcé-Nogué 2022). Assim, para cada espécie, terei um modelo de FEA baseado em como os quelípodos respondem quando são apertados, seja por um oponente ou por predadores, permitindo-me visualizar e quantificar como as garras respondem a estresses.

Com os dados de estresse gerados pelo FEA e os dados de força e forma, iremos montar um espaço de forma e função com essas variáveis (*sensu* Stayton 2019). Para montar esse espaço, primeiro relacionaremos dois eixos de forma (através de uma análise de componentes principais) para criar um espaço de forma. Neste espaço de forma, adicionaremos um terceiro eixo que será relacionado a força de cada uma das estruturas. Com isso, teremos um espaço volumétrico que combina forma a função. Para adicionar os biomateriais, iremos usar o espaço ocupado pelas espécies para criar uma superfície de desempenho de biomateriais, prevendo o desempenho dos biomateriais nos espaços entre as espécies. Ao unir todas essas dimensões, conseguiremos calcular o quanto modificar forma, força, ou biomateriais pode alterar os outros componentes deste mesmo espaço, tendo uma métrica quantitativa de sensibilidade de cada componente a modificação nos outros.

CRONOGRAMA

Este projeto foi pensado para cinco anos para prover as condições necessárias para o nucleamento de um grupo de pesquisa em evolução e biomateriais de animais. O cronograma

foi subdividido em períodos de quatro meses. As células em cinza demonstram os períodos no qual a atividade será realizada.

Atividade	2024		2025			2026			2027			2028		
	4 m.	4 m.	4 m.	4 m.	4 m.	4 m.	4 m.	4 m.	4 m.	4 m.	4 m.	4 m.	4 m.	
Localizando locais para coleta														
Linha 1. Biomecânica														
Acertando protocolo com uma espécie														
Coletas de dados em mais espécies														
Análise de dados														
Preparação do manuscrito com uma espécie														
Preparação do manuscrito principal														
Linha 2. Função														
Filmando confrontos em uma espécie														
Alimentando o algoritmo de rede neural														
Coleta de dados em mais espécies														
Análise de dados														
Preparação do manuscrito com uma espécie														
Preparação do manuscrito principal														

Uma vez que a execução deste projeto depende de alguns fatores, os quais dificultam a determinação exata do período de visitação aos parques é difícil de prever. O principal fator complicador é da disponibilidade e liberação de recursos pelas agências financiadoras, da disponibilidade de veículos e da possibilidade da formação da equipe de coleta de acordo com a disponibilidade dos membros. Estes fatores interferem diretamente no planejamento para a execução do projeto e, conseqüentemente, da visitação das unidades de conservação. O que posso ressaltar é que todas as coletas realizadas com apenas *Aegla schmitti* serão realizadas no Parque Estadual do Pico Marumbi (Mananciais da Serra); portanto, neste parque o acesso será frequente (nos meses propícios) e ocorrerá durante toda a vigência deste projeto. Apesar disso, me comprometo a informar com a maior brevidade possível qualquer eventual alteração, sempre que obtiver uma posição da agência financiadora e da universidade em que o projeto é executado. Por ser um projeto que não demanda de visitas recorrentes ao mesmo local, não há necessidade especial de manejo da área para que possamos coletar.

REFERÊNCIAS

Adams, Dean C., and Erik Otárola-Castillo. 2013. "Geomorph: An r Package for the Collection and Analysis of Geometric Morphometric Shape Data." *Methods in Ecology and Evolution* 4 (4): 393–99. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12035>.

