Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

ERYKA ZOLCSÁK DE SOUSA

O desenvolvimento embrionário da Piapara - *Leporinus elongatus*

(Pisces - Anostomidae) utilizando marcadores ósseos

São Paulo

2014

ERYKA ZOLCSÁK DE SOUSA

**O desenvolvimento embrionário da Piapara – *Leporinus elongatus*
(Pisces, Anostomidae) utilizando marcadores ósseos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. José Roberto Kfoury Júnior

São Paulo

2014

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2949
FMVZ

Sousa, Eryka Zolcsák de
O desenvolvimento embrionário da Piapara – *Leporinus elongatus* (Pisces, Anostomidae) utilizando
marcadores ósseos / Eryka Zolcsák de Sousa. -- 2014.
53 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Prof. Dr. José Roberto Kfoury Júnior.

1. Imunohistoquímica. 2. Ontogenia. 3. Osteologia. 5. Piapara. 6. Ultraestrutura. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Desenvolvimento embrionário da Piapara - *Leporinus elongatus* (Pisces, Anostomidae) utilizando marcadores ósseos", protocolado sob o nº 2369, utilizando 12 (doze) piaparas, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. José Roberto Kfoury Junior, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 21/9/2011.

We certify that the Research "Embrionic development of piapara - *Leporinus elongatus* (Pisces, Anostomidae) using bone markers", protocol number 2369, utilizing 12 (twelve) fishies, under the responsibility Prof. Dr. José Roberto Kfoury Junior, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 9/21/2011.

São Paulo, 21 de setembro de 2011.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SOUSA, Eryka Zolcsák

Título: O desenvolvimento embrionário da Piapara – *Leporinus elongatus* (Pisces, Anostomidae) utilizando marcadores ósseos.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ **Julgamento:** _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ **Julgamento:** _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ **Julgamento:** _____

Esta pesquisa foi parcialmente financiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

DEDICATÓRIA

Aos animais, pois sem eles nada disso seria possível...

A Deus, por sempre guiar o meu caminho...

Aos meus pais, por me ensinarem o valor do trabalho e da vida, e dedicarem grande parte da sua para meu crescimento pessoal e profissional, esse trabalho é de vocês também...

Ao meu namorado, por estar pacientemente ao meu lado em todos os momentos difíceis que enfrentei me ajudando tanto na prática, quanto psicologicamente, tornando possível a conclusão deste trabalho...

Ao meu irmão Thyago, cunhada-irmã Dani, prima-irmã Carol, tia-mãe Susi e avó-mãe Gabi, pela força e ternura familiar...

Aos meus cães Thor, Brisa e Chico, e meu cavalo Doeta pela alegria e companheirismo de todos os dias...

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ, pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Roberto Kfoury Jr; por acreditar em meu potencial, pela paciência e pelos ensinamentos.

Ao Dr. Wesley Meireles, juntamente com a Estação de Piscicultura da Usina Machado Mineiro – Programa Peixe Vivo da CEMIG/MG pela doação do material.

À coordenadora da pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, professora Dra. Maria Angélica Miglino, pelas aulas de embriologia e todos os ensinamentos.

A todos os professores da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), do Instituto de Biociências (IB), do Instituto Oceanográfico (IO) e do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo, pelas disciplinas ministradas, onde cada uma me ajudou de alguma forma para a realização desse trabalho.

Ao professor Dr. Francisco Javier Hernandez Blazquez e colegas do Laboratório de Anatomia Microscópica e Imunohistoquímica, André Luiz Veiga Conrado e Diogo Nader Palermo pelo auxílio nas técnicas de imunohistoquímica.

Aos Funcionários do Setor de Anatomia Veterinária, em especial ao Maicon Barbosa da Silva, Jaqueline Martins de Santana, Edinaldo Ribas Farias (Índio) e Ronaldo Agostinho da Silva, pela amizade e convivência.

À Dra. Lara Maria Guimarães e a Dra. Rose Eli Grassi Rici pelo auxílio na utilização do Microscópio Eletrônico de Varredura.

Ao pessoal do Museu de Zoologia da USP, Dr. José Luis Olivan Birindelli, Dr. Osvaldo Takeshi Oyakawa e Michel Donato Gianeti, pelo auxílio na maceração dos peixes com utilização dos dermestídeos e nas imagens dos esqueletos.

À Dra. Maria Inês Borella, e suas orientadas, e o técnico Cruz, por toda ajuda nas técnicas de Imunohistoquímica.

À pessoa que mais me amparou nessa pesquisa, o querido colega Lázaro Oliveira, por todo o seu apoio, paciência e “socorros” dados ao longo dessa pesquisa, saiba que sem você, ela não seria possível, os meus sinceros agradecimentos!

"Todas as coisas da criação são filhos do Pai e irmãos do homem... Deus quer que ajudemos aos animais, se necessitam de ajuda. Toda criatura em desgraça tem o mesmo direito a ser protegida."
São Francisco de Assis

RESUMO

SOUSA, E.Z. **O desenvolvimento embrionário da Piapara – *Leporinus elongatus* (Pisces, Anostomidae) utilizando marcadores ósseos.** [Embryonic development of piapara - *Leporinus elongatus* (Pisces, Anostomidae) using bone markers]. 2014. 54 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

O conhecimento dos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário de peixes é de extrema importância para o estudo de espécies nativas com potencial para a piscicultura, uma vez que permite o estabelecimento de diretrizes para a criação destes animais. Este projeto estudou o desenvolvimento embrionário da piapara (*Leporinus elongatus*), um peixe de grande importância na pesca esportiva e profissional na bacia dos rios Pardo e Jequitinhonha, visando compreender as fases desse animal em diversos estágios de desenvolvimento, utilizando marcadores ósseos que possibilitaram visualizar o desenvolvimento ósseo da espécie. As Proteínas Ósseas Morfogenéticas (BMP-2 e BMP-4) são consideradas moléculas essenciais reguladoras no desenvolvimento embrionário e na formação óssea, sendo ainda pouco estudadas em peixes; tais proteínas puderam ser observadas apenas no estágio larval até o período juvenil, não sendo evidenciadas nos estágios anteriores. Foram utilizadas também técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura e histológicas, onde foi possível visualizar as fases principais do desenvolvimento embrionário, entre elas, clivagens, diferenciação do embrião, formação dos órgãos principais, abertura de boca, pigmentação dos olhos, surgimento das nadadeiras e sistema branquial, dados estes que facilitam a compreensão sobre a ontogenia; além de criar dados embriológicos e anatômicos dessa espécie ainda pouco explorada, conhecimentos estes, imprescindíveis à biologia pesqueira e cultivo das mesmas, sendo também um auxiliar a novas pesquisas.

Palavras-chave: Imunohistoquímica. Ontogenia. Osteologia. Piapara. Ultraestrutura.

ABSTRACT

SOUSA, E.Z. **Embryonic development of piapara - *Leporinus elongatus* (Pisces, Anostomidae) using bone markers** [O desenvolvimento embrionário da Piapara – *Leporinus elongatus* (Pisces, Anostomidae) utilizando marcadores ósseos]. 2014 54 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

The knowledge of the early stages of embryonic development in fish is of great importance for the study of native species with potential for aquaculture, since it allows the establishment of guidelines for the breeding of these animals. This project studied the embryonic development of piapara (*Leporinus elongatus*), a fish of great importance in professional and amateur fishing from the basin of the Pardo and Jequitinhonha rivers, aiming to understand the various stages of development, using bone markers that allowed observation of the bone development in this species. The Bone Morphogenetic Proteins (BMP-2 and BMP-4) are known as key regulatory molecules in embryonic development and bone formation, and information on this subject is scarce in fish. Results shown these proteins could be observed only between the larval to the juvenile stage, not being seen at earlier stages. Scanning electron microscopy and histological techniques, where it was possible to observe the main stages of embryonic development, including, cleavage, embryo differentiation, development of major organs, mouth opening, eye pigmentation, appearance of fins and gills system. This data contributed for the understanding of ontogeny, and provided embryological and anatomical data that may help other studies like reproductive biology of this species that surely will improve reproductive techniques, important goal for raising the piapara.

