WESLEY ANTUNES MEIRELES

**Comparações no desenvolvimento ontogenético dos Caraciformes:
curimbatá (*Prochilodus hartii*), piabanha (*Brycon sp*) e piauí
(*Leporinus steindachneri*) da bacia do rio Pardo**

São Paulo
2012

WESLEY ANTUNES MEIRELES

**Comparações no desenvolvimento ontogenético dos Caraciformes:
curimbatá (*Prochilodus hartii*), piabanha (*Brycon sp*) e piau
(*Leporinus steindachneri*) da bacia do rio Pardo**

Tese 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 Doutor em Ciências

Departamento:
Cirurgia

Área de concentração:
Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:
Prof. Dr. José Roberto Kfoury Júnior

São Paulo
2012

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.2673
FMVZ

Meireles, Wesley Antunes

Comparações no desenvolvimento ontogenético dos Caracíformes: curimatá (*Prochilodus hartii*), piabanha (*Brycon sp*) e piauí (*Leporinus steindachneri*) da bacia do rio Pardo / Wesley Antunes Meireles. -- 2012.

104 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2012.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientadora: Prof. Dr. José Roberto Kfoury Júnior.

1. Ontogenia. 2. Teleósteos. 3. BMP-2. 4. Anatomia funcional. 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 "Comparações no desenvolvimento ontogenético dos Caracíformes: curimatá (*Prochilodus hartii*), piabanha (*Brycon sp*) e piauí (*Leporinus steindachneri*) da bacia do rio Pardo", protocolado sob o nº 2037/2010, utilizando 76 (setenta e seis) peixes de água doce, sob a responsabilidade do 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 29/9/2010.

We certify that the Research "Comparisons on the ontogenetic development of the Characiforms: curimatá (*Prochilodus hartii*), piabanha (*Brycon sp*) and piauí (*Leporinus steindachneri*) from the Pardo River Basin", utilizing 76 (seventy-six) fishes, protocol number 2037/2010, 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 9/29/2010.

São Paulo, 19 de setembro de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MEIRELES, Wesley Antunes

Título: Comparações no desenvolvimento ontogenético dos Caraciformes: curimatá (*Prochilodus hartii*), piabanha (*Brycon sp*) e piauí (*Leporinus steindachneri*) da bacia do rio Pardo.

Tese 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 Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ **Julgamento:** _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ **Julgamento:** _____

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).

"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)

Dedico este trabalho à memória do amigo **Professor Franklin de Almeida Sterman**, pelo exemplo de cidadania e dedicação à docência na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e Museu de Anatomia Veterinária.

Fotografia tirada pelo autor em 09/09/2010, no dia do Médico Veterinário e reabertura do Museu de Anatomia Veterinária.

“O guerreiro partiu, mas deixou exemplo” em 22 de abril de 2011.
Inforvet, ano 19, n. 112, p. 3, 2011

“Que a nossa irmã morte seja bem acolhida, como a gente acolhe o sono, depois de um dia bem ocupado”.
São Francisco de Assis

AGRADECIMENTOS

À minha esposa Fabiany Freire Costa e minha família pela compreensão e incentivo nos momentos difíceis da pesquisa.

Aos animais, para que o seus sacrifícios possam ajudar na preservação e conservação de suas espécies.

Ao professor Dr. José Roberto Kfoury Júnior pela amizade, compreensão e competência na orientação da pesquisa.

Aos amigos 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 professora Dra. Mari Sogayar (IQ-USP) pelo fornecimento dos anticorpos primários anti-BMP-2 e à Dra. Rose Eli Grassi Rici pelo auxílio na Microscopia Eletrônica de Varredura.

Ao professor Dr. Francisco Javier Hernandez Blazquez e colegas do Laboratório de Anatomia Microscópica e Imunohistoquímica, André Luiz Veiga Conrado, Maurício Trotta, Thiago Pinheiro Arrais Aloia e Diogo Nader Palermo pela amizade e companheirismo, além do auxílio nas técnicas de imunohistoquímica.

À coordenadora da pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, professora Dra. Maria Angélica Miglino, pelas ótimas aulas ministradas durante suas disciplinas.

A todos os professores do programa de pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da FMVZ – USP, em especial aos professores Dr. Vicente Borelli, Dra. Paula de Carvalho Papa, Dr. Antônio Chaves de Assis Neto, Dra. Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga, Dr. Luciano Andrade Silva, Dr. Pedro Primo Bombonato, Dr. Edson Aparecido Liberti e Dra. Sílvia de Campos Boldrini (*in memoriam*), pela formação didática e aprendizado, muitas vezes, fora do ambiente acadêmico.

Às professoras Dra. Renata Guimarães Moreira e Dra. Maria Inês Borella, pelo aprendizado na disciplina “Fisiologia aplicada ao cultivo de peixes tropicais”.

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.

Aos funcionários do Museu de Anatomia Veterinária, João do Carmo Freitas, Raimundo Leal de Sousa, Natalia Garcia de Andrade (Dona Branca), Fátima de Lourdes Minari e Maurício Cândido da Silva, pela atenção e aprendizagem das técnicas anatômicas, manutenção e funcionamento de um museu de anatomia.

Aos colegas de pós-graduação, Viviane Garcia, Juliana Shimara Pires Ferrão, Evander Bueno, Caio Biasi, João Carlos Morini Júnior, Renata Gabriel Fontinele D'Ângelo, Fernanda Cardoso, Camila Ercolini Barroso, Fernanda Agreste, Erika Zolcsák de Sousa e Matheus Levi Tajra Feitosa, pela convivência e realização de trabalhos em grupo.

Aos funcionários da Estação de Piscicultura de Machado Mineiro, Sandro dos Anjos Figueiredo, Luciano Xavier dos Santos, Osmar e Carlindo.

Aos estudantes, acadêmicos, servidores e professores do Instituto Federal do Norte de Minas Gerais – *Campus* Salinas que contribuíram para realização do presente trabalho.

Ao Fábio Casaca, André Casaca, Leandro Cunha e Franco Terrile do Telstar Hostels pela hospedagem e amizade durante o período experimental na capital paulista.

A todos que de forma direta ou indireta, contribuíram para realização deste trabalho.

RESUMO

MEIRELES, W. A. **Comparações no desenvolvimento ontogenético dos Caraciformes: curimbata (*Prochilodus hartii*), piabanha (*Brycon sp*) e piau (*Leporinus steindachneri*) da bacia do rio Pardo.** [Comparisons on the ontogenetic development of the Characiforms: curimbata (*Prochilodus hartii*), piabanha (*Brycon sp*) and piau (*Leporinus steindachneri*) from the Pardo River Basin]. 2012. 104 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O desenvolvimento ontogenético em peixes é considerado como uma das etapas mais importantes no fornecimento de informações para biologia do desenvolvimento, aquicultura e estudos taxonômicos. A Proteína Óssea Morfogenética 2 (BMP-2) é considerada uma molécula essencial como regulador no desenvolvimento embrionário e na formação óssea, sendo ainda pouco estudada em peixes. Neste trabalho, foram comparadas todas as fases do desenvolvimento de três espécies de peixes importantes da bacia do rio Pardo, curimbata (*Prochilodus hartii*), piabanha (*Brycon sp*) e piau (*Leporinus steindachneri*). A superfície ovocitária, estádios e duração do desenvolvimento embrionário/larval foram classificados com a utilização de microscópio estereoscópio, havendo variações entre as espécies no desenvolvimento. A transformação dos alevinos também apresentaram variações, com 16 dias pós-eclosão em *P. hartii*, 5 dias em *Brycon sp* e 14 dias em *L. steindachneri*. Na imunohistoquímica, BMP-2 foi identificada na blastocela nas fases de blástula e gástrula; na formação da vesícula óptica, notocorda e somitos, na fase embrionária das espécies estudadas. Na fase larval e de juvenil, BMP-2 foi identificada na formação de brânquias, olhos, coração, estômago, intestino, fígado, nadadeiras, músculos e na ossificação em todas as espécies estudadas. Indivíduos adultos foram sacrificados, e depois de realizada a biometria, dissecados para mensuração dos órgãos internos e documentação fotográfica. Observou-se que o estômago de *P. hartii* tem forma de “U” com presença de uma estrutura semelhante a uma moela, enquanto em *Brycon sp* tem forma de “J” com presença de cecos pilóricos aderidos no piloro e em *L. steindachneri*, o mesmo possui forma de “Y” sem presença de cecos pilóricos. Esqueletos foram preparados através da técnica de maceração com insetos dermestídeos, sendo observadas diferenças, sendo interessante descrever que em *P. hartii* foram encontrados 4 ossos infraorbitais, 6 em *Brycon sp* e 4 em *L. steindachneri*. Conclui-se que os exemplares de *P. hartii* possuem hábito alimentar iliófago, enquanto *Brycon sp* e *L. steindachneri* são considerados onívoros, baseado nos achados anatômicos e a expressão de BMP-2 está ligada com a morfogênese e organogênese na embriologia das espécies estudadas.

Palavras-chave: Ontogenia. Teleósteos. BMP-2. Anatomia funcional.

ABSTRACT

MEIRELES, W. A. **Comparisons on the ontogenetic development of the Characiforms: curimbata (*Prochilodus hartii*), piabanha (*Brycon sp*) and piau (*Leporinus steindachneri*) from the Pardo River Basin.** [Comparações no desenvolvimento ontogenético dos Caracíformes: curimbata (*Prochilodus hartii*), piabanha (*Brycon sp*) e piau (*Leporinus steindachneri*) da bacia do rio Pardo]. 2012. 104 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The ontogenetic development in fish is considered as one of the most important steps in providing information to developmental biology, aquaculture and taxonomic studies. The Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2) is considered as a molecule essential for regulation of embryonic development and bone formation, and has been poorly studied in fish. In this work, we have compared all the development phases of three important species of fish from the Pardo River basin, Curimbata (*Prochilodus hartii*) Piabanha (*Brycon sp*) and Piau (*Leporinus steindachneri*). The surface oocyte, stage and duration of embryonic/larval development were classified by using a stereoscopic microscope, and showed variations between the studied species. The transformation of the juveniles also showed variations, with 16 days post-hatching in *P. hartii*, 5 days in *Brycon sp* and 14 days in *L. steindachneri*. In immunohistochemistry, BMP-2 was identified in the blastocoel of the blastocyst and gastrula stages; forming the optic vesicle, notochord and somites on embryo of the investigated species. In larval and juvenil stages, BMP-2 has been identified in the formation of gills, eyes, heart, stomach, intestine, liver, fins, muscle and ossification in the species studies. Adults were sacrificed, dissected for biometrics measurements of the internal organs and photo documentation. The stomach of *P. hartii* showed a "U" shape with the presence of a structure similar to a gizzard, whereas in *Brycon sp* it was shaped like a "J" with the presence of pyloric caeca and in *L. steindachneri* it presented a "Y" form without the presence of pyloric caeca. Skeletons were prepared by retting technique with *Dermestides* beetles, interesting differences were observed between numbers of bones, where 4 infraorbital bones were found in *P. hartii*, 6 in *Brycon sp* and 4 in *L. steindachneri*. It is concluded that the specimens of *P. hartii* show ilyophagous eating habits while *Brycon sp* and *L. steindachneri* were considered omnivorous based on anatomical findings and that expression of BMP-2 is linked with morphogenesis and organogenesis of the studied species.