- Amini, Shahrouz, Maryam Tadayon, J. Q. Isaiah Chua, and Ali Miserez. 2018. "Multi-Scale Structural Design and Biomechanics of the Pistol Shrimp Snapper Claw." *Acta Biomaterialia* 73 (June): 449–57. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.04.038>.
- Anderson, Philip S L, and Sandy M Kawano. 2022. "Different Traits at Different Rates: The Effects of Dynamic Strain Rate on Structural Traits in Biology." *Integrative and Comparative Biology* 62 (3): 683–99. <https://doi.org/10.1093/icb/icac066>.
- Bartholomei-Santos, M.L., S. Santos, B.L. Zimmerman, Marcos Pérez-Losada, and Keith A. Crandall. 2019. "Evolutionary History and Phylogenetic Relationships of Aeglidae." In *Aeglidae: Life History and Conservation Status of Unique Freshwater Anomuran Decapods*, 1–28. Boca Raton: CRC Press.
- Benso-Lopes, Fernando, Sandro Santos, and Alexandre V. Palaoro. 2019. "Underwater Compensation for Exaggerated Weaponry: The Role of Morphology and Environment on Crab Locomotor Performance." *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology* 331 (7): 382–91. <https://doi.org/10.1002/jez.2305>.
- Blob, Richard W., and Jason M. Snelgrove. 2006. "Antler Stiffness in Moose (*Alces Alces*): Correlated Evolution of Bone Function and Material Properties?" *Journal of Morphology* 267 (9): 1075–86. <https://doi.org/10.1002/jmor.10461>.
- Brown, Stephen C., Sherri R. Cassuto, and Ryland W. Loos. 1979. "Biomechanics of Chelipeds in Some Decapod Crustaceans." *Journal of Zoology* 188 (2): 143–59. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1979.tb03397.x>.
- Bueno, Sérgio Luiz de Siqueira, Roberto Munehisa Shimizu, and Juliana Cristina Bertacini Moraes. 2016. "A Remarkable Anomuran: The Taxon *Aegla* Leach, 1820. Taxonomic Remarks, Distribution, Biology, Diversity and Conservation." In *A Global Overview of the Conservation of Freshwater Decapod Crustaceans*, edited by Tadashi Kawai and Neil Cumberlidge, 23–64. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-42527-6_2.
- Caetano, Daniel S., and Luke J. Harmon. 2017. "Ratematrix: An R Package for Studying Evolutionary Integration among Several Traits on Phylogenetic Trees." *Methods in Ecology and Evolution* 8 (12): 1920–27. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12826>.
- Campbell, Robert A, and Mason N Dean. 2019. "Adaptation and Evolution of Biological Materials." *Integrative and Comparative Biology* 59 (6): 1629–35. <https://doi.org/10.1093/icb/icz134>.
- Dalosto, Marcelo M., Luciane Ayres-Peres, Paula B. Araujo, Sandro Santos, and Alexandre V. Palaoro. 2019. "Pay Attention to the Ladies: Female Aggressive Behavior and Weapon Allometry Provide Clues for Sexual Selection in Freshwater Anomurans (Decapoda: Aeglidae)." *Behavioral Ecology and Sociobiology* 73 (9): 127. <https://doi.org/10.1007/s00265-019-2741-5>.
- Dalosto, Marcelo M., and Alexandre V. Palaoro. 2019. "Intra- and Interspecific Behavioral Interactions of Aeglidae with a Comparison to Other Decapods." In *Aeglidae*, edited by Sandro Santos and Sergio L S Bueno, 181–95. CRC Press.
- Davie, Peter, Daniele Guinot, and Peter Ng. 2015. "Anatomy and Functional Morphology of Brachyura." In *Decapoda: Brachyura (Part 1). Treatise on Zoology – Anatomy, Taxonomy, Biology*, edited by P. Castro, P.J.F. Davie, D. Guinot, F.R. Schram, and J.C. Von Vaupel Klein, 9C:11–163. The Crustacea. Leiden & Boston: Brill.
- Erickson, Gregory M., Joseph Catanese III, and Tony M. Keaveny. 2002. "Evolution of the Biomechanical Material Properties of the Femur." *The Anatomical Record* 268 (2): 115–24. <https://doi.org/10.1002/ar.10145>.