Keywords: Immunohistochemistry. Ontogeny. Osteology. Piapara. Ultrastructure.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos Específicos	19
3 REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1 Biologia da Espécie	20
3.2 Estudo do Desenvolvimento Embrionário	21
3.3 Esqueleto dos Peixes	24
3.4 Proteína Óssea (BMP)	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1 Amostragem	27
4.2 Microscopia de Luz-Histologia	28
4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	29
4.4 Imunohistoquímica	30
4.5 Montagem dos Esqueletos	31
5 RESULTADOS	33
5.1 Ovos	33
5.2 Embriogênese	33
5.3 Eclosão e Larvas	37
5.4 Juvenil	37
5.5 Imunohistoquímica	39
5.6 Esqueletos	41
6 DISCUSSÃO	44
7 CONCLUSÕES	48
8 REFERÊNCIAS	50

1 INTRODUÇÃO GERAL

A ictiofauna brasileira compreende 2.300 espécies de água doce (REIS et al., 2003) e 1.298 espécies marinhas, segundo Menezes et al. (2003). Todavia, o conhecimento sobre a diversidade desta fauna é ainda incompleto, como atestam as dezenas de espécies de peixes descritas anualmente no Brasil e, portanto, é de se prever que a riqueza total efetiva seja ainda muito maior (ROSA; LIMA, 2008).

Dentre as bacias hidrográficas brasileiras, do ponto de vista ictiológico, a do rio Pardo, apesar de suas dimensões, ainda é pouco conhecida (LOWE-McCONNELL, 1999), sendo que os dados atualmente existentes na literatura científica são insuficientes para elucidar o comportamento reprodutivo de muitas de suas espécies (MEIRELES et al., 2011).

O conhecimento da ontogênese de peixes brasileiros é escasso, especialmente das espécies migradoras, sendo seu estudo importante para o conhecimento da história de vida inicial, para taxonomia e larvicultura (GODINHO; GODINHO et al., 2003). Considerando a grande diversidade das espécies de peixes e a consequente diferenciação morfofisiológica, vários estudos vêm sendo realizados, procurando relacionar as características estruturais, anatômicas, histológicas dos sistemas digestório, reprodutor e esquelético dos peixes com seus hábitos e comportamentos (SEIXAS-FILHO et al., 2000).

A piapara, inicialmente nomeada de *Leporinus crassilabris* (BORODIN, 1929), sendo renomeado para *Leporinus elongatus* (GÉRY; MAHNERT; DLOUHY, 1987) apresentando coloração prateada, caracterizado por três manchas pretas nas laterais do corpo acima da linha lateral e pelas colorações amareladas de suas nadadeiras. *L. elongatus* tem o corpo alongado, alto e fusiforme, com hábito de formar cardumes e frequentar as partes médias e inferiores de águas paradas (REIS et al., 2003). Considerado como um peixe ameaçado de extinção nas bacias em que estão presentes devido à sobrepesca (MACHADO; DRUMMOND; PAGLIA, 2008), vem justificando seus estudos reprodutivos, ecológicos e zootécnicos.

Em peixes, o desenvolvimento ontogenético compreende todo o período do ciclo biológico que abrange ovos, embriões, larvas até a diferenciação histológica, sendo importante por fornecer subsídios para aquicultura, identificação de ovos e larvas na natureza, estudos taxonômicos/filogenéticos e de biologia do desenvolvimento (NAKATANI et al., 2001) além de oferecer parâmetros importantes nas análises das relações evolutivas entre espécies (SILVEIRA, 2004).

A maioria dos trabalhos de desenvolvimento embrionário foi feito com utilização de estereomicroscópio ou microscopia de luz, sendo escassos os trabalhos realizados com a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). A MEV fornece imagens tridimensionais das estruturas dos tecidos e órgãos, oferecendo desta forma uma nova perspectiva de análise, complementando assim, dados que não são observados em microscopia de luz (GANECO, 2003).

A morfologia óssea é muito importante em estudos ictiológicos, quando se quer delimitar caracteres diagnósticos específicos, permitindo uma melhor definição dos grupos (CAMPELLO; BEMVENUTI, 2002). O estudo do desenvolvimento ósseo em peixes juvenis e adultos tem dado suporte a trabalhos nas mais variadas áreas, como a sistemática filogenética (FRITZSCHE, 1984; AZZARELLO, 1990), como também a biologia e ecologia (PAULUS, 1994).

Com o surgimento de novas tecnologias de pesquisa, como a imunohistoquímica e a hibridização *in situ*, tornou-se possível estudar a osteogênese de peixes nos níveis da biologia celular e molecular (TAM et al., 2003). Atualmente tem-se conhecimento de vários fatores de crescimento, como o fator de crescimento e transformação (TGF- β), o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), as proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs), entre outros, que participam do processo de desenvolvimento do tecido ósseo (CHANDLER et al., 2007). As BMPs podem ser subdivididas em até nove classes (BPM1-9) (TAM et al., 2003), sendo que, com exceção da BPM1, as BPM 2 a 9 possuem sequência de aminoácidos que as identifica como membros da superfamília dos TGF- β (KINGSLEY, 1994) e a BMP-2 apresenta um forte potencial de osteoindução (FUKUDA et. al., 2005).

O presente projeto visou estudar a ontogenia da piapara (*Leporinus elongatus*) de modo a compreender os seus estádios de desenvolvimento pela utilização do microscópio estereoscópico, histologia e ultraestrutura, além de utilizar BMP-2 e BMP-4 como marcadores moleculares no desenvolvimento ósseo, sendo um auxiliar no estudo da reprodução, além de criar dados embriológicos e anatômicos dessa espécie pouco explorada.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar o desenvolvimento embrionário do peixe *Leporinus elongatus* reproduzidos na Estação de Piscicultura da Usina Hidrelétrica de Machado Mineiro, visando compreender sua ontogenia utilizando marcadores que possibilitaram visualizar o desenvolvimento ósseo da espécie.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar, analisar e estabelecer a duração das diferentes fases do desenvolvimento embrionário na espécie estudada.
- Identificar ao longo do desenvolvimento ontogenético dos peixes em estudo, a expressão dos fatores de crescimento BMP-2 e 4, importantes no processo de ossificação, através da técnica de imunohistoquímica.
- Realizar identificação da morfologia óssea dos peixes através da montagem do esqueleto, para verificar os padrões na osteologia, ampliando dados para facilitar diferenciação e identificação taxonômica da espécie estudada.
- Analisar e classificar os tipos de ovos e estratégias reprodutivas dos peixes em estudo.

Revisão de Literatura

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Biologia da espécie

A família Anostomidae abrange peixes caracterizados pelo corpo alongado e fusiforme, narina em forma de tubo, dentes incisivos em número de 6 a 8 em cada maxila, firmemente implantados. A nadadeira anal é curta com 10 a 13 raios, e a dorsal implantada ao nível médio do corpo. A maioria desses peixes apresenta hábitos onívoros, alimentando-se exclusivamente de algas filamentosas, raízes de gramíneas e de pequenos frutos e sementes (FERREIRA; ZUANON; SANTOS, 1998).

O peixe *Leporinus elongatus*, inicialmente classificado *Leporinus crassilabris* em várias bacias brasileiras, é uma das 110 espécies pertencentes à família Anostomidae, grupo de peixes da ordem Characiformes, existente abundantemente em todas as bacias hidrográficas do Brasil (SANTOS et al., 2009). Com distribuição nas bacias dos rios Pardo e Jequitinhonha, essa espécie vem desaparecendo, sendo questionado pela população ribeirinha e entrando na lista de animais ameaçados de extinção (MACHADO; DRUMMOND; PAGLIA, 2008).