Keywords: Ontogeny. Teleosts. BMP-2. Functional anatomy.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
BMP-2	Proteína Óssea Morfogenética 2
cm	Centímetro
CEMIG	Companhia Energética do Estado de Minas Gerais
DAB	Diaminobenzidina
g	Grama
GSI	Gonadosomatic index
GV	Glóbulos de vitelo
HGF	Hora grau à fecundação
HPF	Hour-degree post fertilization
IGS	Índice gonadossomático
IHS	Índice hepatossomático
kg	Quilograma
L	Litro
mg	Miligrama
μL	Microlitros
mm	Milímetro
μm	Micrômetro
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
pH	Potencial hidrogeniônico
TGF β	Fator de Crescimento e Transformação β
Tween 20	Polioxietilenosorbitano monolaurato
v/v	Volume/volume

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Célsius
↓	Seta
∨	Ponta de seta
*	Asterisco
PA	Polo Animal
PV	Polo Vegetativo
GV	Glóbulos de Vitelo
EP	Espaço Perivitelino
BL	Blastômeros
MI	Micrópila
BD	Blastoderme
PB	Periblasto
AE	Anel Embrionário
EB	Epiblasto
HB	Hipoblasto
BP	Blastóporo
EP	Movimento de Epibolia
IN	Movimento de Involução
IV	Movimento de Invaginação da placa vegetal
SV	Saco Vitelino
VO	Vesícula Óptica
NE	Nadadeira Embrionária
ST	Somitos
OL	Olhos
NC	Neurocrânio
NT	Notocorda
NP	Nadadeira Peitoral
BC	Boca
BN	Bexiga Natatória
OP	Opérculo
EI	Estômago/Intestino médio e posterior
AB	Arcos Branquiais

CO	Coração
OV	Ovários
TC	Testículos
AP	Alças Espirais
IMP	Intestino Médio e Posterior
NA	Narina
BN	Bexiga Natatória
ND	Nadadeira Dorsal
NPV	Nadadeiras Pélvicas
NAN	Nadadeira Anal
NAD	Nadadeira Adiposa
NC	Nadadeira Caudal
OVT	Ovócitos Vitelogênicos
OPN	Ovócitos Perinucleolar Avançados
FPO	Folículos Pós-Ovulatórios
TS	Túbulos Seminíferos
DE	Ducto Espermático
ML	Moela
CP	Cecos Pilóricos
O	Osso

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Imagens de reprodutores de <i>P. hartii</i> (A), de <i>Brycon sp</i> (B) e de <i>L. steindachneri</i> (C), capturados no rio Pardo e utilizados na reprodução induzida na Estação de Piscicultura de Machado Mineiro, vista lateral direita 44
Figura 2-	Imagens capturadas usando microscópio estereoscópico (1), microscópio de luz (2) e microscópio eletrônico de varredura (3) de ovos hidratados e da fase de segmentação com 8 e/ou 4 blastômeros de <i>P. hartii</i> (A e D), de <i>Brycon sp</i> (B e E) e de <i>L. steindachneri</i> (C e F) 46
Figura 3-	Imagens capturadas usando microscópio estereoscópico (1), microscópio de luz (2) e microscópio eletrônico de varredura (3) da fase de blástula inicial e gástrula com fechamento do blastóporo de <i>P. hartii</i> (A e D), de <i>Brycon sp</i> (B e E) e de <i>L. steindachneri</i> (C e F) 48
Figura 4-	Imagens capturadas usando microscópio estereoscópico (1), microscópio de luz (2) e microscópio eletrônico de varredura (3) da fase de embrião inicial e com cauda livre de <i>P. hartii</i> (A e D), de <i>Brycon sp</i> (B e E) e de <i>L. steindachneri</i> (C e F) 49
Figura 5-	Imagens capturadas usando microscópio estereoscópico (1), microscópio de luz (2) e microscópio eletrônico de varredura (3) de larvas e de pós-larvas de <i>P. hartii</i> (A e D), de <i>Brycon sp</i> (B e E) e de <i>L. steindachneri</i> (C e F) 51
Figura 6-	Imagens capturadas usando microscópio estereoscópico (1), microscópio de luz (2) e microscópio eletrônico de varredura (3) de pós-larvas de <i>Brycon sp</i> (A) com canibalismo intenso (*); alevinos de <i>P. hartii</i> (B), de <i>Brycon sp</i> (C) e de <i>L. steindachneri</i> (D) 53
Figura 7-	Expressão imunohistoquímica de BMP-2 na fase de segmentação (A ₁ , B ₁ e C ₁), na fase de blástula (D ₁ , E ₁ e F ₁), na fase de gástrula (G ₁ , H ₁ e I ₁) e na fase embrionária (J ₁ , K ₁ e L ₁), ao lado dos respectivos controles negativos sem incubação com anticorpos primários em <i>P. hartii</i> (A ₂ , D ₂ , G ₂ e J ₂), em <i>Brycon sp</i> (B ₂ , E ₂ , H ₂ e K ₂) e em <i>L. steindachneri</i> (C ₂ , F ₂ , I ₂ e L ₂) 56

Figura 8-	Expressão imunohistoquímica de BMP-2 na fase de larva (A ₁ , B ₁ e C ₁), na fase de pós-larva (D ₁ , E ₁ e F ₁), na fase de alevino (G ₁ , H ₁ e I ₁) e na organogênese da nadadeira peitoral, bexiga natatória e intestino (J ₁), na formação do estômago (K ₁) e nos ovos hidratados (L ₁), ao lado dos respectivos controles negativos sem incubação com anticorpos primários em <i>P. hartii</i> (A ₂ , D ₂ , G ₂ e J ₂), em <i>Brycon sp</i> (B ₂ , E ₂ , H ₂ e K ₂) e em <i>L. steindachneri</i> (C ₂ , F ₂ , I ₂ e L ₂).....	57
Figura 9-	Fotografias de ovários (OV) e testículos (TC) de exemplares adultos de <i>P. hartii</i> (A e B), de <i>Brycon sp</i> (C e D) e de <i>L. steindachneri</i> (E e F)	75
Figura 10-	Fotomicrografias de ovários e testículos de exemplares adultos de <i>P. hartii</i> (A e B), de <i>Brycon sp</i> (C e D) e de <i>L. steindachneri</i> (E e F)	76
Figura 11-	Fotografias do estômago (EST), intestino médio (IM) e fígado de exemplares adultos de <i>P. hartii</i> (A e B), de <i>Brycon sp</i> (C e D) e de <i>L. steindachneri</i> (E e F)	78
Figura 12-	Fotografias do esqueleto apendicular e axial de <i>P. hartii</i> (A e B), de <i>Brycon sp</i> (C e D) e <i>L. steindachneri</i> (E e F).....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Comparações nas fases do desenvolvimento ontogenético de ovos, embriões, larvas, pós-larvas e alevinos de curimbatá (<i>P. hartii</i>), piabanha (<i>Brycon sp</i>) e piau (<i>L. steindachneri</i>), à temperatura média de 26, 26 e 23 °C, respectivamente	54
Tabela 2-	Comparações dos parâmetros biológicos de fêmeas de <i>P. hartii</i> , <i>Brycon sp</i> e <i>L. steindachneri</i> , capturadas no rio Pardo, utilizadas na reprodução no período de janeiro 2011 e janeiro 2012 na Estação de Piscicultura de Machado Mineiro (média $\pm$ desvio padrão).....	82
Tabela 3-	Comparações dos parâmetros biológicos de machos de <i>P. hartii</i> , <i>Brycon sp</i> e <i>L. steindachneri</i> , capturadas no rio Pardo, utilizados na reprodução no período de janeiro 2011 e janeiro 2012 na Estação de Piscicultura de Machado Mineiro (média $\pm$ desvio padrão).....	83

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	21
2	OBJETIVOS	24
2.1	OBJETIVOS GERAIS.....	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3	REVISÃO DE LITERATURA	26
3.1	ICTIOFAUNA DA BACIA DO RIO PARDO	27
3.2	IMPORTÂNCIA DO ESTUDO DO DESENVOLVIMENTO ONTOGENÉTICO DOS PEIXES	28
3.3	BMP-2 NO DESENVOLVIMENTO NO DESENVOLVIMENTO ONTOGENÉTICO DOS PEIXES	30
3.4	ANATOMIA FUNCIONAL DOS SISTEMAS DIGESTÓRIO, REPRODUTOR E ESQUELÉTICO DE PEIXES NEOTROPICAIS.....	30
	CAPÍTULO 1 – Comparações no desenvolvimento ontogenético e expressão de BMP-2 na organogênese de três Caraciformes da bacia do rio Pardo	34
	RESUMO	35
	ABSTRACT.....	36
4	INTRODUÇÃO	37
5	MATERIAL E MÉTODOS	39
5.1	Amostragem.....	39
5.2	Histologia.....	40
5.3	Microscopia Eletrônica de Varredura	41
5.4	Imunohistoquímica	41
5.5	Análises estatísticas	43
6	RESULTADOS	43
6.1	Ovos.....	43
6.2	Embriogênese	43
6.3	Ontogênese larval	50
6.4	Alevinagem.....	52
6.5	Expressão de BMP-2	54
7	DISCUSSÃO	58

7.1	Ovos.....	58
7.2	Embriogênese	59
7.3	Ontogênese larval	60
7.4	Alevinagem.....	61
7.5	Expressão de BMP-2	62
8	CONCLUSÃO.....	64
	CAPÍTULO 2 – Anatomia funcional comparativa dos sistemas digestório, reprodutor e esquelético de três Caraciformes da bacia do rio Pardo	65
	RESUMO	66
	ABSTRACT.....	66
9	INTRODUÇÃO.....	68
10	MATERIAL E MÉTODOS	70
10.1	Amostragem.....	70
10.2	Dissecação e biometria	70
10.3	Histologia das gônadas	71
10.4	Maceração e montagem dos esqueletos	71
10.5	Análises estatísticas	72
11	RESULTADOS	72
11.1	Biometria	72
11.2	Anatomia e histologia das gônadas.....	73
11.3	Anatomia funcional do sistema digestório	77
11.4	Osteologia	77
12	DISCUSSÃO	84
12.1	Biometria	84
12.2	Anatomia e histologia das gônadas.....	85
12.3	Anatomia funcional do sistema digestório	86
12.4	Osteologia	87
13	CONCLUSÃO.....	89
14	CONCLUSÕES FINAIS	90
	REFERÊNCIAS.....	92

Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil possui um grande potencial hídrico, sendo privilegiado pela grande diversidade de espécies de peixes ainda pouco exploradas e com potencial zootécnico não conhecido (LUZ et al., 2001). Caraciforme é uma das mais vastas e diversificadas ordem de peixes de água doce existentes, considerada importante para a pesca esportiva e comercial no Brasil, sendo caracterizada por possuírem geralmente uma nadadeira adiposa, 5 a 12 raios nas nadadeiras dorsais e osso pré-maxilar fixo ao crânio (REIS; KULLANDER; FERRARIS-JÚNIOR, 2003).

A Usina Hidrelétrica de Machado Mineiro foi construída pela Companhia Energética do Estado de Minas Gerais (CEMIG), no rio Pardo, no município de Águas Vermelhas/MG, possuindo duas unidades geradoras e potência declarada de 1,720 MW e volume do reservatório de 142,8 hm³ e uma Estação de Piscicultura com o objetivo de desenvolver técnicas de reprodução artificial e cultivo das espécies de peixes de caráter reofílico das bacias dos rios Pardo e Jequitinhonha (CEMIG, 2011). As espécies consideradas migradoras da ordem Caraciforme e que vêm sendo reproduzidas na bacia do Rio Pardo, são: curimatá (*Prochilodus hartii* – STEINDACHNER, 1875), piabanha (*Brycon* sp – espécie descrita mas ainda não nomeada por LIMA, 2001), piau (*Leporinus steindachneri* – EIGENMANN; OGLE, 1907) e piapara (*Leporinus crassilabris* – BORODIN, 1929, renomeado para *Leporinus elongatus* – GÉRY; MAHNERT; DLOUHY, 1987), de acordo com Meireles et al. (2011).

Os impactos a jusante de reservatórios sobre os peixes parecem afetar principalmente seu processo reprodutivo, visto que em regiões tropicais o regime de cheias é considerado crítico no desencadeamento da migração reprodutiva e da desova (GODINHO; GODINHO, 2003). A jusante das barragens hidrelétricas, geralmente ocorre alterações no regime hidrológico ocasionando condições térmicas e hidrodinâmicas instáveis que podem ocasionar prejuízos no mecanismo de desova em peixes que dependem de condições climáticas específicas para o processo reprodutivo (MEIRELES, 2005).

Diversos impactos são relatados sobre populações de peixes que vivem a jusante de reservatórios, como interrupção no processo migratório, inibição da reprodução, facilitação na introdução de espécies exóticas, mudanças de comportamento, aumento na vulnerabilidade à predação, interferência nas áreas de alimentação e recrutamento de filhotes (GODINHO; GODINHO, 2003).

Como medida mitigadora para os impactos causados pelo barramento, as técnicas de reprodução induzida e larvicultura constituem de uma maneira simples e eficaz, mas que depende de mais estudos graças à grande diversidade ictiológica nas bacias brasileiras (SATO, 1999).

O conhecimento do desenvolvimento ontogenético em peixes brasileiros é escasso, especialmente das espécies migradoras, sendo seu estudo importante para o conhecimento da história de vida inicial e para taxonomia e larvicultura (NAKATANI et al., 2001).

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; KANAI-AZUMA; KANI, 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 (BMP), entre outros, que participam do processo de desenvolvimento embrionário e larval de peixes (CHANDLER et al., 2007).

As proteínas ósseas morfogenéticas (BMP) podem ser subdivididas em até nove classes, sendo com exceção da BPM-1, as BPM de 2 a 9 possuem sequência de aminoácidos que as identifica como membros da superfamília dos TGF- β (KINGSLEY, 1994). Mas entre todas elas, a BMP-2 apresenta um forte potencial de osteoindução (FUKUDA; KIKUCHI, 2005), sendo também importante na morfogênese e organogênese de outros órgãos e tecidos em mamíferos (DANESH et al., 2009). No entanto, existem poucos trabalhos descrevendo a importância dessa proteína no desenvolvimento ontogenético de peixes.

A literatura científica ressalta a importância do conhecimento da anatomia funcional do sistema digestório dos peixes, por ser muito variável, relacionando-a com a diversidade dos regimes alimentares e o modo de vida (MENIN; MINURA, 1993). Entretanto, nenhum trabalho foi descrito para as espécies da bacia do rio Pardo relacionado com anatomia funcional dos sistemas digestório e reprodutor.

Estudos de análises da morfologia óssea são muito importantes para as pesquisas ictiológicas, quando se quer de limitar caracteres diagnósticos específicos, permitindo uma melhor definição dos grupos e características individuais específicas nos estudos taxonômicos (CAMPELLO; BEMVENUTI, 2002).