- Fujiwara, Shin-ichi, and Hiroki Kawai. 2016. "Crabs Grab Strongly Depending on Mechanical Advantages of Pinching and Disarticulation of Chela." *Journal of Morphology* 277 (10): 1259–72. <https://doi.org/10.1002/jmor.20573>.
- Higham, Timothy E., Lara A. Ferry, Lars Schmitz, Duncan J. Irschick, Samuel Starke, Philip S. L. Anderson, Philip J. Bergmann, et al. 2021. "Linking Ecomechanical Models and Functional Traits to Understand Phenotypic Diversity." *Trends in Ecology & Evolution* 36 (9): 860–73. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2021.05.009>.
- Hoem, Stein Arild, Claudia Melis, John D. C. Linnell, and Reidar Andersen. 2007. "Fighting Behaviour in Territorial Male Roe Deer *Capreolus Capreolus*: The Effects of Antler Size and Residence." *European Journal of Wildlife Research* 53 (1): 1–8. <https://doi.org/10.1007/s10344-006-0053-3>.
- Irschick, Duncan J., Jerry J. Meyers, Jerry F. Husak, and Jean-François Le Galliard. 2008. "How Does Selection Operate on Whole-Organism Functional Performance Capacities? A Review and Synthesis." *Evolutionary Ecology Research* 10 (2): 177–96.
- Lee, S. Y. 1995. "Cheliped Size and Structure: The Evolution of a Multi-Functional Decapod Organ." *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, Behavioural Ecology of Decapod Crustaceans: An Experimental Approach*, 193 (1): 161–76. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(95\)00116-6](https://doi.org/10.1016/0022-0981(95)00116-6).
- Maas, Steve A., Benjamin J. Ellis, Gerard A. Ateshian, and Jeffrey A. Weiss. 2012. "FEBio: Finite Elements for Biomechanics." *Journal of Biomechanical Engineering* 134 (1). <https://doi.org/10.1115/1.4005694>.
- Marcé Nogué, Jordi, Daniel DeMiguel, Josep Fortuny Terricabras, Soledad de Esteban Trivigno, and Lluís Gil Espert. 2013. "Quasi-Homothetic Transformation for Comparing the Mechanical Performance of Planar Models in Biological Research." *Palaeontologia Electronica* 16 (3): 1–15.
- Marcé-Nogué, Jordi. 2022. "One Step Further in Biomechanical Models in Palaeontology: A Nonlinear Finite Element Analysis Review." *PeerJ* 10 (August): e13890. <https://doi.org/10.7717/peerj.13890>.
- Mariappan, Pitchaimuthu, Chellam Balasundaram, and Barbara Schmitz. 2000. "Decapod Crustacean Chelipeds: An Overview." *Journal of Biosciences* 25 (3): 301–13. <https://doi.org/10.1007/BF02703939>.
- Palaoro, Alexandre V., Marcelo M. Dalosto, Juliana Resende Costa, and Sandro Santos. 2014. "Freshwater Decapod (*Aegla Longirostri*) Uses a Mixed Assessment Strategy to Resolve Contests." *Animal Behaviour* 95: 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2014.06.014>.
- Palaoro, Alexandre V., Danilo G. Muniz, and Sandro Santos. 2020. "Harder, Better, Faster, Stronger: Weapon Size Is More Sexually Dimorphic than Weapon Biomechanical Components in Two Freshwater Anomuran Species." *Journal of Morphology* n/a (n/a). <https://doi.org/10.1002/jmor.21234>.
- Palaoro, Alexandre V., Paulo Enrique Cardoso Peixoto, Fernando Benso-Lopes, Danessa Schardong Boligon, and Sandro Santos. 2020. "Fight Intensity Correlates with Stronger and More Mechanically Efficient Weapons in Three Species of *Aegla* Crabs." *Behavioral Ecology and Sociobiology* 74 (5): 53. <https://doi.org/10.1007/s00265-020-02834-z>.
- R Core Team. 2021. "R: A Language and Environment for Statistical Computing." Vienna, Austria. <https://www.R-project.org>.
- Revell, Liam J. 2012. "Phytools: An R Package for Phylogenetic Comparative Biology (and Other Things)." *Methods in Ecology and Evolution* 3 (2): 217–23. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2011.00169.x>.

- Rühr, Peter T., and Alexander Blanke. 2022. "forceX and forceR: A Mobile Setup and r Package to Measure and Analyse a Wide Range of Animal Closing Forces." *Methods in Ecology and Evolution* 13 (9): 1938–48. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13909>.
- Santos, S, Georgina Bond-Buckup, and C.G. Jara. 2019. "Morphology, Taxonomy, and Diversity of Extant Aeglidae." In *Aeglidae: Life History and Conservation Status of Unique Freshwater Anomuran Decapods*, edited by S Santos and S.L.S. Bueno, 29–72. Boca Raton: CRC Press.
- Shah, Sagar R., John D. DesJardins, and Richard W. Blob. 2008. "Antler Stiffness in Caribou (*Rangifer Tarandus*): Testing Variation in Bone Material Properties between Males and Females." *Zoology* 111 (6): 476–82. <https://doi.org/10.1016/j.zool.2007.12.001>.
- Stayton, C. Tristan. 2019. "Performance in Three Shell Functions Predicts the Phenotypic Distribution of Hard-Shelled Turtles." *Evolution* 73 (4): 720–34. <https://doi.org/10.1111/evo.13709>.
- Taylor, Graeme M. 2001. "The Evolution of Armament Strength: Evidence for a Constraint on the Biting Performance of Claws of Durophagous Decapods." *Evolution* 55 (3): 550–60. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2001.tb00788.x>.
- Versluis, Michel, Barbara Schmitz, Anna von der Heydt, and Detlef Lohse. 2000. "How Snapping Shrimp Snap: Through Cavitating Bubbles." *Science* 289 (5487): 2114–17. <https://doi.org/10.1126/science.289.5487.2114>.
- Vincent, Julian F. V, and Ulrike G. K Wegst. 2004. "Design and Mechanical Properties of Insect Cuticle." *Arthropod Structure & Development, Arthropod Locomotion Systems: from Biological Materials and Systems to Robotics*, 33 (3): 187–99. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2004.05.006>.
- Wainwright, Peter C. 2007. "Functional Versus Morphological Diversity in Macroevolution." *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 38: 381–401.
- Wainwright, Peter C., Michael E. Alfaro, Daniel I. Bolnick, and C. Darrin Hulsey. 2005. "Many-to-One Mapping of Form to Function: A General Principle in Organismal Design?" *Integrative and Comparative Biology* 45 (2): 256–62. <https://doi.org/10.1093/icb/45.2.256>.