3.2 Estudo do Desenvolvimento Embrionário

Em relação ao grande número de espécies nativas brasileiras, muito pouco se conhece acerca do seu desenvolvimento embrionário (HONCZARYK, 1995). O estudo dos embriões se torna importante porque eles podem ser utilizados em uma grande variedade de pesquisas. A descrição das fases embrionárias pode auxiliar na identificação dos ovos viáveis em estudos de produtividade e sobrevivência, já que os ovos de peixes variam em tamanho, forma, cor, número e densidade específica de acordo com a espécie (LAGLER, 1959). Além disso, podem servir para estudar diversos aspectos da ontogenia e serem utilizados como objeto de experimentação na avaliação da qualidade do ambiente e do efeito de substâncias tóxicas sobre a fauna aquática (FLORES et al., 2002)

O processo embrionário inicia-se com a fecundação do óvulo pelo espermatozoide, via micrópila, e logo após a fertilização, o ovo absorve água ocorrendo à formação do espaço perivitelino, com a separação do córion da membrana vitelina (GODINHO; GODINHO, 2003). Os ovos dos peixes geralmente são classificados como telolécitos, com um elevado suprimento de vitelo, do qual o embrião nutrir-se-á durante a embriogênese, o que é também utilizado para nutrir a larva por algum tempo após a eclosão (WOYNAROVICH; HORVÁTH, 1980).

A primeira etapa da ontogenia inicia-se com o ovo recém-fertilizado, compreendendo desde a fertilização até a organização dos polos animal (representado pelo blastodisco) e vegetativo (NAKATANI et al., 2001). Logo em seguida é descrita a fase de segmentação que é caracterizada por clivagens sucessivas do blastodisco, originando os blastômeros (WOYNAROVICH; HORVÁTH, 1980). Depois é seguida pela fase de Blástula, no qual o blastodisco apresenta-se estratificado e alto, com pequenas cavidades entre os blastômeros e a presença de uma lâmina sincicial perivitelina (NAKATANI et al., 2001). Na fase de gástrula, as células do blastodisco deslocam-se e separam-se em epiblasto (futuro folheto externo) e hipoblasto (notocorda, meso e endoderme). O epiblasto e a lâmina sincicial perivitelina expandem-se como um manto

que recobre inicialmente metade do vitelo, em seguida $\frac{3}{4}$ e, finalmente, fecha o blastóporo (GODINHO; GODINHO, 2003). A seguir, na fase de nêurula ocorre a formação da vesícula óptica, vesícula auditiva com o aparecimento dos otólitos e finalmente a liberação da cauda, destacando-se do saco vitelino (NAKATANI et al., 2001).

A eclosão do córion ocorre após contrações musculares vigorosas da cauda e do corpo, permitindo que as larvas eclodam (WOYNAROVICH; HORVÁTH, 1980). Após a eclosão, o embrião torna-se muito ativo, ficando o córion amolecido com o resultado da ação de enzimas, sendo que o grau de diferenciação da larva recém-eclodida depende da espécie considerada e relaciona-se ao tamanho do ovo, como o período de incubação depende desses fatores e da temperatura (BLAXTER, 1988).

A maioria das larvas de água doce eclode com a boca e mandíbula ainda não formadas, os olhos não pigmentados, o saco vitelino grande e a nadadeira primordial localizada na posição mediana, estendendo-se por todo o corpo (NAKATANI et al., 2001). Nesse período, poucos melanóforos são visualizados e a larva é muito transparente, no entanto, todas as larvas recém-eclodidas apresentam neuromastos na cabeça e corpo e os otólitos são distintos na cápsula ótica (BLAXTER, 1988).

O estágio larval pode durar de alguns dias a meses, dependendo da temperatura e da espécie, sendo que durante esse tempo, a larva duplica seu comprimento e aumenta de peso em até 100 vezes (WOYNAROVICH; HORVÁTH, 1980). Ocorre diferenciação progressiva de caracteres adultos, tais como raios das nadadeiras e ossificação do esqueleto, e então a larva passa por um processo de metamorfose até o período juvenil (NAKATANI et al., 2001). O sangue torna-se pigmentado, as escamas e os pigmentos aparecem na superfície do corpo, os caracteres merísticos, tais como raios das nadadeiras, são completados e a forma do corpo torna-se igual à do adulto (BLAXTER, 1988).

A descrição dos estádios embrionários de uma espécie pode fornecer inúmeras vantagens, como o reconhecimento de seus embriões em ambientes naturais, detecção das alterações relacionadas aos fatores ambientais e patologias nas incubadoras, além de permitir um melhor estudo da biologia e sistemática da espécie

(REYNALTE-TATAJE et al., 2004). Caracterizada por uma série de importantes alterações estruturais e fisiológicas de alguns sistemas orgânicos, a ontogenia das larvas de peixes é um processo em constantes mudanças, sendo que, as modificações no estado ontogênico tendem a coincidir frequentemente com as mudanças da alimentação, micro-habitat, comportamento, desempenho ou qualquer associação entre estes (MACIEL, 2006).

Portanto, estudos de ovos e larvas são relevantes para o conhecimento global da biologia e sistemática das espécies de peixes, particularmente em seus aspectos relacionados à variação ontogênica na morfologia, crescimento, alimentação, comportamento e mortalidade (HEMPEL, 1973). O fato de as larvas, além de representarem fases críticas ao sucesso do recrutamento, se apresentarem como organismos distintos dos adultos em relação aos requerimentos ecológicos e na alocação de recursos, torna esses estudos imprescindíveis ao entendimento da autoecologia e da dinâmica populacional.

Embriogênese é considerada neste trabalho como sendo o período compreendido entre a fertilização e a eclosão do ovo, sendo influenciada pela temperatura da água (GODINHO et al, 2007). O fechamento do blastóporo é considerado o evento mais importante da embriogênese, pois indica o momento adequado para estimar as taxas de fertilização (NAKATANI et al., 2001), com abertura do intestino primitivo, onde pode-se observar o final da gastrulação, esboço do embrião, e início da organogênese (LANDINES, 2003).

O termo larva é utilizado para indicar o período de vida do peixe compreendido entre a eclosão e o enchimento da bexiga gasosa (WOYNAROVICH; HORVÁTH, 1980), ainda em estudo realizado por Santos e Godinho (2003) afirmam que é de fundamental importância para a larvicultura o tempo de absorção do saco vitelínico, a pigmentação da retina, a presença ou não de órgão adesivo, a abertura de boca e lúmen intestinal, a flexão da notocorda, o desenvolvimento das nadadeiras, o enchimento das nadadeiras, e o padrão de pigmentação cutânea.

3.3 Esqueleto dos peixes

O esqueleto dos peixes funciona como elemento de sustentação dos músculos e das demais partes do corpo, atuando na proteção dos órgãos internos, se divide em: exoesqueleto (ou esqueleto dérmico) que é constituído pelas escamas e apêndices de locomoção e pelo endoesqueleto, que por sua vez, subdivide-se em esqueleto axial, apendicular e visceral (DE LIULLIS; PULERÀ, 2007).

Os ossos do crânio e da coluna vertebral formam o esqueleto axial, sendo que o crânio é composto por ossos achatados, que formam uma cavidade para alojar principalmente o encéfalo (WEITZMAN, 1962).

A coluna vertebral está formada por vértebras de número e forma variadas, que por sua vez, possuem em sua estrutura, espinhos neurais (dorsalmente), espinhos hemais (ventralmente), processos transversos (lateralmente), e um corpo ósseo, que une as costelas aos espinhos neurais (MOREIRA et al., 2001).

O esqueleto apendicular é formado pelas nadadeiras, que possuem função propulsora, estabilizadora ou de direção, constituídas por uma prega dérmica sustentada por um conjunto de estruturas denominadas raios (WEITZMAN, 1962). Estes podem ser simples e duros (espinhos) ou ramificados e moles, mas normalmente existem nadadeiras sem raios, denominadas adiposas, logo após a nadadeira dorsal em várias espécies de peixes Characiformes (MOREIRA et al., 2001).