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Comparar o desenvolvimento ontogenético e a anatomia funcional do sistema digestório, esquelético e reprodutor dos peixes de água doce da bacia do rio Pardo, curimbatá (*Prochilodus hartii* - STEINDACHNER, 1874), piabanha (*Brycon sp* – espécie descrita mas não nomeada – LIMA, 2001) e piaú (*Leporinus steindachneri* – EIGENMANN; OGLE, 1907) reproduzidos na Estação de Piscicultura da Usina Hidrelétrica de Machado Mineiro.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a morfologia dos ovários e testículos *P. hartii*, *Brycon sp.* e de *L. steindachneri*, capturados na bacia do rio Pardo;
- Identificar, analisar e estabelecer a duração das diferentes fases do desenvolvimento ontogenético nas espécies citadas;
- Identificar ao longo do desenvolvimento ontogenético dos peixes em estudo, a expressão de BMP-2 no processo de morfogênese e organogênese, através da técnica de imunohistoquímica;
- Comparar os aspectos da morfologia óssea entre as espécies estudadas, identificando diferenças interespecíficas;
- Analisar os aspectos morfológicos e biométricos do sistema digestório relacionando com seus hábitos alimentares;
- Analisar e classificar os tipos de ovos e parâmetros reprodutivos dos peixes em estudo.

Revisão de Literatura

3 REVISÃO DE LITERATURA

Caraciforme é uma ordem de peixes de grande diversidade que incluem mais de 1.800 espécies, 270 gêneros e 18 famílias (REIS; KULLANDER; FERRARIS-JÚNIOR, 2003), cujos representantes possuem ampla distribuição geográfica em águas continentais do sul dos Estados Unidos da América, México, Américas Central e do Sul e África (MIRANDE, 2010).

Os peixes da família Prochilodontidae são considerados um dos componentes mais importantes da pesca comercial e de subsistência em ambientes de água doce na América do Sul (OLIVEIRA et al., 2003). Essa família compreende 21 espécies distribuídas em três gêneros: *Ichthyoelephas* (2 espécies), *Prochilodus* (13 espécies) e *Semaprochilodus* (6 espécies), conforme Castro e Vari (2004).

O gênero *Brycon* é o principal representante da subfamília Bryconinae (Characidae), sendo amplamente distribuído por toda a América do Sul e Central (BRITSKI; SATO; ROSA, 1988). As espécies desse gênero, conhecidas regionalmente como matrinxãs, piracanjubas, pirapitingas e piabanhas, constituem um grupo de peixes neotropicais migradores (HOWES, 1982) de reconhecida importância comercial, tanto para a pesca extrativa quanto para a piscicultura (REIS; KULLANDER; FERRARIS-JÚNIOR, 2003).

A família Anostomidae é um grupo de peixes da ordem Characiforme, composto por cerca de 110 espécies, restritas à América do Sul e com representantes em todas as bacias hidrográficas do Brasil (MELO; ROPKE, 2004). Conhecidos popularmente como piaus, este grupo de peixes tem elevada importância comercial e espécies de pequeno porte têm grande aceitação na aquariofilia, algumas espécies alcançam cerca de 400 mm de comprimento e mais de um quilo em peso (SANTOS; JEGU 1996).

3.1 ICTIOFAUNA DA BACIA DO RIO PARDO

A ictiofauna do rio Pardo ainda é muito pouco estudada, sendo relatada ocorrência de uma nova espécie denominada de *Hyphessobrycon vinaceus* (BERTACO; MALABARBA; DERGAM, 2007), sendo mais comumente utilizadas na desova induzida, exemplares de curimatá (*Prochilodus hartii*), piabanha (*Brycon* sp), piau (*Leporinus steindachneri*) e

piapara (*Leporinus elongatus*) na Estação de Piscicultura de Machado Mineiro, situada no município de Águas Vermelhas/MG, de acordo com Meireles et al. (2011). Também, trabalhos descrevendo a história natural e genética do bagre roncador (*Wertheimeria maculata*) vêm sendo publicados (ELER et al., 2007; VONO; BIRINDELLI, 2007).

Nesta bacia hidrográfica, algumas espécies vêm sendo ameaçadas de extinção, como o surubim (*Steindachneridion amblyura*) que possui ocorrência também na bacia do rio Jequitinhonha (IBAMA, 2004) e no qual os ribeirinhos queixam-se de sua gradual redução ao longo dos anos (GODINHO; GODINHO; VONO, 1999).

Os peixes da bacia do rio Pardo, geralmente também tem ocorrência na bacia do rio Jequitinhonha (GODINHO; GODINHO; VONO, 1999), sendo descritas quarenta e duas espécies, das quais vinte e uma são Caracíformes, dezessete siluriformes e quatro perciformes.

A ausência de espécies de grande porte é uma característica marcante da ictiofauna do alto e médio rio Pardo, sendo que suas espécies maiores são consideradas de médio porte em outras bacias (MEIRELES et al., 2011).

As poucas publicações científicas existentes sobre sistemáticas dos peixes do rio Pardo foram utilizados peixes capturados na expedição de Agassiz entre 1865 e 1866, conhecida como expedição Thayer (ROCHA; BOEGER, 2009), cujos exemplares encontram-se em museus fora do Brasil.

3.2 IMPORTÂNCIA DO ESTUDO DO DESENVOLVIMENTO ONTOGENÉTICO DOS PEIXES

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 (LUZ et al., 2001). De acordo com Woynarovich e Horváth (1983), o estudo dos primeiros dias de vida dos peixes é muito importante, especialmente de espécies selvagens, potencialmente viáveis para a piscicultura.

Com relação ao grande número de espécies nativas brasileiras, muito pouco se conhece acerca do seu desenvolvimento embrionário (NAKATANI et al., 2001). A descrição dos estágios embrionários de uma espécie pode fornecer inúmeras vantagens, tais como: o reconhecimento de seus embriões em ambientes naturais, o que permite uma melhor avaliação do local de desova daquela espécie, e a detecção das alterações relacionadas aos fatores

ambientais nas incubadoras, as quais poderão acarretar malformações larvais e baixas produtividades (LUZ et al., 2001).

O termo ovo constitui no período decorrente do momento da fertilização até a eclosão (WOYNAROVICH; HORVÁTH, 1983). Já o termo larva, segundo os mesmos autores, compreende peixes cujo período de vida se estende desde a eclosão até a absorção quase total do saco vitelino e o enchimento da bexiga natatória. Esse período corresponde ao estágio de pré-flexão ou de protolarva (ARAÚJO-LIMA; KIROVSKY; MARCA, 1993). Pós-larva é o período que se inicia a alimentação exógena, também chamada de período de flexão ou fase de Kasidoron (NAKATANI et al., 2001). Posteriormente entra na fase de pós-flexão onde ocorre o alinhamento vertical dos ossos hipurais da nadadeira caudal e transformação do corpo que era alongado e comprido em um pouco mais arredondado na região ventral, sendo considerado como juvenil ou alevino (ADRIAENS, 1998).

O conceito de morfogênese em peixes é um processo de modelagem dos organismos, ou seja, do seu desenvolvimento a partir do zigoto, através da formação dos tecidos, órgãos e sistemas, enquanto da organogênese é o processo do desenvolvimento do embrião na fase de neurula, ocorrendo à especialização dos tecidos originados pelos somitos (NAKATANI et al., 2001).

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).

As distintas espécies de peixes, durante a sua ontogenia inicial, podem apresentar grandes semelhanças entre si, dificultando, segundo Silva (2010), o trabalho dos taxonomistas, o que torna a caracterização do desenvolvimento inicial de peixes imprescindível para a identificação de larvas na natureza. Entretanto, apesar de possuir características bem similares entre si, de acordo MACIEL (2006), o grau de desenvolvimento no início do período larval pode ser muito diferente em várias espécies de peixes, sendo então, o estudo das características morfológicas essencial para o conhecimento da biologia do animal, para o cultivo e para a taxonomia.

3.3 BMP-2 NO DESENVOLVIMENTO ONTOGENÉTICO DOS PEIXES

As proteínas ósseas morfogenéticas ou BMP (do inglês, *Bone Morphogenetic Proteins*) são citocinas pleiotrópicas pertencentes à superfamília do Fator de Crescimento e Transformação β (TGF β) de acordo com Balemans e Van Hull (2002). Os papéis das BMP no desenvolvimento embrionário e funções celulares na vida adulta têm sido exaustivamente estudados nos últimos anos em mamíferos. Estas proteínas, na atualidade são consideradas como componentes de um sistema de sinalização capaz de regular o crescimento celular, diferenciação, apoptose, quimiotaxia, angiogênese e produção de matriz no desenvolvimento embrionário e no pós-natal em modelos murinos (DANESH et al., 2009).

As moléculas difusíveis de BMP ligam-se a receptores específicos de cinases de serina/treonina presentes na membrana plasmática que dimerizam reagindo à ligação dessa proteína (KINGSLEY, 1994). O complexo formado pelos receptores e BMP quando ativado, fosforiza as proteínas Smads, ativando a transcrição de genes alvos (SAKOU, 1998).

Em *Danio rerio*, a formação de padrões dorsoventral na fase de gástrula é regulado por atividades opostas ventrais de BMP e antagonistas dorsais específicos para BMP como Nogina, Cordina e Folistatina (KISHIMOTO et al., 1997). Estudos apontam a importância da expressão de BMP-2 na morfogênese e organogênese de *Danio rerio* na formação de nadadeiras, ossos, cartilagens, tendões e ligamentos, coração, dentes e ouvido interno (BRAND, 2003; FEINER et al., 2009; HAMMOND et al., 2009; SMITH et al., 2006; WISE; STOCK, 2010). Entretanto, não foi observado na literatura consultada, trabalhos descrevendo a importância da BMP-2 no desenvolvimento ontogenético de peixes neotrópicos.

3.4 ANATOMIA FUNCIONAL DOS SISTEMAS DIGESTÓRIO, REPRODUTOR E ESQUELÉTICO DE PEIXES NEOTROPICAIS

A diversidade das espécies nativas de peixes, e principalmente a diferença morfofisiológica entre elas, apresentam-se como uma vasta área de estudo, uma vez que estes animais possuem hábitos e comportamentos alimentares diversos (RODRIGUES; NAVARRO; MENIN, 2008).

O sistema digestório dos peixes é dividido em: intestino cefálico, que compreende a cavidade bucofaringeana; intestino anterior, que compreende o esôfago e o estômago; o intestino médio, que compreende o intestino propriamente dito; e intestino posterior, que é o último segmento do tubo nos peixes que não possuem valva ileorretal, ou reto, que a denominação dada ao último segmento nos peixes que possuem valva ileorretal (PREJS, 1981). A estrutura, a forma e o tamanho dos segmentos constituintes do tubo digestório variam amplamente nos teleósteos, segundo as espécies e os hábitos alimentares (BÈRTIN, 1958).

O formato do estômago e as adaptações do intestino, desde o comprimento e o arranjo na cavidade peritoneal até a estrutura da mucosa, são um dos aspectos mais estudados anatomicamente, quanto às interações entre o ambiente, o regime alimentar e o sistema digestório dos peixes (MENIN, 1988). Outro aspecto que facilita a classificação dos peixes conforme o hábito alimentar é o coeficiente intestinal que é bastante variável, sendo nas espécies carnívoras ictiófagas, compreendido entre 0,2 e 2,5; nos onívoros, entre 0,6 e 8,0; e nos herbívoros, entre 0,8 e 15,0 (BÈRTIN, 1958).

Os peixes podem ser classificados de acordo com Godinho (1970), em iliófagos ou detritívoros, aqueles que ingerem lodo, pequenos moluscos, algas, insetos aquáticos e anelídeos presentes no fundo dos ambientes aquáticos; onívoros, aqueles que exploram alimentos de origem animal e vegetal vivo em partes bastante equilibradas; herbívoros e frugívoros, aqueles que têm preferência por alimentos de origem vegetal ricos em fibra e de baixo valor energético; planctófagos, aqueles que têm preferência por plâncton (comunidade aquática constituída de algas unicelulares e organismos animais); e carnívoros, aqueles que se alimentam de animais de maior porte, como insetos, crustáceos, peixes menores, anfíbios e pequenos répteis.

O conhecimento de características morfo-histológicas ovarianas e testiculares constitui numa etapa básica e primordial para a compreensão de reprodução natural de peixes brasileiros (GODINHO; GODINHO, 2003), enquanto das características reprodutivas fornece subsídios para procedimentos de manejo e conservação de populações nativas (WOYNAROVICH; HORVÁTH, 1983).

Os ovários dos teleósteos geralmente são estruturas pares, com formas e dimensões diversas, localizando-se longitudinalmente no corpo, sob a bexiga natatória, suspensos pelo mesentério, paralelamente aos rins, sendo que o tamanho e peso variam conforme o estágio de maturação sexual e a idade do peixe (GODINHO; GODINHO, 2003). A maioria dos peixes teleósteos possuem ovários do tipo cistovariano, em que o lume ovariano se estende até o

oviduto (HOAR; RANDALL, 1988). Os ovários de peixes teleósteos geralmente são envolvidos externamente por uma túnica albugínea conjuntiva que emite septos para o interior do órgão, formando lamelas ovulíferas, nas quais encontram-se ovogônias e ovócitos em diferentes fases de desenvolvimento (WOYNAROVICH; HORVÁTH, 1983).

Geralmente, os testículos dos teleósteos são órgãos pares, podendo estar parcial ou totalmente fundidos entre si, e estão localizados na cavidade celomática, dorsalmente ao tubo digestório, ventralmente aos rins e ventro-lateralmente ao longo da bexiga natatória, encontrando-se presos à parede celomática pelo mesórquio (GODINHO; GODINHO, 2003). Externamente, este órgão é revestido por uma túnica albugínea da qual partem septos fibrosos em sentido radial, que percorrem o interior do testículo, dividindo em lóbulos, no qual são preenchidos por túbulos seminíferos, os quais apresentam paredes formadas por cistos que se apoiam na lâmina basal e que são revestidos por prolongamentos citoplasmáticos das células de Sertoli (MEIRELES, 2005).

O reconhecimento dos sexos na maioria dos teleósteos é difícil, sendo realizada a sexagem geralmente no período que antecede a reprodução, através das características externas como presença de um ventre abaulado e papila urogenital avermelhada nas fêmeas e através de uma pressão ventral no sentido céfalo-caudal com liberação de esperma viscoso em machos (WOYNAROVICH; HORVÁTH, 1983). Algumas características secundárias transitórias podem ser observadas em teleósteos, como emissão de um ronco em alguns machos do gênero *Prochilodus* (CASTRO; VARI, 2004) e modificações na nadadeira anal em machos do gênero *Brycon* (WOYNAROVICH; SATO, 1990).

O esqueleto dos peixes funciona como elemento de sustentação dos músculos e das demais partes do corpo, atuando na proteção dos órgãos internos, sendo dividido 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 LULLIS; PULERÀ, 2007).

O esqueleto axial é formado pelos ossos do crânio e da coluna vertebral. 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. As vértebras possuem em sua estrutura, espinhas neurais (dorsalmente), espinhas hemais (ventralmente), processos transversos (lateralmente), e um corpo ósseo, que une as costelas às espinhas 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). Os raios podem ser simples e duros (espinhos) ou ramificados e moles. Normalmente existem nadadeiras sem raios, denominadas adiposas, logo após a nadadeira dorsal em várias espécies de peixes Caraciformes (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).

Portanto, é de fundamental importância o conhecimento da biologia das espécies e, em particular, o conhecimento da interligação desses fatores, o que fornece subsídios para melhor compreensão do seu desempenho em seus ecossistemas naturais ou em atividades de criação em cativeiro.

Capítulo 1

**Comparações no desenvolvimento ontogenético e expressão
de BMP-2 na organogênese de três Caraciformes da bacia
do rio Pardo**

RESUMO

Objetivou-se com este trabalho, estudar o desenvolvimento ontogenético de três peixes migradores da bacia do rio Pardo, curimatá (*Prochilodus hartii*), piabanha (*Brycon sp*) e piaui (*Leporinus steindachneri*) reproduzidos por indução hormonal com extrato bruto de hipófise de carpa na Estação de Piscicultura de Machado Mineiro, município de Águas Vermelhas/MG. As desovas foram realizadas em janeiro de 2011 e de 2012, sendo realizada a técnica a seco e após fecundação e hidratação, mantidos em incubadoras tipo funil de 30 L, com água circulante. O momento da fertilização foi contado como tempo zero e foi registrado o tempo como hora grau após fecundação (HGF) como tempo decorrido em horas x temperatura da água. Amostras de ovos, embriões, larvas, pós-larvas e alevinos foram coletadas e visualizadas com auxílio de um microscópio estereoscópico adaptado com uma câmera fotográfica digital e depois fixados em solução de Bouin, solução de Carnoy e paraformaldeído 4% para realização de técnicas histológicas de rotina, imunohistoquímica para BMP-2 e microscopia eletrônica de varredura, respectivamente. As fases mais importantes do desenvolvimento ontogenético mostraram que o fechamento do blastóporo em *P. hartii* foi com 79,7 HGF, enquanto em *Brycon sp* foi de 75,8 HGF e em *L. steindachneri* foi de 151,8 HGF. A abertura da boca foi de 1.674,6 HGF em *P. hartii*, 1.671 HGF em *Brycon sp* e 2.158,2 HGF em *L. steindachneri*. Após abertura e diferenciação da boca de *Brycon sp*, foi caracterizado pela intensa atividade de canibalismo. BMP-2 foi identificada na blastocele nas fases de blástula e gástrula, promovendo a padronização axial em todas as espécies estudadas. Na fase embrionária, BMP-2 foi identificada na formação da vesícula óptica, notocorda e somitos. Na fase larval e de alevinagem, BMP-2 foi identificada na formação de brânquias, olhos, coração, estômago, intestino, fígado, nadadeiras, músculos, ossos e demais tecidos derivados dos somitos embrionários.

Palavras-chave: Embriologia. Peixes. Rio Pardo. BMP-2.

ABSTRACT

The objective of this work was to study the ontogenetic development of three migratory fish from the Pardo River basin, Curimbata (*Prochilodus hartii*) Piabanha (*Brycon sp*) and Piau (*Leporinus steindachneri*) bred by hormonal induction with crude extract of carp pituitary in Estação de Piscicultura de Machado Mineiro, county of Aguas Vermelhas/MG. Spawning were conducted in January 2011 and 2012, by dry methods and, after fertilization and hydration, eggs were kept in incubators type funnel 30 L with circulating water. The time of fertilization was counted as time zero and the time was recorded as hours-degree post fertilization (HPF) as the elapsed time in hours x water temperature. Samples of eggs, embryos, larvae, post-larvae and fry were collected and visualized with the aid of a stereoscopic microscope fitted with a digital camera and then fixed in Bouin's solution, Carnoy solution and 4% paraformaldehyde for performing histological techniques routine immunohistochemistry for BMP-2 and scanning electron microscopy, respectively. The most important phases of ontogenetic development showed that the closure of the blastopore in *P. hartii* was 79.7 at HGF, while in *Brycon sp* was 75.8 HPF and *L. steindachneri* was 151.8 HPF. The mouth opening was 1,674.6 HPF in *P. hartii*, 1,671 HPF in *Brycon sp* and 2,158.2 HPF in *L. steindachneri*. After the mouth opening and differentiation of *Brycon sp*, an intense activity of cannibalism was observed. BMP-2 was identified in the blastocoel of the blastocyst and gastrula stages, promoting axial patterning in three species studies. In the embryo, BMP-2 has been identified forming the optic vesicle, notochord and somites. In larval and nursery stages, BMP-2 has been identified in the formation of gills, eyes, heart, stomach, intestine, liver, fins, muscle, bone and other tissues derived from embryonic somites.

Keywords: Embryology. Fish. Pardo River. BMP-2.

4 INTRODUÇÃO

O Brasil possui um grande potencial hídrico, sendo privilegiado pelas muitas espécies de peixes ainda pouco exploradas e com potencial zootécnico não conhecido (LUZ et al., 2001).

O Pardo é um rio federal, que nasce no Estado de Minas Gerais, no município de Rio Pardo de Minas, e deságua no Estado da Bahia, no município de Canavieiras, sendo do ponto de vista ictiológico, suas espécies ainda muito pouco conhecidas e com escassez de trabalhos para elucidar o comportamento reprodutivo da ictiofauna (MEIRELES et al., 2011).

A construção de uma barragem prejudica o ciclo reprodutivo de diversas espécies de peixes ao impedir que eles nadem rio acima em busca de um local apropriado para a desova, como também, altera o aporte fluvial de água e matéria orgânica, afetando a diversidade ictiológica (KNOPPERS et al., 2006). Para atenuar esse efeito, são necessários dispositivos de transposição cujo funcionamento vem sendo questionado (PELICICE; AGOSTINHO, 2008) e utilização de técnicas de reprodução induzida e repovoamento vem sendo empregados (NARAHARA et al., 2002).

A Usina Hidrelétrica de Machado Mineiro foi construída pela Companhia Energética do Estado de Minas Gerais (CEMIG), no rio Pardo, no município de Águas Vermelhas/MG, possuindo duas unidades geradoras e potência declarada de 1,720 MW e volume do reservatório de 142,8 hm³, além de uma Estação de Piscicultura com o objetivo de desenvolver técnicas de reprodução artificial e cultivo das espécies de peixes de caráter reofílico da referida bacia hidrográfica (CEMIG, 2011).

Um dos problemas frequentes das estações de pesquisa em piscicultura, com vistas ao repovoamento de cursos d'água alterados pela construção de barragens e usinas hidrelétricas, ou mesmo de piscicultores e pesquisadores de instituições públicas e privadas, é a limitação existente no conhecimento das fases iniciais do cultivo de espécies nativas, principalmente relacionados com os estádios e alimentação, que acarreta altas taxas de mortalidade até a fase de alevino (NAKATANI et al., 2001).

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 e para taxonomia e larvicultura (GODINHO; GODINHO, 2003). 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 (NINHAUS-SILVEIRA; FORESTI; AZEVEDO, 2006).

As primeiras semanas de desenvolvimento constituem um período crítico para as larvas de peixes, particularmente quando termina a fase vitelínica e inicia a alimentação exógena (NAKATANI et al., 2001). Limitações morfológicas, como tamanho da boca que restringe o número e tamanho de sua alimentação, além de limitações fisiológicas, como o desenvolvimento incompleto de glândulas digestivas ou atividades enzimáticas incipientes, podem causar altas taxas de mortalidade nessa fase (MACIEL et al., 2009). Outro evento que causa grande mortalidade em algumas espécies durante a fase de pós-larva é a ocorrência de canibalismo (ANDRADE-TALMELLI et al., 2001), que limita muitas vezes, o sucesso da reprodução induzida.

Embriogênese é considerada como sendo o período compreendido entre a fertilização e a eclosão do ovo, sendo muito influenciada pela temperatura da água (GODINHO; GODINHO, 2003). 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 et al., 2003).

O termo larva é empregado para indicar o período de vida do peixe compreendido entre a eclosão e o enchimento da bexiga gasosa (WOYNAROVICH; HORVÁTH, 1983), sendo de fundamental importância para a larvicultura, o tempo de absorção do saco vitelínico, pigmentação da retina, presença ou não de órgão adesivo, abertura de boca e lúmen intestinal, flexão da notocorda, desenvolvimento das nadadeiras, enchimento das nadadeiras e padrão de pigmentação cutânea (GODINHO; GODINHO, 2003).

Com relação ao grande número de espécies nativas brasileiras, muito pouco se conhece acerca do seu desenvolvimento embrionário (HONCZARYK, 1995). 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; ZNIBONI-FILHO; ESQUIVEL, 2004).

O estudo do desenvolvimento ósseo em peixes juvenis tem dado suporte a trabalhos nas mais variadas áreas. Com o surgimento de novas tecnologias de pesquisa, como a

imunohistoquímica, tornou-se possível estudar a osteogênese de peixes nos níveis da biologia celular (KISHIMOTO *et al.*, 1997). 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 Morfogênicas (BMP), entre outros, que participam do processo de desenvolvimento do tecido ósseo (CHANDLER *et al.*, 2007). As BMP podem ser subdivididas em até nove classes (TAM; KANAI-AZUMA; KANAI, 2003), com exceção da BMP1, as BMP 2 a 9 possuem sequência de aminoácidos que as identifica como membros da superfamília dos TGF- β (KINGSLEY, 1994). Mas entre todas elas, a BMP-2 apresenta um forte potencial de osteoindução (FUKUDA; KIKUCHI, 2005) sendo considerada essencial em *Danio rerio*, durante as fases iniciais (KISHIMOTO *et al.*, 1997), na formação das nadadeiras (SMITH *et al.*, 2006), na morfogênese dos canais semicirculares do ouvido (HAMMOND *et al.*, 2009) e na formação dentária (WISE; STOCK, 2010).

Neste trabalho, foram comparadas as fases do desenvolvimento ontogenético de três espécies de peixes importantes da bacia do rio Pardo, o curimbatá (*Prochilodus hartii* – Steindachner, 1874), o piau (*Leporinus steindachneri* – Eigenmann; Ogle, 1907) e a piabanha (*Brycon sp* – espécie descrita e ainda não nomeada – Lima, 2001) através de imagens obtidas de um microscópio estereoscópico, histologia, microscopia eletrônica de varredura e da expressão de BMP-2 com utilização de técnicas de imunohistoquímica.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Amostragem

Os animais 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 das espécies em estudo, foram empregados sete casais de reprodutores de curimbatá (*Prochilodus hartii*), e seis de piabanha (*Brycon sp*) no mês de janeiro de 2011 e seis de piau (*Leporinus steindachneri*) no mês de janeiro de 2012, foram submetidos à reprodução induzida por hipofisacção, 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, na Estação de Piscicultura de Machado Mineiro (Figura 1). A fertilização foi realizada a seco, misturando-se sêmen aos ovócitos extruídos 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 (MBC, Rússia). Análise morfométrica de 10 exemplares de cada espécie de ovos, larvas, pós-larvas e alevinos foi realizada com este equipamento, com uma lente ocular micrométrica WF 14X para estereomicroscópio (Equipar, Brasil).

Houve uma grande variação de temperatura da água sendo encontrado a 26 ± 2 °C em média no período de janeiro de 2011 e 23 ± 3 °C no período de janeiro de 2012. Graças a esta variação, o trabalho foi realizado com horas-grau após fertilização, que é o intervalo que corresponde à temperatura da água multiplicada pelo tempo, para facilitar as comparações. O momento em que os ovócitos e os espermatozoides foram misturados foi considerado como o tempo zero.