O esqueleto visceral está relacionado aos tubos internos do corpo, principalmente à faringe e ao tubo digestório, sendo formado por uma série de arcos cartilagosos ou ósseos entre as aberturas branquiais, dando sustentação as brânquias (MOREIRA et al., 2001).

3.4 Proteína óssea Morfogenética (BMP)

As BMPs pertencem à superfamília de proteínas denominadas de fator de crescimento transformador (*Transforming Growth Factor* – TGF), da qual fazem parte pelo menos 43 membros que participam de muitas funções biológicas, incluindo crescimento e diferenciação celular no padrão de formação embriogênico (WOZNEY; ROSEN, 1998; ZHU et al., 1999).

As BMPs 2 a 16 pertencem a superfamília TGF, sendo BMP 1 a única exceção (EINHORN, 1995), são osteoindutoras, porém, não possuem atividade mitogênica e/ou osteogênica (KIRKER- HEAD, 1995). A principal função das BMPs de 2 a 16 é induzir a transformação de células mesenquimais indiferenciadas em condroblastos, tanto na fase embriogênica como durante o crescimento e cicatrização (WANG; ROSEN; CORDES, 1988). Dentro da superfamília, as proteínas podem ser subdivididas em subgrupos de acordo com a semelhança em suas fórmulas estruturais (EINHORN, 1995). Por exemplo, a BMP 2 e a BMP 4 são praticamente idênticas (92%) enquanto que 5, 6 e 7 são 90% idênticas (WOZNEY, 1992).

Ripamonti e Reddi afirmaram que, além de suas funções na osteogênese pós-fetal, as BMPs podem exercer múltiplas funções no desenvolvimento embriogênico e organogênico, incluindo esqueletogênese, desenvolvimento crânio facial e dos tecidos dentais.

Hughes et al. demonstraram, através de testes in vitro, com células osteoprogenitoras de rato, que BMP-6, BMP-4 e BMP-2 podem estimular diferenciação osteoblástica. Sugeriram que uma célula osteoprogenitora precoce é uma importante célula para a ação das BMPs durante indução óssea.

No presente trabalho foram utilizadas as proteínas BMP 2 e BMP 4, devido a sua semelhança, para avaliar o desenvolvimento ósseo da espécie estudada.

Materiais e Métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostragem

Exemplares de *Leporinus elongatus* (Figura 1) foram capturados no rio Pardo e mantidos em tanques de 120 m² na Estação de Piscicultura da Usina Hidrelétrica de Machado Mineiro, sendo alimentados com ração comercial contendo 36% de proteína bruta, diariamente, na proporção de 2% do peso vivo. Para reprodução, foram empregados três casais de reprodutores de Piapara (*Leporinus elongatus*) no mês de janeiro de 2012 e três em janeiro de 2013, os casais foram submetidos à reprodução induzida por hipofiseação, utilizando três injeções de Extrato Bruto de Hipófise de Carpa (*Cyprinus carpio*) na dosagem de 0,25/0,5 e 5,0 mg/kg em intervalo de 10 horas entre aplicações. Estes animais possuíam um comprimento total de $26,4 \pm 7,91$ cm e $1,25 \pm 0,35$ kg de peso corporal.

A fertilização foi realizada a seco, misturando-se sêmen aos ovócitos estruídos e adicionando, em seguida, água à mistura. Os ovos fertilizados foram mantidos em incubadoras do tipo funil com 30L de capacidade, com água circulante.

A embriogênese e a ontogênese larval foram monitoradas até a reabsorção do saco vitelínico com auxílio de estereomicroscópio MBC-10 (МБС, Rússia). A reprodução foi realizada durante os meses de janeiro de 2012 e janeiro de 2013, com uma temperatura da água de 24 ± 3 °C durante o período de incubação.

Amostras de ovos, larvas, pós-larvas e juvenis foram fixados em solução de Bouin (750 mL de solução saturada de ácido pícrico, 250 mL de formol 40% e 50 mL de ácido acético glacial) e solução de formalina 10% para posterior avaliação através da microscopia de luz, imunohistoquímica e microscopia eletrônica de varredura. Foram utilizados 10 juvenis, sendo anestesiados com solução de hidrocloreto de benzocaína

na dose de 200mg/L de água, de acordo com Resolução CFMV nº 714 (2002) e posteriormente mergulhados em solução fixadora, por razões humanitárias.

Todos os procedimentos desse trabalho foram aprovados pelo CEUA da FMVZ-USP, com o protocolo de número 2369.

Figura 1- Imagem de um exemplar de *L. elongatus* utilizada na reprodução induzida em 2012.

Fonte: (SOUZA, E.Z.. 2012)

4.2 Microscopia de Luz – Histologia

As amostras de ovos, larvas, pós-larvas e juvenis foram fixadas em solução de Bouin durante 12 horas, e então transferidas e conservadas em álcool 70%. Logo em seguida, as amostras foram desidratadas em uma série de soluções crescentes de etano e xileno, respectivamente, para o processo de inclusão em parafina segundo técnicas histológicas de rotina.

Após este período, os blocos de parafina foram ligeiramente cortados com utilização do micrótomo LEICA RM2125 (Leika, Alemanha) em cortes seriados com

5µm de espessura e logo após, os cortes foram capturados com lâminas de vidro em um banho histológico à 45°C.

As lâminas foram colocadas em estufas de histologia para secagem Quimis 317B242 (Quimis, Brasil) na temperatura de 40°C por 24 horas. Em seguida, as lâminas foram mergulhadas em berços histológicos contendo uma série de soluções decrescentes de xilol e álcool para realização do processo de desparafinização, e em seguida, hidratação em água corrente, que se faz necessário, uma vez que os corantes são hidrossolúveis. Em seguida, as lâminas foram coradas em solução de Hematoxilina de Mayer por 1 minuto, sendo retirado o excesso em água corrente, e então, corada com solução de Eosina durante 30 segundos.

As lâminas então passaram por um processo de desidratação em soluções crescentes de etanol e diafanizadas em solução de xileno, para posterior montagem das lamínulas com o emprego da resina Entellan (Merck, Brasil).

Os resultados foram analisados e fotografados utilizando o Microscópio Olympus BX3 acoplado à câmera AxioCam HCr com software de captura Axio Visio (Olympus, Japão).

4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras de ovos, larvas, pós-larvas e juvenis foram fixadas em solução de formaldeído 4% por 24 horas, e então transferidas para em álcool 70% por tempo indeterminado, foram lavadas em solução de PBS 0,1 M, sendo pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio 2%. Novamente foram lavadas em uma série de solução de PBS 0,1M, água destilada e ácido tânico 1x, respectivamente. Em seguida, as amostras foram desidratadas em uma série crescente de etanol e secadas em estufa à temperatura de 60°C durante 24 horas. Após o seco, o material foi montado em Stubs

de alumínio e cobertos com ouro, através do aparelho Iom Sputter Balzer SCD – 040 e analisados ao microscópio eletrônico de varredura Zeiss Leo 435 VP do Setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

4.4 Imunohistoquímica

Conforme protocolo sugerido por Silviero, F. (2013); as amostras de ovos, larvas, pós-larvas e juvenis foram fixadas em formaldeído 4% por 24 horas, e então transferidas para álcool 70% por tempo indeterminado. Foram então incluídas em parafina, conforme técnicas histológicas de rotina. Após realizados os cortes seriados de 5 μm de espessura, foram montados em lâminas silanizadas, sendo desparafinizadas e hidratadas em soluções decrescentes de xileno e etanol. Em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS e realizado a recuperação antigênica em tampão citrato de sódio a 90°C em uma panela comum com água destilada. Após esfriado em temperatura ambiente, o material foi lavado em água corrente, PBS e então realizado bloqueio de peroxidase com solução de peróxido de hidrogênio no escuro à temperatura ambiente. Logo em seguida, foi realizado o bloqueio inespecífico com utilização de leite em pó 5% em PBS à temperatura ambiente.