Amostras de ovos, larvas, pós-larvas e alevinos 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), solução de Carnoy (60% de etanol absoluto, 30% de clorofórmio e 10% de ácido acético glacial) e paraformaldeído 4%, para posterior avaliação através da microscopia de luz, imunohistoquímica e microscopia eletrônica de varredura, respectivamente. Foram utilizados 60 alevinos (20 de cada espécie) 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.

5.2 Histologia

Para estudo da organogênese e desenvolvimento ontogenético, ovos, embriões, larvas, pós-larvas e alevinos foram fixados em líquido de Bouin por 8-12 horas, conservados em etanol 70% e incluídos em parafina, seccionadas em série com 5 µm de espessura e coradas com hematoxilina/eosina, conforme técnicas histológicas de rotina. Posteriormente, imagens foram capturadas através do Microscópio de luz Olympus BX3, acoplado à câmera AxioCam HCr com software de captura AxioVision/Olympus do Laboratório de Anatomia

Microscópica e Imunohistoquímica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

5.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

Amostras fixadas em Paraformaldeído 4% foram lavadas em solução de PBS, após remoção do córion, pós-fixadas em tetróxido de ósmio 2%, imersas em ácido tânico por 30 minutos e lavadas em água destilada. Posteriormente foram desidratadas em soluções de etanol seriadas e os fragmentos montados em bases metálicas de alumínio (stubs) com cimento de carbono e cobertas com ouro (Au) através de aparelho Iom Sputter Balzer SCD – 040. Em seguida, as amostras foram analisadas 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.

5.4 Imunohistoquímica

Amostras de ovos, embriões, larvas, pós-larvas e alevinos foram fixadas em solução de Carnoy durante 12 horas, conservadas em etanol absoluto e incluídas em parafina para analisar a expressão da Proteína Óssea Morfogenética-2 (BMP-2) durante o desenvolvimento ontogenético. Lâminas histológicas foram desparafinizadas em dois banhos de xilol a 60°C durante 5 minutos. Em seguida, reidratação em uma série de etanol em concentrações decrescentes durante 30 segundos e lavagem em água corrente por 10 minutos, seguido de dois banhos em água destilada. Foi realizada a recuperação dos sítios antigênicos para o anticorpo primário, utilizando-se desmascaramento em tampão citrato 1x (pH 6,0) diluído em PBS 1x + tween 20 em forno micro-ondas (3 x 5 min.). Em seguida foi feito um bloqueio de peroxidase endógena tecidual com imersão do material em solução de peróxido de hidrogênio a 3% diluído em metanol durante 5 minutos, seguido de lavagem em PBS 1x + tween 20 (3 x 5 min.). Posteriormente foi realizado o bloqueio das reações inespecíficas com leite em pó desnatado durante 30 minutos, seguido de lavagem em PBS 1x + tween 20 (3 x 5 min.). Após esse preparo, as lâminas foram incubadas com anticorpos primários monoclonais anti-BMP-2

humano (R&D systems – Catalogo: MAB 3551, Lote: DSV 0207051), sob temperatura controlada à 37°C, durante a noite, em câmara úmida. Em seguida, foi feita lavagem em PBS 1x + tween 20 (3 x 5 min.) e incubação com anticorpo secundário (pós primary block - Novocastra) com 100 µL/corte em temperatura ambiente durante 30 minutos. Depois, foi realizada nova lavagem com PBS 1x + tween 20 (3 x 5 min.) e incubação com complexo terciário estreptavidina-biotina conjugada com peroxidase (Polymer Detection System, Novocastra) em temperatura ambiente durante 30 minutos. Em seguida foi realizada nova lavagem com PBS 1x + tween 20 (3 x 5 min.) e revelação com DAB (1 gota de cromógeno, sendo verificada na hora a reação). Nova lavagem com PBS 1x + tween 20 (3 x 5 min.) foi realizada seguido de coloração de fundo com hematoxilina de Harris durante 5 minutos, banho em água destilada e em água amoniacal (solução de 500 µL de hidróxido de amônio em 100 mL de água destilada) em 3 banhos de 5 minutos. Concluídas as reações, os cortes foram desidratados em série de etanol em concentrações crescentes, diafanizados em xilol, seguido de montagem para análise em microscópio de luz. O controle negativo foi realizado com omissão do anticorpo primário e realizada a coloração com Hematoxilina de Harris. As imagens foram capturadas através do Microscópio de luz Olympus BX3, acoplado à câmera AxioCam HCr com software de captura AxioVision/Olympus do Laboratório de Anatomia Microscópica e Imunohistoquímica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

5.5 Análise estatística

O comprimento das larvas da eclosão até a fase juvenil estão representados como média $\pm$ desvio padrão e submetidos à análise de variância ANOVA e ao teste de Tukey com 5% de significância, utilizando o software GraphPad Prism versão 5.00 para Windows (2007).

6 RESULTADOS

6.1 Ovos

Os exemplares de curimatá (*Prochilodus hartii*), piabanha (*Brycon sp*) e piauí (*Leporinus steindachneri*) produziram ovos pelágicos, não adesivos, esféricos e translúcidos. No entanto, houve diferenças nas colorações dos ovos, variando de cinza-esverdeado em *P. hartii* (Figura 2 A₁), verde-azulada em *Brycon sp* (Figura 2 B₁) e marrom *L. steindachneri* (Figura 2 C₁). Todos são caracterizados pela formação de um grande espaço perivitelino após hidratação, que persistiu até a formação do embrião. Em relação à quantidade e padrão de distribuição do vitelo, os ovos das espécies estudadas 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, B₂ e C₂).

Os ovos de todas as espécies estudadas possuem aspecto esférico, atingindo $1,0 \pm 0,3$ mm de diâmetro em *P. hartii*, $1,5 \pm 0,5$ mm em *Brycon sp* e $0,96 \pm 0,2$ mm em *L. steindachneri*, sendo considerado maior no material coletado de *Brycon sp* e não apresentando diferenças estatísticas nas outras espécies ($P > 0,05$). O córion é liso, sem órgãos adesivos em todas as espécies estudadas, visualizado através da microscopia eletrônica de varredura (Figura 2 A₃, B₃ e C₃). No ovo de *L. steindachneri*, a micrópila foi observada, sendo uma depressão em forma de funil no polo animal do córion onde ocorre a fecundação pelo espermatozoide (Figura 2 C₃). A hidratação ovocitária foi observada com 5,2 HGF em *P. hartii*, 3,9 HGF em *Brycon sp* e 3,4 HGF em *L. steindachneri*.

6.2 Embriogênese

As seguintes etapas foram estabelecidas para o desenvolvimento embrionário no presente trabalho: zigoto, clivagem, mórula, blástula, gástrula, diferenciação das camadas embrionárias e eclosão.

Figura 1 - Imagens de reprodutores de *P. hartii* (A), de *Brycon sp* (B) e de *L. steindachneri* (C), capturados no rio Pardo e utilizados na reprodução induzida na Estação de Piscicultura de Machado Mineiro, vista lateral direita.

Legenda: nota-se a presença de nadadeira dorsal (1), nadadeiras peitorais (2), nadadeiras pélvicas (3), nadadeira anal (4), nadadeira caudal (5) e nadadeira adiposa (6).

Neste estudo, todas as espécies apresentaram clivagem meroblástica ou parcial, ocorrendo esse processo apenas no polo animal. A primeira clivagem ocorreu com 20,8 HGF em *P. hartii*, 21,8 HGF em *Brycon sp* e 22,31 HGF em *L. steindachneri*. A segunda clivagem aconteceu com 23,4 HGF em *P. hartii*, 24,7 HGF em *Brycon sp* e 24,1 HGF em *L. steindachneri* (Figura 2 F₁). A terceira clivagem foi registrada com 25,8 HGF em *P. hartii* (Figura 2 D₁), 23,1 HGF em *Brycon sp* (Figura 2 E₁) e 25,9 HGF em *L. steindachneri*. Já a quarta clivagem foi verificada com 28,3 HGF, 27,3 HGF e 28,1 HGF para *P. hartii*, *Brycon sp* e *L. steindachneri*, respectivamente. Em seguida, a quinta clivagem ocorreu com 28,6 HGF, 29,1 HGF e 30,1 HGF para *P. hartii*, *Brycon sp* e *L. steindachneri*. E finalmente, a sexta clivagem ocorreu com 50,7 HGF, 47,5 HGF e 50,8 HGF para *P. hartii*, *Brycon sp* e *L. steindachneri*. O estágio de clivagem foi caracterizado pelas primeiras divisões mitóticas e continuou até a formação de espaços irregulares entre as células internas em todas as espécies estudadas, que foram consideradas como uma espécie de blastocelo. Durante a clivagem, o número de blastômeros aumentou, diminuindo o tamanho das células, que apresentaram tamanhos diferentes após quarta divisão (Figura 2 D₂, E₂ e F₂). Na microscopia eletrônica de varredura foram localizados os sulcos que marcaram as divisões em oito blastômeros em *P. hartii* (Figura 2 D₃) e *Brycon sp* (Figura 2 E₃) e em quatro blastômeros em *L. steindachneri* (Figura 2 F₃).

Na fase de blástula, a blastoderme apresentou em todas as espécies estudadas uma forma de meia-lua no estágio avançado, com um padrão de clivagem bastante indeterminado, mas contínuo (Figura 3 A₁, B₁ e C₁). Os espaços entre os blastômeros (blastocelo) foram irregulares nesta fase e a formação da camada de sincicial de vitelo ou periblasto foi iniciada (Figura 3 A₂, B₂ e C₂). No final desta etapa foi caracterizada pelos primeiros movimentos de epibolia, sendo que essa fase iniciou com 55,9 HGF em *P. hartii*, 52,0 HGF em *Brycon sp* e 67,3 HGF em *L. steindachneri*. Na microscopia eletrônica de varredura foi observada a camada sincicial de vitelo ou periblasto em todas as espécies estudadas (Figura 3 A₃, B₃ e C₃).

Figura 2 - Imagens capturadas usando microscópio estereoscópico (1), microscópio de luz (2) e microscópio eletrônico de varredura (3) de ovos hidratados e da fase de segmentação com 8 e/ou 4 blastômeros de *P. hartii* (A e D), de *Brycon sp* (B e E) e de *L. steindachneri* (C e F)

Legenda: nota-se a presença do córion (↓), polo animal (PA), polo vegetativo (PV), glóbulos de vitelo (GV), espaço perivitelino (EP), blastômeros (BL), sulcos de divisão (>) e micrópila (MI).

Na fase de gástrula foram evidenciados os movimentos morfogênicos de epibolia, que são predominantes nas espécies estudadas, juntamente com os movimentos de convergência e involução celular, que originarão as primeiras camadas dos folhetos embrionários caudo-cefálico e latero-lateral. Foi evidenciado o movimento de invaginação da placa vegetal (Figura 3 D₂) que consiste em um dobramento para dentro de um conjunto de células. O movimento de epibolia procedeu juntamente com a cobertura do saco vitelino pelo periblasto (Figura 3 F₂) e terminando após 79,7 HGF, 75,8 HGF e 151,8 HGF de desenvolvimento em exemplares de *P. hartii*, *Brycon sp* e *L. steindachneri*, respectivamente, com o fechamento do blastóporo (Figura 3 D₁, E₁ e F₁). Os movimentos morfogênicos de convergência e involução (Figura 3 E₂) começaram na camada de blastocele, a cerca de 50% de epibolia, originando o anel embrionário (Figura 3 D₃, E₃ e F₃) e culminando com a formação de duas camadas embrionárias: o epiblasto e hipoblasto (Figura 3 E₂).

Em seguida, a fase de diferenciação das camadas embrionárias ou organogênese foi caracterizada pela formação de órgãos rudimentares e sistemas que formam as camadas embrionárias. A formação do eixo embrionário, assim como a diferenciação das regiões cefálicas e caudal foram observadas nessa fase (Figura 4 A₃, B₃ e C₃), com visualização dos primeiros somitos, saco vitelino, notocorda e vesícula óptica (Figura 4 A₂, B₂ e C₂) com 240,7 HGF, 237,9 HGF e 362,3 HGF para *P. hartii*, *Brycon sp* e *L. steindachneri*, respectivamente. Nesse estágio, os embriões ainda não tinham realizado o desprendimento da cauda do saco vitelino (Figura 4 A₁, B₁ e C₁).

Com 412,2 HGF, 405,2 HGF e 754,25 HGF, para *P. hartii*, *Brycon sp* e *L. steindachneri*, houve o desprendimento da cauda do saco vitelino (Figura 4 D₁, E₁ e F₁), com aumento do número de somitos, crescimento e alongamento do embrião pelo eixo céfalo-caudal e desenvolvimento da vesícula óptica (Figura 4 D₂, E₂ e F₂) e formação da nadadeira embrionária (Figura 4 D₃, E₃ e F₃).

Figura 3 - Imagens capturadas usando microscópio estereoscópico (1), microscópio de luz (2) e microscópio eletrônico de varredura (3) da fase de blástula inicial e gástrula com fechamento do blastoporo de *P. hartii* (A e D), de *Brycon sp* (B e E) e de *L. steindachneri* (C e F)

Legenda: nota-se a presença do córion (↓), glóbulos de vitelo (GV), blastoderme (BD), periblasto (PB), anel embrionário (AE), epiblasto (EB), hipoblasto (HB), blastoporo (BP), movimento de epibolia (EP), movimento de involução (IN) e movimento de invaginação da placa vegetal (IV).