Os cortes então foram incubados com anticorpo primário diluído anti- BMP-2 DSV0512011, Monoclonal IGC2B, (R&D System, USA) e BMP-4 - ab124715 (Abcam, USA) em uma câmara úmida em geladeira, de 4 a 8°C, overnight. Os cortes do grupo controle negativo, não foram incubados com o anticorpo primário, e sim com Tampão fosfato salino (PBS 0,1M pH 7,4); com a finalidade de evidenciar os resultados falsos positivos. No dia seguinte, os cortes foram lavados em solução de PBS e então incubado com anticorpo secundário (Polimer DAKO Advanced, Estados Unidos da América) em temperatura ambiente. Logo em seguida, os cortes foram lavados com

solução de PBS e realizada a revelação com DAB, parando a revelação em água destilada e realizada a contra-coloração com Hematoxilina de Mayer durante 2 minutos. Então as lâminas foram lavadas em água corrente e realizada a diferenciação em solução saturada de carbonato de lítio, lavadas novamente e realizada uma desidratação com soluções crescentes de etanol e xileno. As lâminas foram montadas junto com as lamínulas com utilização da resina Entellan (Merck, Brasil).

4.5 Montagem dos esqueletos

Dois exemplares adultos de *Leporinus elongatus* foram eutanasiados com utilização de uma solução de hidrocloreto de benzocaína na dose de 200mg/L de água, de acordo com Resolução CFMV nº 714 (2002) e então retidas as vísceras e parte da musculatura e mergulhada a carcaça em etanol 70%. Em seguida, a carcaça foi secada à temperatura ambiente e logo após, colocada para que a musculatura desidratada fosse consumida pelas larvas de coleópteros dermestídeos (*Dermestes maculatus*) durante quatro meses no Setor de Ictiologia do Museu de Zoologia/USP, em ambiente de controle de umidade e temperatura.

Imagens fotográficas foram adquiridas em estúdio fotográfico com auxílio de uma câmera digital Kodak Easyshare P880 (Kodak, Alemanha).

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Ovos

O *L. elongatus* produz ovos esféricos, pelágicos, de coloração amarelo palha e translúcidos, possuem a presença do córion com superfície lisa (Figura 2 A1).

Os ovos recém-fecundados apresentaram diâmetro médio de 2,60 mm; com amplo espaço perivitelino (aproximadamente 28%), tamanho médio de 0,73 mm e diâmetro médio do vitelo de 1,10 mm.

Quanto à quantidade e padrão de distribuição de vitelo, os ovos de *L. elongatus* podem ser classificados como telolécitos, uma vez que exibem grande quantidade de vitelo concentrado no polo vegetativo, enquanto o citoplasma e organelas são distribuídos ao longo do polo animal (Figura 2 A2).

O córion é liso, sem órgãos adesivos conforme análise através da Microscopia Eletrônica de Varredura (Figura 2 A3).

5.2 Embriogênese

A primeira clivagem durante a embriogênese de *L. elongatus* foi de 42 minutos após fertilização. A segunda, terceira e quarta clivagens ocorreram aproximadamente seis minutos após a anterior, no entanto, na quinta clivagem, ocorreu em aproximadamente 35 minutos após a anterior, originando 32 blastômeros. Na terceira clivagem, houve a formação de oito blastômeros (Figura 2

B1), com observação de células com citoplasma acidófilico, indicando baixa atividade sintética (Figura 2 B2). Na microscopia eletrônica de varredura foi observado blastômeros com tamanhos diferentes, com clivagem meroblástica ou parcial, ocorrendo esse processo apenas no polo animal (Figura 2 B3). Na quarta clivagem, foi visualizada a formação de dezesseis blastômeros (Figura 2 C1), sendo observadas células contendo citoplasma acidófilico (Figura 2 C2), com tamanhos diferentes (Figura 2 C3) localizados no polo animal.

A fase de blástula iniciou-se com cerca de três horas após fertilização e avançou até cerca de cinco horas e trinta minutos (Figura 2 D1). Nessa fase, a blastoderme apresentou uma forma de meia-lua no estágio avançado, com um padrão de clivagem bastante indeterminado, porém, contínuo (Figura 2 D2). Na microscopia eletrônica de varredura foi observada uma camada sincicial de vitelo, também denominada de periblasto entre a blastoderme e os glóbulos de vitelo (Figura 2 D3).

Figura 2 – Imagens capturadas usando microscópio estereoscópico (1), microscópio de luz (2) e microscópio eletrônico de varredura (3); de ovos hidratados (A), Clivagem inicial nas fases de 8 e 16 blastômeros (B e C), e Gástrula inicial (D). esse trecho e a legenda da figura deve vir na parte inferior da figura.

Fonte: (SOUSA, E. Z. 2013)

Legenda: Nota-se presença do Córion (Co), Glóbulo de vitelo (GV), Blastodisco (Bd), Espaço Perivitelino (EP), Blatômeros (BI), Blastoderme (Bm) e Movimento de Epibolia (ME).

A fase de gástrula iniciou-se com aproximadamente seis horas após fertilização, prorrogando-se até cerca de sete horas, com o fechamento do blastoporo (Figura 3 A1). Na histologia (Figura 3 A2) e na microscopia eletrônica de varredura (Figura 3 A3) foram evidenciado a presença de um periblasto e formação de um anel embrionário.

Em seguida foi evidenciada a fase de nêurula, com diferenciação do embrião com formação do anel embrionário (Figura 3 B1) e surgimento da vesícula óptica e dos somitos (Figuras 3 B2 e B3).

Com 20,2 horas após a fertilização, houve o completo descolamento da cauda do embrião da vesícula vitelínica (Figura 3 C1). Foi observada a presença de somitos, saco vitelínico e nadadeira embrionária (Figuras 3 C2 e C3).

Figura 3 – Imagens capturadas usando microscópio estereoscópico (1), microscópio de luz (2) e microscópio eletrônico de varredura (3); de gástrula final (A), Nêurula com o aparecimento dos somitos e da Vesícula ótica (B), e Embrião com a cauda totalmente descolada do saco vitelínico e aparecimento da nadadeira embrionária (C)

Fonte: (SOUSA, E. Z. 2013)

Legenda: Nota-se presença do Córion (Co), Glóbulo de vitelo (GV), Movimento de Epibolia (ME), Saco vitelínico (SV), Periblasto (Pe), Anel Embrionário (AE), Somitos (St), Vesícula Ótica (VO), Fechamento do Blastoporo (FB) e Nadadeira Embrionária (NE).

5.3 Eclosão e larvas

As larvas eclodiram em aproximadamente 32 horas após a fecundação (Figura 4 A1), medindo em média 3,0 mm de comprimento total, possuindo ainda um saco vitelínico pequeno e olhos pouco pigmentados, ocorre nessa fase também a formação do coração (Figura 4 A2). O olho é grande e se torna pigmentado com 4,60mm e a nadadeira peitoral aparece com aproximadamente 4,50 mm, onde também já ocorre o surgimento dos arcos branquiais (Figura 4 A3).

Com cinco dias de incubação, foi evidenciada a abertura da boca, período em que a larva passa a alimentar-se, dependendo do ambiente externo para sobrevivência.

5.4 Juvenil

Houve uma mudança ou metamorfose, onde a nadadeira embrionária originou as nadadeiras caudal e anal, sendo identificada a fase juvenil ou de alevinagem, aos dez dias após a fertilização, sendo observadas oito faixas transversais na região dorsal (Figura 4 B1). Na histologia foi observada a formação da lente e retina, além da presença de tecido cartilaginoso na formação de alguns ossos do crânio (Figura 4 B2). Na microscopia eletrônica de varredura, foi observada a presença das nadadeiras caudal, anal, peitoral e ventral já formadas, assim como os olhos e sistema branquial (Figura 4 B3).

Figura 4 – Imagens capturadas usando microscópio estereoscópico (1), microscópio de luz (2) e microscópio eletrônico de varredura (3); Larva (A) e juvenil (B)

Fonte: (SOUSA, E. Z. 2013)

Legenda: Nota-se presença do Saco vitelínico (SV), Somitos (St), Vesícula Óptica (VO), Nadadeira Embrionária (NE), Olho pigmentado (Ol), Coração (Co), Faixas transversais pigmentadas (FT), Nadadeira caudal (NC), Nadadeira anal (NA), Nadadeira peitoral (NP), e boca aberta (Bc).

5.5 Imunohistoquímica

Nas fases iniciais do desenvolvimento embrionário de *L. elongatus* não foram encontradas marcações dos anticorpos BMP2 e BMP4, sendo estas, observadas apenas a partir da fase larval na região do focinho, crânio e coração (Figuras 5 e 6).

Figura 5 – Expressão imunohistoquímica de BMP-2 e 4* em ovos (1 e 2), e larva (3) de *L. elongatus*; onde (A) representa o grupo controle, sem incubação com anticorpo primário e (B) o grupo com incubação de BMP-2

Fonte: (SOUSA, E. Z. 2013)

Legenda: Ovo hidratado (A1, B1, A2 e B2), nota-se a presença do Córion (Co), Glóbulo de vitelo (GV), Blastodisco (Bd), Movimento de Invaginação do pólo vegetal (Iv); Larva pós eclosão(A3 e B3), Olho (Ol), e é possível observar a marcação na boca (Bo).

Figura 6 – Expressão imunohistoquímica de BMP-2 e 4*, em juvenis de *L. elongatus*, onde (A) representa o grupo controle, sem incubação com anticorpo primário e (B) o grupo com incubação de BMP-2

Fonte: (SOUSA, E. Z. 2013)

Legenda: é possível notar a marcação na região da boca (Bo), focinho (Fo), cartilagem cranial (Ca), e coração (Co).

*Os anticorpos BMP-2 e BMP-4 obtiveram a mesma marcação, portanto, neste trabalho optamos por colocar apenas as imagens das expressões de BMP-2.

5.6 Esqueletos

Nos esqueletos dos animais adultos obtidos foi possível identificar todo o sistema esquelético do *L. elongatus*.

O pré-maxilar possui seis dentes, sendo que os da frente são mais longos e marcadamente obtusos. Sua boca é inferior.

Possui 34 vértebras, a nadadeira dorsal possui 12 raios e a anal 10.

Figura 7 – Esqueleto da região frontal de *L. elongatus*

Fonte: (SOUZA, E. Z. 2013)

Legenda: É possível notar os ossos: Occipital (Oc), Frontal (Fr), Orbital (Or), Maxilar (Mx), Pré-maxilar (Pm), Dentes (Dt), Mandíbula (Mn), Quadrado (Qd), Escápula (Es), Opérculo (Op), e Clavícula (Cl).

Figura 8 – Esqueleto de *L. elongatus*

Fonte: (SOUSA, E. Z. 2013)

Legenda: Raios da Nadadeira Caudal (NC), Raios da Nadadeira Anal (NA), Raios da Nadadeira Ventral (NV), Pélvis (Pe), Raios da Nadadeira Peitoral (NP), Raios da Nadadeira Dorsal (ND), Vértebra (Vt) e Costelas (Ct).

Discussão

6 Discussão

Por ser uma espécie que necessita de águas relativamente quentes para que sua prole possa se desenvolver, o período reprodutivo da espécie estudada foi de dezembro a janeiro, com temperatura entre 24 ± 3 °C, sua desova foi total, sazonal e com pico. A fecundação externa, por serem animais que realizam migração eles não cuidam da prole, dados estes que vão de acordo com o relatado por Vazzoler, (1996).

Os ovos de *L. elongatus* são pelágicos, pequenos e com pouco vitelo, indo de acordo com o descrito por Sato; Cardoso e Capuchinho, (1988); possuem grande espaço perivitelino após hidratação; são telolécitos, com um elevado suprimento de vitelo conforme relatado por Woynarovich e Horváth (1983), do qual o embrião nutrir-se-á durante a embriogênese (BAGENALI; BRAUM, 1978).

O desenvolvimento embrionário ocorreu coerente com as fases descritas por Woynarovich; Horváth (1980).

A segmentação dos ovos foi semelhante ao descrito para *Leporinus macrocephalus* (REYNALTE- TATAJE; ZANIBONI-FILHO; MUELBERT, 2001) em outras bacias hidrográficas, ocorrendo as fases de ovo, blástula, gástrula, nêurula, embrião, larva, pós-larva e alevino (juvenil).

Segundo Hu et al . (2000), o coração é o primeiro órgão definitivo a se desenvolver e tornar-se funcional durante a embriogênese. Em *L. elongatus* , o coração apresentava-se simples no momento da eclosão da larva, localizado na cavidade pericardial, anteriormente ao saco vitelínico e à cavidade abdominal, como também registrado em larvas recém-eclodidas de outros estudos (Hu et al . 2000; MORINO, 2005; Marques, 2008).

A visão é fundamental para a sobrevivência dos peixes, pois a maioria é usuário visual aproveitando também este sentido para evitar predadores (Carvalho et al . 2004). O desenvolvimento do olho, em *L. elongatus* ocorreu de forma progressiva e, nas larvas com vitelo absorvido, no último momento avaliado, encontrava-se desenvolvido com

as principais camadas formadas e os núcleos dos cones e bastonetes começando a formar duas camadas, assim como observado em larvas de *O. niloticus* (Morrison et al. 2001) e em *Z. jahu* (Marques 2008).

Com a Microscopia eletrônica de Varredura foi possível acompanhar o desaparecimento do saco vitelínico, sendo este, um grande indicador de mortalidade, quanto menor o ovo e saco vitelínico, maior as chances da larva não sobreviver, por falta de nutrientes, muito utilizados durante o processo de metamorfose, alimentando o embrião e larva, até a abertura de boca, passando então a possuir alimentação exógena, sendo este um mecanismo também utilizado por outras espécies, como evidenciado por Santos e Godinho (2002). Não houve diferenciação significativa quanto ao tamanho dos ovos de *L. elongatus*, a mortalidade não ocorreu fora do comum com o relatado por Rana (1985) em *O. mossambicus*, o que sugere que o ovo tem a quantidade necessária de nutrientes utilizada pelo embrião durante a sua fase de desenvolvimento.

O processo de metamorfose descrito por Nakatani et al (2001) também foi observado nas diversas técnicas, onde a nadadeira embrionária originou as nadadeiras caudal e anal; ossificação do esqueleto, abertura de boca, pigmentação dos olhos, aparecimento dos somitos, aparecimento de órgãos fundamentais, como o coração, sistema branquial, desaparecimento do saco vitelínico e descolamento da cauda.

Seu esqueleto possui 34 vértebras, a nadadeira dorsal possui 12 raios e a anal 10, indo de acordo com o descrito por Garavello, J.C. (1979). Seu corpo, portanto, é alongado, tornando-o mais ágil, sendo talvez uma manobra anti-predatória conforme descrito por Uieda, 1984 em *Astyanax* e *Bryconamericus*; Garutti, 1989 (*A. altiparanae*) ; Castro & Casatti, 1997 (*A. bimaculatus* [*A. altiparanae*] e *A. fasciatus*); Garutti & Britski, 2000 (*A. altiparanae*); Casatti & Castro, 1998 (*B. Stramineus*)..

Sua boca é inferior, seu lábio superior é muito desenvolvido, indo contra o sugerido por Reis et al. (2003) porém, conforme Balassa (2004); o que enfatiza a alimentação herbívora com tendência a onivoria (FERREIRA; ZUANON; SANTOS; 1998). Os dentes de *L. elongatus* são característicos de espécies consideradas herbívoras, com tendência à

onivoria, o que certamente reflete estratégias de sobrevivência em ambientes inundáveis como já fora observado por Resende et al (1996).