Figura 4 - Imagens capturadas usando microscópio estereoscópico (1), microscópio de luz (2) e microscópio eletrônico de varredura (3) da fase de embrião inicial e com cauda livre de *P. hartii* (A e D), de *Brycon* sp (B e E) e de *L. steindachneri* (C e F)

Legenda: nota-se a presença do córion (↓), saco vitelino (SV), vesícula óptica (VO), nadadeira embrionária (NE) e somitos (ST).

6.3 Ontogênese larval

A eclosão ocorreu após 583,7 HGF em *P. hartii*, 572,5 HGF em *Brycon sp* e 1.146,2 HGF em *L. steindachneri*. Nesta fase, as larvas realizaram movimentos de natação fortes, essenciais para o rompimento do córion. No momento da eclosão, as larvas apresentaram-se transparentes, desprovidas de pigmentos, acuidade visual (olhos ainda despigmentados), cabeça ligada ao saco vitelino e capacidade natatória, havendo uma nadadeira embrionária recobrando toda a região caudal (Figura 5 A₁, B₁ e C₁). As larvas de *P. hartii* tiveram um comprimento total de $6,8 \pm 0,4$ mm, enquanto as de *Brycon sp* apresentaram $8,8 \pm 0,6$ mm e as de *L. steindachneri* tiveram um comprimento de $6,2 \pm 0,8$ mm, logo após eclosão, sendo considerado maior no material coletado de *Brycon sp* e não apresentando diferenças estatísticas nas outras espécies ($P > 0,05$). Foram constatados os esboços do coração com células vermelhas do sangue, vesícula ótica, formação do cristalino e cálice óptico (Figura 5 A₂, B₂ e C₂). Em seguida, foi iniciado o processo de pigmentação dos olhos com cromatóforos na retina. O desenvolvimento inicial dos arcos branquiais foi observado, assim como a notocorda e vesícula cerebral na região cranial do corpo. Nessa etapa, houve uma redução do saco vitelino. Na microscopia eletrônica de varredura, foi visualizado o esboço da boca sendo formada em todas as espécies estudadas, sem abertura completa, não sendo visualizado esse processo ao microscópio estereoscópico (Figura 5 A₃, B₃ e C₃).

Na fase de pós-larva ou estágio de Kasidoron, foi observada a abertura da boca em 1.674,6 HGF em *P. hartii*, 1.671,0 HGF em *Brycon sp* e 2.158,2 HGF em *L. steindachneri*. Em seguida, houve completa absorção do saco vitelino, enchimento da bexiga natatória localizada ventralmente à notocorda e completa pigmentação da retina por cromatóforos (Figura 5 D₁, E₁ e F₁). As pós-larvas de *Brycon sp* apresentaram um maior comprimento total, com $10,85 \pm 0,07$ mm, seguido por *P. hartii* que apresentaram um comprimento de $8,7 \pm 0,8$ mm e *L. steindachneri* que apresentaram $6,7 \pm 0,6$ mm, sendo menores estatisticamente ($P < 0,0001$). Também foi observado o aparecimento dos arcos branquiais, opérculo, neurocrânio localizado dorsalmente, coração, estômago e intestino posterior com lúmen aberto (Figura 5 D₂, E₂ e F₂). Na microscopia eletrônica de varredura foram identificadas as nadadeiras peitorais, a nadadeira embrionária, os somitos (miômeros), opérculo e intestino posterior das espécies em estudo (Figura 5 D₃, E₃ e F₃).

Figura 5 - Imagens capturadas usando microscópio estereoscópico (1), microscópio de luz (2) e microscópio eletrônico de varredura (3) de larvas e de pós-larvas de *P. hartii* (A e D), de *Brycon* sp (B e E) e *L. steindachneri* (C e F)

Legenda: nota-se a presença do córion rompido (↓), saco vitelino (SV), olhos (OL), somitos (ST), neurocrânio (NC), notocorda (NT), nadadeira peitoral (NP), nadadeira embrionária (NE), boca (BC), bexiga natatória (BN), opérculo (OP), estômago/intestino médio e posterior (EI), arcos branquiais (AB) e coração (CO).

Pós-larvas de *Brycon sp*, aos 1.894,3 HGF foi observado um forte canibalismo 37 horas após a eclosão (Figura 6 A₁). Nessa fase, otólitos foram observados, olhos estavam bem desenvolvidos (Figura 6 A₂), abertura da boca era de $2,6 \pm 0,36$ mm de comprimento e comprimento total da pós-larva de $17,15 \pm 0,97$ mm, com uma proporção de 15,16% entre os últimos valores. Além disso, as pós-larvas apresentaram dentes cônicos na boca (Figura 6 A₃) e sistema digestório completo.

6.4 Alevinagem

No processo de transformação de pós-larva em alevino, também chamado de fase de transição, alevinagem ou ontogenia, houve um espessamento dérmico da nadadeira embrionária nas espécies em estudo, originando-se as nadadeiras caudal, dorsal, pélvica e anal. Aos 16, 5 e 14 dias após a eclosão, as pós-larvas de *P. hartii*, *Brycon sp* e *L. steindachneri*, respectivamente, começam a formação dos raios nas nadadeiras pélvicas, caudal, dorsal e anal, originados com a redução da nadadeira embrionária.

Aos 16, 5 e 14 dias após a eclosão, os exemplares de *P. hartii*, *Brycon sp* e *L. steindachneri*, respectivamente, apresentam características de alevinos e assemelham-se aos adultos (Tabela 1), com desaparecimento completo da nadadeira embrionária e formação das nadadeiras peitorais, pélvicas, caudal, dorsal e anal (Figura 6 B₁, C₁ e D₁). Aos 15 dias após eclosão, os alevinos de *Brycon sp* tiveram $3,75 \pm 0,60$ cm de comprimento total, sendo considerados maior estatisticamente, seguido pelos de *P. hartii* que tiveram $2,72 \pm 0,85$ cm, enquanto os menores foram de *L. steindachneri* que alcançaram $2,4 \pm 0,80$ cm ($P < 0,0001$). Nas espécies estudadas, seções histológicas apontam a origem dos ossos do crânio com formação de ossos dérmicos com placas simples refletidas pela concentração de osteoblastos, e formação de ossos condroides através da diferenciação celular ou da deposição persistente de minerais na cartilagem. Os ossos frontal, nasal, parietal e supra-occipital, por exemplo, são formados pelos ossos dérmicos, de acordo com análises histológicas. Entretanto, os ossos infraorbitais, maxilar, pré-maxilar, quadrado, articular, pré-opérculo, opérculo e subopérculo, são formados de ossos condroides conforme análises histológicas (Figura 6 B₂, C₂ e D₂). Foi observado na microscopia eletrônica de varredura, detalhes da dentição dos peixes em estudo, sendo evidenciada ausência de dentição em *P. hartii*, presença de dentes cônicos em *Brycon sp* e incisiviformes em *L. steindachneri* (Figura 6 B₃, C₃ e D₃).

Figura 6 - Imagens capturadas usando microscópio estereoscópico (1), microscópio de luz (2) e microscópio eletrônico de varredura (3) de pós-larvas de *Brycon sp* (A) com canibalismo intenso (*); alevinos de *P. hartii* (B), de *Brycon sp* (C) e de *L. steindacneri* (D)

Legenda: nota-se a presença de uma estrutura semelhante às alças espirais dos ruminantes no intestino de *P. hartii* (AP), presença de opérculo (OP), olhos (OL), boca (BC), intestino médio e posterior (IM), narina (NA), bexiga natatória (BN), arcos branquiais (AB), nadadeiras peitorais (NP), nadadeira dorsal (ND), nadadeiras pélvicas (NPV), nadadeira anal (NAN), nadadeira adiposa (NAD) e nadadeira caudal (NC).

Tabela 1 - Comparações nas fases do desenvolvimento ontogenético de ovos, embriões, larvas, pós-larvas e alevinos de curimatá (*P. hartii*), piabanha (*Brycon sp*) e piauí (*L. steindachneri*), à temperatura média de 26, 26 e 23 °C, respectivamente

Fases do desenvolvimento ontogenético	Tempo em hora-grau após fecundação		
	<i>P. hartii</i>	<i>Brycon sp. N</i>	<i>L. steindachneri</i>
Hidratação ovocitária	5,2	3,9	3,4
Clivagem – 2 blastômeros	20,8	21,8	21,8
Clivagem – 4 blastômeros	23,4	24,7	24,1
Clivagem – 8 blastômeros	25,8	23,1	25,9
Clivagem – 16 blastômeros	28,3	27,3	28,1
Clivagem – 32 blastômeros	28,6	29,1	30,1
Clivagem – 64 blastômeros	50,7	47,5	50,8
Blastula	55,9	52,0	67,3
Gastrula – Fechamento do blastóporo	79,7	75,8	151,8
Formação do cálice óptico e somitos	240,7	237,9	362,3
Descolamento de cauda do saco vitelino	412,2	405,2	754,25
Eclosão	583,7	572,5	1.146,2
Larvas	1.014,0	1.027,0	1.300,2
Pós-larvas (abertura da boca)	1.674,6	1.671,0	2.158,2
Alevinos (formação das nadadeiras dorsais, pélvicas e anais)	16 dias pós-eclosão	5 dias pós-eclosão	14 dias pós-eclosão

6.5 Expressão de BMP-2

Na fase de segmentação foi identificada forte marcação de BMP-2 no citoplasma dos blastômeros em todas as espécies estudadas (Figura 7 A₁, B₁ e C₁), seguido de controle negativo, por meio de omissão do anticorpo primário (Figura 7 A₂, B₂ e C₂). Também foi registrada expressão de BMP-2 nas fases de blástula nas células da blastoderme (Figura 7 D₁, E₁ e F₁) nas espécies estudadas, seguido de controle negativo sem incubação com anticorpo primário (Figura 7 D₂, E₂ e F₂). Já na fase de gástrula foi observada marcação de BMP-2 nas células do anel embrionário nas camadas do epiblasto e hipoblasto (Figura 7 G₁, H₁ e I₁) em *P. hartii*, *Brycon sp* e *L. steindachneri*, seguido de controle negativo sem incubação com anticorpo primário (Figura 7 G₂, H₂ e I₂).

Na fase embrionária, forte marcação de BMP-2 foi encontrada nas células primordiais, sendo identificada na vesícula óptica, notocorda e somitos (Figura 7 J₁, K₁ e L₁) em *P. hartii*, *Brycon sp* e *L. steindachneri*, seguido de controle negativo sem utilização de anticorpo primário (Figura 7 J₂, K₂ e L₂), sugerindo-se que a BMP-2 participa da organogênese e especificação do tecido embrionário.

Na fase larval de *P. hartii*, *Brycon sp* e *L. steindachneri*, BMP-2 foi identificada na notocorda, no olho, boca, estômago, fígado, intestino médio e posterior (Figura 8 A₁, B₁ e C₁) seguido do controle negativo sem incubação com anticorpo primário (Figura 8 A₂, B₂ e C₂).

Na fase de pós-larva BMP-2 foi identificada nas brânquias, olhos, coração, intestino, bexiga natatória, na musculatura e nas nadadeiras (Figura 8 D₁, E₁ e F₁), seguido pelo controle negativo com omissão do anticorpo primário (Figura 8 D₂, E₂ e F₂).

No entanto, na fase de alevinos, houve forte marcação em todos tecidos já descritos e na formação óssea do peixe, tanto na ossificação dérmica e endocondral no crânio (Figura 8 G₁, H₁ e I₁), seguido pelo controle negativo sem utilização do anticorpo primário (Figura 8 G₂, H₂ e I₂). Foi observada marcação para BMP-2 na formação dos olhos (Figura 8 I₁), na formação da nadadeira peitoral, bexiga natatória e intestino (Figura 8 J₁) e no desenvolvimento do estômago (Figura 8 K₁), seguido pelo controle negativo com omissão do anticorpo primário (Figura 8 I₂, J₂ e K₂). Marcação de BMP-2 não foi observada no tecido cartilaginoso na larvicultura de todas as espécies estudadas.

Houve marcação nos ovos hidratados nas espécies em estudo, sendo representado pela amostra de *L. steindachneri* (Figura 8 L₁), indicando possível armazenamento de transcritos de BMP-2 maternos no zigoto, seguido de controle negativo sem incubação com o anticorpo primário (Figura 8 L₂).

Figura 7 - Expressão imunohistoquímica de BMP-2 na fase de segmentação (A₁, B₁ e C₁), na fase de blástula (D₁, E₁ e F₁), na fase de gástrula (G₁, H₁ e I₁) e na fase embrionária (J₁, K₁ e L₁), ao lado dos respectivos controles negativos sem incubação com anticorpos primários em *P. hartii* (A₂, D₂, G₂ e J₂), em *Brycon sp* (B₂, E₂, H₂ e K₂) e em *L. steindachneri* (C₂, F₂, I₂ e L₂)

Legenda: Nota-se marcação nos blastômeros (A₁, B₁ e C₁), blastoderme (D₁, E₁ e F₁), células do anel embrionário (G₁, H₁ e I₁), notocorda, vesícula óptica e somitos (J₁, K₁ e L₁), em todas as espécies estudadas.