Com relação à imunohistoquímica, foi possível avaliar que a marcação das proteínas BMP-2 e BMP-4 ocorreu em localizações muito semelhantes, fato também relatado por Wozney (1992).

Observou-se a expressão dessas proteínas somente à partir da fase larval, nas regiões da boca, focinho, coração e cartilagem cranial. Este comportamento da expressão das proteínas BMP-2 e BMP-4 deve-se provavelmente por ainda não ter havido diferenciação celular suficiente para essas proteínas exercerem seus papéis no processo de formação do tecido ósseo.

A presença da expressão dessas proteínas na cartilagem cranial deve-se possivelmente ao fato da BMP induzir a formação de osteoblastos e também por serem secretadas por esse tipo celular (KATAGIRI 1994); Matsumura et al. (1992) sugerem que a BMP é liberada para regular a proliferação e diferenciação das células mesenquimais de forma semelhante a sua função, como visto nas embrionárias.

Acreditamos que as BMPs não foram expressas nas fases anteriores devido a não diferenciação das células ou ainda por não ocorrer ativação de tais proteínas nas fases iniciais do desenvolvimento embrionário de *L. elongatus*, sendo necessário um estudo mais aprofundado para o correto entendimento do resultado obtido.

Este trabalho trouxe informações importantes sobre a ontogenia de *L. elongatus*, podendo ser um auxiliar em estratégias reprodutivas para incrementar a população de modo a contribuir para um melhor entendimento sobre biologia desta espécie.

Conclusões

7 Conclusões

Baseados nas observações realizadas durante a elaboração deste estudo, pudemos concluir que os ovos de *L. elongatus* são demersais e não pelágicos;

As fases do desenvolvimento embrionário vão de acordo com os demais teleósteos, podendo retardar de acordo com a temperatura da água;

As marcações de BMP-2 e BMP-4 foram idênticas, e puderam ser observadas a partir do estágio larval, sendo vistas na região frontal, mais precisamente na região da boca, onde está presente o pré-maxilar e surgimento dos dentes, no coração, região cranial e ventral da espécie;

Seu esqueleto sugere ser de um animal herbívoro com tendência a onivoria, estando de acordo com seu hábito alimentar, sendo sua forma e tamanho em concordância com áreas alagadas.

Referências

REFERÊNCIAS

- BAGENAL, T. B.; BRAUM, E. Eggs and early life history. In: BAGENAL, T. B. (Ed.). **Methods for assessment of fish production in freshwaters**. Oxford: Blackwell Science, 1978. p. 165-201.
- BERTACO, V. A.; MALABARBA, L. R.; DERGAM, J. A. New Hyphessobrycon from the upper rio Pardo drainage in eastern Brazil (Teleostei: Characiformes: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 5, n. 3, p. 245-249, 2007.
- BLAXTER, J. H. S. Pattern and variety in development. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. (Ed.). **Fish physiology**. New York, London: Academic Press, 1988. v. 11A, p. 1-58.
- BORODIN, N. A. Notes on some species and subspecies of the genus *Leporinus* Spix. **Annals and Magazine of Natural History**, v. 50, n. 3, p. 269-290, 1929.
- CAMPELLO, F. D.; BEMVENUTI, M. A. Diferenciação morfométrica e osteológica entre *Ramnogaster arcuata* (Jenyns) e *Platanichthys platana* (Regan) (Teleostei, Clupeidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 19, n. 3, p. 757-766, 2002.
- CEMIG. Bacia do rio Pardo. 2011. Disponível em: <http://www.cemig.com.br/Sustentabilidade/Programas/Ambientais/PeixeVivo/Paginas/RioPardo.aspx>. Acesso em: 27 junh. 2013.
- CHANDLER, R. L.; CHANDLER, K. J.; MCFARLAND, K. A.; MORTLOCK, D. P. Bmp2 transcription in osteoblast progenitors is regulated by a distant 3' enhancer located 156.3 kilobases from the promoter. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, p. 2934-2951, 2007.
- DE LULIIS, G.; PULERÀ, D. **The dissection of vertebrates: a laboratory manual**. San Diego: Ed. Elsevier, 2007. 298 p.
- ELLER, E.; DERGAM, J.; VÊNERE, P.; PAIVA, L.; MIRANDA, G.; OLIVEIRA, A. The karyotypes of the thorny catfishes *Wertheimeria maculate* Steindachner, 1877 and *Hassar wilder* Kindle, 1895 (Siluriformes: Doradidae) and their relevance in doradids chromosomal evolution. **Genetica**, v. 130, n. 1, p. 99-103, 2007.
- FERREIRA, E. J. G.; ZUANON, I. A. S.; SANTOS, G. M. **Peixes comerciais do médio Amazonas: região de Santarém, Pará**. Brasília: Edições Ibama, 1998. 214 p.
- FUKUDA, K.; KIKUCHI, Y. Endoderm development in vertebrates: fate mapping, induction and regional specification. **Development, Growth and Differentiation**, v. 47, p. 335-343, 2005.
- GANECO, L. N. **Análise dos ovos de piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1894), durante a fertilização e o desenvolvimento embrionário, sob condições de reprodução induzida**. 2003. 66 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

GARAVELLO, J. C. **Revisão taxonômica do gênero Leporinus Spix, 1829 (*Ostariophysi, Anostomidae*)**. 1979. 451 p. Ph.D. Dissertation (Mester) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1979.

GÉRY, J.; MAHNERT, V.; DLOUHY, C. Poissons characoïdes non Characidae du Paraguay (Pisces, Ostariophysi). **Revue Suisse de Zoologia**, v. 94, p. 357-464, 1987.

GRAZIELA C. B.; FUGI, R.; HAHN, N. S.; GALINA, A. B. Dieta de espécies de Anostomidae (Teleostei, Characiformes) na área de influência do reservatório de Manso, Mato Grosso, Brasil. **Iheringia, Série Zoologia**, v. 94, n. 1, 2004. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0073-47212004000100014&script=sci_arttext>. Acesso em: 27 junh. 2013.

GODINHO, H. P. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 3, p. 351-360, 2007.

GODINHO, H. P.; GODINHO, A. L. **Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais**. 1. Ed. Belo Horizonte: PUCMinas, 2003. 468 p.

GODINHO, H. P.; GODINHO, A. L.; VONO, V. **Peixes da bacia do rio Jequitinhonha**. São Paulo: EDUSP, 1999. p. 414-423.

GODINHO, H. P.; SANTOS, J. E.; SATO, Y. Ontogênese larval de cinco espécies de peixes do São Francisco, p.133-148. In: GODINHO, H. P.; GODINHO, A. L. (Org.). **Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais**. Belo Horizonte: PUC Minas, 2003. 468 p.

HEMPBEL, G. On the use of ichthyoplankton surveys. **FAO Fisheries Technical Paper**, Rome, v. 122, p. 1-2, 1973.

HONCZARYK, A. A reprodução de peixes em cativeiro. In: VAL, A. L.; HONCZARYK, A. **Criando peixes na Amazônia**. Manaus: INPA, 1995. p. 97-120.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Instrução Normativa Nº 5, de 21 de maio de 2004. **Lista nacional das espécies de invertebrados aquáticos e peixes ameaçadas de extinção**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2004. 12 p.

KATAGIRI, T.; YAMAGUCHI, A.; KOMAKI, M.; ABE, E.; TAKAHASHI, N.; IKEDA, T.; ROSEN, V.; WOZNEY, J. M.; FUJISAWA-SEHARA, A.; SUDA, T. Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. **The Journal of cell biology**, v. 127, pt. 2, p. 1755-1766, 1994.

KINGSLEY, D. M. The TGF- β superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. **Genes & Development**, v. 8, p. 133-146, 1994.

- KIRKER-HEAD, C. A.; GERHART, T. N.; SCHELLING, S. H.; HENNIG, G. E.; WANG, E.; HOLTROP, M. E. Long-term healing of bone using recombinant human bone morphogenetic protein 2. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 318, p. 222-230, 1995.
- LAGLER, K. F. **Freshwater fishery biology**. 2nd ed. Dubuque: WM.C. Brown Company, 1959. 421 p.
- LANDINES, M. A.; SENHORINI, J. A.; SANABRIA, A. I.; URBINATI, E. C. Desenvolvimento embrionário do pintado (*Pseudoplatystoma coruscans* - Agassiz, 1829). **Boletim Técnico do CEPTA**, Pirassununga, v. 16, p. 1-13, 2003.
- LOWE-McCONNELL, R. H. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. Tradução Anna Emília A. de M. Vazzoler, Ângelo Antonio Agostinho, Patrícia T.M. Cunningham. São Paulo: EDUSP, 1999. 534 p. (Coleção Base). Título original em inglês: *Ecological studies in tropical fish communities*.
- MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. Brasília: MMA, 2008.
- MACIEL, C. M. R. R. **Ontogenia das larvas de Piracanjuba, *Brycon orbignyanus* Valenciennes (1849) (Characiformes, Characidae, Bryconinae)**. 2006. 229 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.
- MARQUES, C. **Análise histológica e de microscopia eletrônica do desenvolvimento inicial de jaú (*Zungaro jahu*)**. 2008. 84 p. Ms. C. Dissertation (Master) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2008. 84 p.
- MATSUMURA, K.; TOMÉ, F. M.; COLLIN, H.; CHAOUCH, M.; KAPLAN, J. C.; FARDEAU, M.; CAMPBELL, K. P. Deficiency of the 50 K dystrophin-associated glycoprotein in severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy. **Nature**, v. 359, n. 6393, p. 320-322, 1992.
- MEIRELES, W. A.; SANTOS, L. X.; FIGUEIREDO, S. A.; BUTERI, C. B. Reprodução induzida de alguns peixes migradores das bacias dos rios Pardo e Jequitinhonha. **Revista Veterinária e Zootecnia em Minas**, v. 21, n. 108, p. 38-42, 2011.
- MENEZES, N. A.; BUCKUP, P. A.; FIGUEIREDO, J. L.; MOURA, R. L. (Ed.). **Catálogo das espécies de peixes marinhos do Brasil**. São Paulo: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, 2003. 160 p.
- MOREIRA, H. L. M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R. P.; ZIMMERMANN, S. **Fundamentos da moderna aquicultura**. Canoas: ULBRA, 2001. 200 p.
- MORINO, K.; PETERSEN, K. F.; DUFOUR, S.; BEFROY, D.; SHTZKES, N.; NESCHEN, S.; WHITE, M. F.; BILZ, S.; SONO, S.; PYPAERT, M.; SHULMAN, G. I. Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 12, p. 3587-3593, 2005.

MORRISON, C. M.; MIYAKE, T.; WRIGHT JR., J. R. Histological study of the development of the embryo and early larva of *Oreochromis niloticus* (Pisces:Ciclidae) **Journal of Morphology**, New York, v. 247, p. 172-195, 2001.

NAKATANI, K.; AGOSTINHO, A. A.; BAUMGARTNER, G.; BIALETZKI, A.; SANCHES, P. V.; MAKRAKIS, M. C.; PAVANELLI, C. S. **Ovos e larvas de peixes de água doce – Desenvolvimento e manual de identificação**. Maringá: Editora da Universidade Estadual de Maringá, 2001. 378 p.

REYNALTE-TATAJE, D.; ZANIBONI-FILHO, E.; ESQUIVEL, J. R. Embryonic and larvae development of piracanjuba, *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1849 (Pisces, Characidae). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 26, n. 1, p. 67-71, 2004.

REYNALTE-TATAJE, D.; ZANIBONI-FILHO, E.; MUELBERT, B. Stages of the embryonic development of the piavuçu *Leporinus macrocephalus* (Garavello & Britski, 1988). **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 4, p. 823-827, 2001

REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS-JÚNIOR, C. J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003.

RESENDE, E.K. de; PEREIRA, R.A.C.; ALMEIDA, V.L.L. de; SILVA, A.G. da. **Alimentação de peixes carnívoros da planície inundável do rio Miranda, Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brasil**. Corumbá: EMBRAPA-CPAP, 1996b. 36 p. (EMBRAPA-CPAP. Boletim de Pesquisa, 3).

ROCHA, R. M.; BOEGER, W. A. **Estado da arte e perspectivas para a zoologia no Brasil**. Curitiba: UFPR, 2009. 296 p.

ROSA, R. S.; LIMA, F. C. T. Os peixes brasileiros ameaçados de extinção. In: MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND G. M.; PAGLIA, A. P. (Ed.). **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. Brasília: MMA, 2008. p. 9-285.

SANTOS, J. E. dos; GODINHO, H. P. Ontogenic events and swimming behavior of larvae of the characid fish *Salminus brasiliensis* (Cuvier)(Characiformes, Characidae) under laboratory conditions. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 19, n. 1, p. 163-171, 2002.

SATO, Y.; CARDOSO, E. L.; CAPUCHINHO, S. A. Reprodução induzida do piau-verdadeiro (*Leporinus elongatus*) da bacia do São Francisco. In: ENCONTRO ANUAL DE QUICULTURA DE MINAS GERAIS, 4., 1988, Brasília. Coletânea dos Resumos da Associação Mineira de Aquicultura; 1982-1987. Brasília, CODEVASF, 1988. p. 72-73.

SEIXAS FILHO, J. T.; BRÁS, J. M.; GOMIDE, A. T. M.; OLIVEIRA, M. G. A.; DONZELE, J. L.; MENIN, E. Anatomia funcional e morfometria dos intestinos e dos cecos pilóricos do Teleostei (Pisces) de água doce *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849). **Revista Brasileira Zootecnia**, v. 29, n. 2, p. 313-324, 2000.

SILVIERO, F. **Biologia celular: bases moleculares e metodologia de pesquisa**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2013.

TAM, P. P.; KANAI-AZUMA, M.; KANAI, Y. Early endoderm development in vertebrates: lineage differentiation and morphogenetic function. **Current Opinion in Genetic & Development**, v. 13, n. 4, p. 393-400, 2003.

VAZZOLER, A. E. A. M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos**: teoria e prática. Maringá, EDUEM/SBI, 1996. 169 p.

VONO, V.; BIRINDELLI, J. L. O. Natural history of *Wertheimeria maculate*, a basal doradid catfish endemic to eastern Brazil (Siluriformes: Doradidae). **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v. 18, n. 2, p. 183-191, 2007.

WANG, E. A.; ROSEN, V.; CORDES, P.; HOWICK, R. M.; KRIZ, M. J.; LUXENBERG, D. P.; SIBLEY, B. S.; WOZNEY, J. M. Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 24, p. 9484-9488, 1988.

WEITZMAN, S. H. The osteology of *Brycon meeki*, a generalized characid fish, with an osteological definition of the family. **Stanford Ichthyological Bulletin**, v. 8, n. 1, p. 1-77, 1962.

WOYNAROVICH, E.; HORVÁTH, L. **A Propagação artificial de peixes de águas tropicais**. Brasília-DF: FAO/CODEVASF/CNPq. 1983. 80 p. (Manual de extensão).

WOYNAROVICH, E.; HORVÁTH, L. The artificial propagation of warm - water finfishes - manual of extensions. **FAO Fisheries Technical Paper**, Rome, v. 201, p. 1-183, 1980.

WOZNEY, J. M. The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. **Molecular Reproduction and Development**, v. 32, n. 2, p. 160-167, 1992.

WOZNEY, J. M.; ROSEN, V. Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 346, p. 26-37, 1998.

ZHU, Z.; ROBERT J. H.; ZHONDE, W.; QINGSHENG, C.; GREGORY, P. G.; JINGMING, W.; YONG, Z.; JACK, A. E. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. **Journal of Clinical Investigation**, v. 103, n. 6, p. 779-788, 1999.