Figura 8 - Expressão imunohistoquímica de BMP-2 na fase de larva (A₁, B₁ e C₁), na fase de pós-larva (D₁, E₁ e F₁), na fase de alevino (G₁, H₁ e I₁), na organogênese (J₁ e K₁) e na fase de ovos hidratados (L₁), ao lado dos respectivos controles negativos sem incubação com anticorpos primários em *P. hartii* (A₂, D₂, G₂ e J₂), em *Brycon sp* (B₂, E₂, H₂ e K₂) e em *L. steindachneri* (C₂, F₂, I₂ e L₂)

Legenda: nota-se marcação na notocorda, fígado, intestino médio e posterior (A₁), olhos, boca e faringe (B₁, C₁, D₁, E₁, F₁, G₁, H₁ e I₁), nadadeira peitoral e bexiga natatória (J₁), estômago (K₁) e blastodisco (L₁).

7 DISCUSSÃO

7.1 Ovos

Exemplares de curimatá (*Prochilodus hartii*), piabanha (*Brycon sp*) e piauí (*Leporinus steindachneri*) produziram ovos pelágicos, não adesivos, esféricos e translúcidos, semelhante à outras espécies do mesmo gênero como em *Prochilodus lineatus* (NINHAUS-SILVEIRA; FORESTI; AZEVEDO, 2006), *Brycon insignis* (ANDRADE-TALMELLI et al., 2001) e *Leporinus friderici* (SANCHES et al., 2001). Quanto à coloração, *P. hartii* apresentou ovos com cor cinza-esverdeada, semelhante relatos de *P. argenteus* que apresentou cor cinza ou verde (NINHAUS-SILVEIRA; FORESTI; AZEVEDO, 2006), sugerindo baixa concentração de carotenoides (BALON, 1985). No entanto, *Brycon sp* apresentou ovos com coloração azul esverdeado, semelhante dados encontrados com *Brycon insignis* na bacia do rio Paraíba do Sul (ANDRADE-TALMELLI et al., 2001). Do mesmo modo, *L. steindachneri* apresentou ovos com coloração marrom, semelhante os dados descritos para *Leporinus piauí* na bacia do rio São Francisco, no qual apresentou coloração parda (SAMPAIO; SATO, 2009). Os ovos das espécies estudadas foram classificados como telolécitos, padrão comum nos peixes teleósteos, e com grande espaço perivitelino após hidratação, conforme relatado por Woynarovich e Horváth (1983).

Os ovos das espécies em estudo, possuem aspecto esférico, com córion liso, sem órgãos adesivos, atingindo 1,0 mm de diâmetro em *P. hartii*, 1,5 mm em *Brycon sp* e 0,96 mm em *L. steindachneri*, semelhante descrições para *Prochilodus costatus* que possui diâmetro de 1,36 mm (NAKATANI et al., 2001) na bacia do São Francisco, *Brycon insignis* com diâmetro de 1,12 mm (ANDRADE-TALMELLI et al., 2001) na bacia do Paraíba do Sul e *Leporinus piauí* com 1,3 mm, na bacia do rio São Francisco (SAMPAIO; SATO, 2009). Nos ovos de *L. steindachneri*, foi encontrado uma micrópila em forma de funil no polo animal do córion, comum na maioria dos peixes teleósteos (GODINHO; GODINHO, 2003).

7.2 Embriogênese

A segmentação ou clivagem nos ovos em estudo foi do tipo meroblástica ou parcial, com a primeira clivagem iniciando com 20,8 hora grau a fecundação (HGF) em *P. hartii*, 21,8 HGF em *Brycon sp* e 22,31 HGF em *L. steindachneri* e a última com 50,7 HGF, 47,5 HGF e 50,8 HGF para *P. hartii*, *Brycon sp* e *L. steindachneri*. Dados semelhantes foram descritos para *Prochilodus lineatus* (NINHAUS-SILVEIRA; FORESTI; AZEVEDO, 2006), *Brycon insignis* (ANDRADE-TALMELLI et al., 2001) e *Leporinus macrocephalus* (REYNALTE-TATAJE; ZANIBONI-FILHO; MUELBERT, 2001) em outras bacias hidrográficas. As clivagens se iniciaram do centro para as bordas do blastodisco, sendo que o número de blastômeros aumentou enquanto ocorreu diminuição do seu tamanho, com formação de tamanhos variados após a quarta divisão e sulcos que marcam as divisões celulares, conforme descrições de CASTELLANI et al. (1994).

A fase de blástula foi caracterizada por apresentar no estágio avançado, uma forma de meia-lua, ocorrendo à identificação da camada sincicial de vitelo ou periblasto nas espécies estudadas, que corresponde a um órgão encontrado apenas em teleósteos com posicionamento de forma extraembrionária conforme descrito por (KIMMEL et al., 1995). O periblasto não contribui para a formação do embrião, sendo importante na quebra do vitelo pela ação de enzimas hidrolíticas, tornando-o disponível para blastoderme (NINHAUS-SILVEIRA; FORESTI; AZEVEDO, 2006). Em *P. hartii*, *Brycon sp* e *L. steindachneri*, a formação do periblasto ocorreu na fase de blástula semelhante ao observado em *Brycon gouldingi* (FAUSTINO; NAKAGHI; NEUMANN., 2011), e foi observada a formação de uma blastocle com espaços irregulares, como descrito para outras espécies de teleósteos (KIMMEL et al., 1995).

A fase de gástrula nos teleósteos geralmente é iniciada com o movimento de epibolia e se completou com o fechamento do blastóporo pela blastoderme (KIMMEL et al., 1995). No presente trabalho, o fechamento do blastóporo foi realizado com 79,7 HGF, 75,8 HGF e 151,8 HGF para *P. hartii*, *Brycon sp* e *L. steindachneri*, sendo as diferenças possivelmente influenciada pela temperatura mais baixa da água durante a incubação dos ovos da última espécie. Foram observados os movimentos morfogênicos nessa fase, sendo predominante a epibolia em todas as espécies estudadas, juntamente com convergência, involução celular (em *Brycon sp*), e invaginação da placa vegetal (em *P. hartii*), conforme descrições para outras espécies de teleósteos (WARGA; KIMMEL, 1990; KIMMEL et al., 1995). Nas espécies

estudadas, os movimentos morfogenéticos originaram o anel embrionário com a formação do epiblasto e hipoblasto, semelhante às descrições para *Danio rerio* (GILBERT, 2000).

A fase de diferenciação das camadas embrionárias, organogênese ou somitogênese ocorreu após o término da epibolia e fechamento do blastóporo, como também descrito em *Leporinus piau* (BORÇATO; BAZOLLI; SATO, 2004) e em *P. lineatus* (NINHAUS-SILVEIRA; FORESTI; AZEVEDO, 2006). Nessa fase foi observado a formação dos somitos, da notocorda, da delimitação intestinal inicial, vesícula óptica, cauda presa, sendo seu término marcado pelo despregamento da cauda do saco vitelino e formação da nadadeira embrionária, que ocorreu com 412,2 HGF, 405,2 HGF e 754,25 HGF em *P. hartii*, *Brycon sp* e *L. steindachneri*, semelhante ao relatado para *P. lineatus* (NINHAUS-SILVEIRA; FORESTI; AZEVEDO, 2006).

7.3 Ontogênese larval

Como na maioria das espécies migradoras, as larvas de *P. hartii*, *Brycon sp* e *L. steindachneri* eclodem com olhos não pigmentados, boca ainda sem movimentos de abertura e sistema digestório indiferenciado. A pigmentação dos olhos e a abertura completa da boca são eventos que ocorrem após a eclosão e estão diretamente relacionados com o início da alimentação exógena (SANCHES et al., 2001). A eclosão ocorreu após 583,7 HGF (23 horas) em *P. hartii*, 572,5 HGF (22 horas) em *Brycon sp* e 1.146,2 HGF (49,5 horas) em *L. steindachneri*. Na microscopia eletrônica de varredura foi observada abertura da boca no estágio larval, entretanto sem completa abertura e diferenciação, conforme descrito por Godinho e Godinho (2003). As larvas recém-eclodidas apresentaram maxilas pouco desenvolvidas, olhos sem pigmentação e saco vitelino grande, cujas características são observadas na maioria das larvas de peixes neotropicais de água doce (NAKATANI et al., 2001). Larvas de *Brycon sp* tiveram um comprimento total médio de 8,8 mm após a eclosão, com valores próximos ao encontrado nos trabalhos de Andrade-Talmelli et al. (2001), trabalhando com *Brycon insignis* na bacia do rio Paraíba do Sul. Já as larvas de *P. hartii* eclodiram com 6,8 mm de comprimento total, semelhante resultados de Galdioli et al. (2002) trabalhando com *P. lineatus*. No entanto, as larvas de *L. steindachneri* eclodiram com 6,2 mm, diferindo das descrições para *L. friderici* que eclodiram com um comprimento padrão de 3,90 mm (SANCHES et al., 2001).

Na fase de pós-larva ou estágio de Kasidoron, foi observada a abertura e diferenciação da boca com 1.674,6 HGF (65 horas) em *P. hartii*, 1.671 HGF (64 horas) em *Brycon sp* e 2.158,2 HGF (94 horas) em *L. steindachneri*, indicando mudança da alimentação endógena para exógena, considerado como o período crítico para o desenvolvimento (NAKATANI et al., 2001). Logo em seguida foi observada a completa absorção do saco vitelino, enchimento da bexiga natatória e completa pigmentação da retina, conforme descrições relatadas para outras espécies similares da bacia do rio São Francisco (GODINHO; GODINHO, 2003). Também foi evidenciado nesse período, a formação dos arcos branquiais e opérculo, transição em que ocorre a mudança da respiração cutânea para branquial, conforme descrito por Hoar e Randall (1988). As pós-larvas de *Brycon sp* apresentaram um comprimento total de 10,85 mm, diferente das descrições para *Brycon orbignyanus* que apresentaram uma média de 7,8 mm (REYNALTE-TATAJE; ZANIBONI-FILHO; ESQUIVEL, 2004). No entanto, as pós-larvas de *P. hartii* apresentaram um comprimento total de 8,7 mm, com valores próximos às descrições para *P. lineatus* que na bacia do rio São Francisco (GODINHO; GODINHO, 2003). Já as pós-larvas de *L. steindachneri* apresentaram um comprimento total de 6,7, com valores diferentes aos descritos para *L. friderici* que apresentaram um comprimento de 9,49 mm em pesquisas realizadas na bacia do rio Paraná (SANCHES et al., 2001).

Aos 1.894,3 HGF (37 horas após eclosão) em *Brycon sp*, houve um canibalismo intenso, semelhante ao que acontece com outras espécies do mesmo gênero, como *Brycon insignis* (ANDRADE-TALMELLI et al., 2001), *Brycon gouldingi* (FAUSTINO; NAKAGHI; NEUMANN, 2011), *Brycon cephalus* (LEONARDO et al., 2008), *Brycon orbignyanus* (REYNALTE-TATAJE; ZANIBONI-FILHO; ESQUIVEL, 2004), *Brycon lundii* (WOYNAROVICH; SATO, 1990), *Brycon amazonicus* (DIAS et al., 2011), além de outras. Nessa fase, as pós-larvas obtiveram uma proporção de 15,16% entre a abertura da boca e o comprimento total, sendo os dados bem próximos dos resultados obtidos com *Brycon orbignyanus* que teve uma proporção de 15,2% (REYNALTE-TATAJE; ZANIBONI-FILHO; ESQUIVEL, 2004), com desenvolvimento de dentes cônicos no sistema bucal.

7.4 Alevinagem

Foi observado o processo de transformação, ontogenia, transição ou alevinagem, em que as pós-larvas são transformadas em peixes juvenis, através do espessamento dérmico da

nadadeira embrionária, formando as nadadeiras dorsal, pélvica, anal e caudal. *Brycon sp* aos 5 dias após eclosão, apresentou todas as nadadeiras formadas, com resultado semelhante aos descritos para *Brycon insignis* na bacia do rio Paraíba do Sul (ANDRADE-TALMELLI et al., 2001). Entretanto, em *P. hartii* essas mudanças só ocorreram com 16 dias após eclosão, semelhante aos resultados descritos na larvicultura de *Prochilodus lineatus* na bacia do rio Paraná (ZANIBONI-FILHO et al., 2009). Em *L. steindachneri*, as alterações foram observadas 12 dias após eclosão, sendo similar ao trabalho descrito para *Leporinus piau* na bacia do rio São Francisco (BORÇATO; BAZZOLI; SATO, 2004).

Aos 15 dias após eclosão, os alevinos de *Brycon sp* alcançaram um comprimento de 3,75 cm, semelhante às descrições de *Brycon insignis* na bacia do rio Paraíba do Sul que tiveram um comprimento de 3,5 cm (ANDRADE-TALMELLI et al., 2001). Já os alevinos de *P. hartii* apresentaram um comprimento médio de 2,72 cm, semelhante às descrições para *P. brevis* que apresentaram um comprimento de 2,8 cm nessa mesma fase (NATAKANI et al., 2001). Os alevinos de *L. steindachneri* apresentaram um comprimento médio de 2,4 cm, sendo semelhante aos resultados descritos para *L. friderici* na bacia do rio Paraná (SANCHES et al., 2001).

Nos alevinos de *P. hartii*, foi observado nessa fase, a presença de uma estrutura no intestino posterior, cujas características assemelham-se anatomicamente com as descrições de uma alça espiral, descrita para ruminantes, sendo descrita na literatura consultada, como “enrodilhamento” (ROTA, 2003).

7.5 Expressão de BMP-2

Na fase de segmentação, BMP-2 foi marcada no citoplasma de 4 blastômeros em *L. steindachneri* e 8 blastômeros em *P. hartii* e *Brycon sp*, similar à marcação realizada nos mesmos estádios para *Oryzias latipes* (HERPIN et al., 2007). Na fase de blástula, marcação foi observada marcação de BMP-2 nas células da blastoderme e na região do periblasto em todas as espécies estudadas, semelhante relatos descritos para *Danio rerio* (HILD et al., 1999) no qual é responsável pela padronização dorso-ventral do embrião. Na fase de gástrula, a expressão de BMP-2 foi observada nas células do anel embrionário, nas camadas do epiblasto e hipoblasto, o que sugere-se o envolvimento na padronização axial, de acordo com relatos

para *Danio rerio* na padronização dorsoventral (KISHIMOTO et al., 1997) e formação do endoderma e mesoderma (NIKAIDO et al., 1999).

Na fase embrionária, houve marcação nas células primordiais na vesícula óptica, notocorda e somitos em exemplares de *P. hartii*, *Brycon sp* e *L. steindachneri*, semelhante resultados encontrados para *Danio rerio* (KISHIMOTO et al., 1997), no qual a expressão de BMP-2 está envolvida com a indução do endoderma e mesoderma embrionário que originarão esses tecidos.

Após a eclosão, as larvas de *P. hartii*, *Brycon sp* e *L. steindachneri* foram identificadas com BMP-2 na formação da notocorda, olho, boca, estômago, fígado e intestino, semelhante às descrições de desenvolvimento larval de *Danio rerio* na formação da notocorda (KISHIMOTO et al., 1997), do olho (ADLER; BELECKY-ADAMS, 2002), estômago (SMITH et al., 2011), fígado (KAN; JUNGHANS; BELMONTE, 2009) e intestino (PYATI et al., 2006).

Na fase de pós-larva, BMP-2 foi expressa nas brânquias, olhos, coração, intestino, bexiga natatória e musculatura, conforme descrito em *Danio rerio* na formação dos olhos (ADLER; BELECKY-ADAMS, 2002), coração (BRAND, 2003), intestino (PYATI et al., 2006), bexiga natatória (FEINER et al., 2009) e diversos tecidos conjuntivos de preenchimento, músculos e nadadeiras (LAFOREST et al., 1998). Entretanto, na presente revisão, somente foram encontrados trabalhos envolvendo a participação de BMP-2 na formação de brânquias de *Xenopus laevis* (GILLIS; DAHN; SHUBIN, 2009) durante a ontogenia. Não foi observada marcação de BMP-2 em algumas áreas do tecido cartilaginoso nas espécies estudadas, possivelmente devido às ações de outras proteínas, como BMP-4 e BMP-7 que atuam no crescimento e reparo desse tecido em mamíferos (YANG et al., 2009).

Na alevinagem, *P. hartii*, *Brycon sp* e *L. steindachneri* exibiram marcação para BMP-2 na formação dos tecidos citados anteriormente e na ossificação dérmica e endocondral no corpo em desenvolvimento, semelhante descrições da participação dessa molécula na formação óssea de *Sparus aurata* (RAFAEL; LAIZÉ; CANCELA, 2006).

Foi observada uma marcação para BMP-2 nos ovos hidratados das espécies estudadas, representado pela amostra de *L. steindachneri*, o que pode ser explicado pelo possível armazenamento de transcritos desta proteína no zigoto, originado da expressão maternal no ovário, semelhante aos trabalhos descritos para *Xenopus sp* (HEMMATI-BRIVANLOU; THOMSEN, 1995).

8 CONCLUSÕES

Com base nas observações realizadas durante a elaboração deste estudo, conclui-se que houve diferenças no desenvolvimento ontogenético de *Prochilodus hartii*, *Brycon sp* e *Leporinus steindachneri* na desova induzida no rio Pardo. A temperatura mais baixa influenciou o desenvolvimento embrionário e larval de *L. steindachneri* que apresentou retardo no desenvolvimento. *Brycon sp* apresentou canibalismo intenso após abertura da boca, na fase de pós-larva, enquanto na fase de alevinagem de *P. hartii*, foi encontrado a formação de estruturas semelhante às alças espirais dos ruminantes no intestino médio. Os ovos, larvas, pós-larvas e alevinos foram maiores nas amostras de *Brycon sp*, seguido por *P. hartii* e menores de *L. steindachneri*. Em todas as espécies estudadas, BMP-2 foi identificada nas fases de ovos no blastodisco; na fase de clivagem nos blastômeros; na fase de blástula e gástrula na blastoderme; na fase de embriões na notocorda, vesícula óptica e somitos; na fase larval na notocorda, olhos, boca, estômago, fígado e intestino; na fase de pós-larvas nas brânquias, olhos, coração, intestino, bexiga natatória e tecidos conjuntivos; e na fase de alevinos, em todos tecidos já descritos e na formação óssea, sendo identificada tanto na ossificação dérmica quanto na endocondral.

Capítulo 2

**Anatomia funcional comparativa dos sistemas
digestório, reprodutor e esquelético de tês
Caraciformes da bacia do rio Pardo**

RESUMO

Objetivou-se com este trabalho, fazer uma comparação da anatomia dos sistemas digestório, reprodutor e esquelético de exemplares de curimbatá (*Prochilodus hartii*), piabanha (*Brycon sp*) e piauí (*Leporinus steindachneri*), peixes nativos do rio Pardo, capturados na Estação de Piscicultura de Machado Mineiro, município de Águas Vermelhas/MG. Os animais foram sacrificados, realizada a biometria e dissecados para mensuração dos órgãos internos e documentação fotográfica. Fragmentos das gônadas foram coletados e fixados em solução de Bouin por 12 horas, conservados em etanol 70% e incluídos em parafina para preparação de lâminas histológicas. Para montagem dos esqueletos, foi utilizada a técnica de maceração com besouros dermestídeos em caixas plásticas, durante 4 a 6 meses. O índice gonadosomático médio encontrado em fêmeas e machos foi de 18,17% e 1,1% em *P. hartii*, 12,43% e 0,72% em *Brycon sp*, 7,58% e 0,66% em *L. steindachneri*. O coeficiente intestinal para fêmeas e machos, foi de 4,36 e 3,59 em *P. hartii*, 0,96 e 0,89 em *Brycon sp*, 1,12 e 0,99 em *L. steindachneri*. O estômago de *P. hartii* tem forma de “U” com presença de uma estrutura semelhante a uma moela, enquanto em *Brycon sp* tem forma de “J” com presença de cecos pilóricos aderidos no piloro e em *L. steindachneri* possui forma de “Y” sem presença de cecos pilóricos. Foram observadas diferenças entre números de ossos, sendo interessante descrever que em *P. hartii* foram encontrados 4 ossos infraorbitais, 6 em *Brycon sp* e 4 em *L. steindachneri*. Houve diferenças na comparação das gônadas dos reprodutores, sendo observados testículos com coloração avermelhada, branca e rosa, enquanto os ovários apresentaram coloração verde-acinzentada, verde-azulada e amarelo palha nos exemplares de *P. hartii*, *Brycon sp* e *L. steindachneri*, respectivamente. Conclui-se que os exemplares de *P. hartii* possuem hábito alimentar iliófago, enquanto *Brycon sp* e *L. steindachneri* possuem hábito alimentar onívoro pelas características anatômicas e biométricas, apresentando diferenças no sistema reprodutor e esquelético.

Palavras-chave: Anatomia funcional. Morfometria. Teleósteos. Osteologia.

ABSTRACT

The aim of this study is to compare the anatomy of digestive, reproductive and skeletal system of Curimbata (*Prochilodus hartii*), Piabanha (*Brycon sp*) and Piau (*Leporinus steindachneri*), native fish of the Pardo River, caught in Fishing Station of Machado Mineiro, county of Aguas Vermelhas/MG, Brazil. Animals were sacrificed, dissected and had their biometrics taken to measure the internal organs and photo documentation. Fragments of the gonads were collected and fixed in Bouin's solution for 12 hours, preserved in 70% ethanol and embedded in paraffin for preparation of histological sections. For assembling the skeletons, a retting technique with *Dermestides* beetles was used. The gonadosomatic index average found in females and males was 18.17% and 1.1% in *P. hartii*, 12.43% and 0.72% in *Brycon sp*, 7.58% and 0.66% in *L. steindachneri*. The intestinal coefficient for females and males, was 4.36 and 3.59 in *P. hartii*, 0.96 and 0.89 in *Brycon sp*, 1.12 and 0.99 in *L. steindachneri*. The stomach of *P. hartii* presented as a "U" shape with the presence of a structure similar to a gizzard, whereas in *Brycon sp*, it is showed a "J"-like shape with the presence of pyloric caeca and in *L. steindachneri* it present as a "Y"-form without, the presence of pyloric caeca. Differences were observed between the numbers of bones, and it is worthwhile to point out that regarding infraorbital bones, 4 were found in *P. hartii*, 6 in *Brycon sp* and 4 in *L. steindachneri*. There were differences in the comparison of the gonads of breeding, being observed testis with reddish, white and pink, while the ovaries showed greenish-gray, blue-green and yellow straw in specimens of *P. hartii*, *Brycon sp* and *L. steindachneri*, respectively. It is concluded that the specimens of *P. hartii* have iliophagus eating habits while *Brycon sp* and *L. steindachneri* have omnivorous eating habits by anatomic and biometric characteristics, with differences in the reproductive system and skeletal.

Keywords: Functional anatomy. Morphology. Teleost. Osteology.

9 INTRODUÇÃO

O Pardo é um rio federal, que nasce na região norte de Minas Gerais e deságua no litoral sul da Bahia, sendo considerada sua ictiofauna, ainda muito pouco conhecida, e com carência de dados na literatura científica envolvendo estudos ictiológicos e reprodutivos (MEIRELES et al., 2011).

Anatomia funcional é o ramo da anatomia que relaciona a estrutura com suas funções, também chamada de anatomia dos sistemas construtivos ou mesoscópica (FREITAS, 2004), no entanto, poucos são os estudos envolvendo a anatomia de peixes neotropicais, sendo destacados apenas os trabalhos aplicados ao sistema digestório e estudos de hábito alimentar e adaptações tróficas (MENIN; MIMURA, 1993; SEIXAS-FILHO et al., 2000; MACIEL et al., 2009; RODRIGUES; NAVARRO; MENIN, 2008).

Considerando a grande diversidade das espécies de peixes e a consequente diferenciação morfofisiológica, ressalta-se a importância do conhecimento da morfologia do tubo digestório dos peixes, por ser muito variável, podendo ser relacionada com a diversidade dos regimes alimentares e o modo de vida (RODRIGUES, NAVARRO; MENIN, 2008), sendo que as características anatômicas podem ter uma estreita dependência com a natureza dos alimentos, características do habitat, estágio de desenvolvimento do indivíduo e variações no ciclo ontogenético do indivíduo (SEIXAS-FILHO et al., 2000).

O intestino dos peixes é classicamente dividido, baseado em critérios anatômicos e histológicos por BÈRTIN (1958), em intestino cefálico (compreendendo a cavidade buco-faringeana), intestino anterior (compreendendo esôfago e estômago), intestino médio (com intestino propriamente dito) e intestino posterior (compreendendo o reto). Sabe-se que o intestino dos Teleostei apresenta numerosas variações específicas, em especial no que se refere à estrutura anatômica e ao comprimento (MENIN; MIMURA, 1993). O formato do estômago dos peixes pode classificar o hábito alimentar das espécies, sendo que nos carnívoros ictiófagos é longo e reto, enquanto nos onívoros é em “Y” ou “J” e nos iliófagos existe uma estrutura semelhante a uma moela (ROTTA, 2003). De acordo com BÈRTIN (1958), o coeficiente intestinal varia com o hábito alimentar dos peixes, sendo que nos carnívoros, está compreendido entre 0,2 e 2,5; nos onívoros, entre 0,6 e 8,0; e nos herbívoros, entre 0,8 e 15,0.

O fígado de peixes se apresenta, como um órgão chave, o qual controla muitas funções vitais e tem papel importante na fisiologia do animal (DE LULIIS; PULERÀ, 2007). Na

maioria das espécies de teleósteos, está geralmente dividido em três lobos hepáticos, porém em alguns peixes podem apresentar variações de lobação (BOMBONATO et al., 2007). O índice hepatossomático (percentual do fígado em relação ao peso corporal) tem sido utilizado em alguns trabalhos como indicador do período reprodutivo, correlacionando-se com outros fatores como o índice gonadossomático (QUEROL et al., 2002). Esse índice pode estar relacionado com a mobilização das reservas energéticas necessária para o processo de vitelogênese e/ou reprodução (BARBIERI; HARTZ; VERANI, 1996).

Os ovários dos peixes teleósteos geralmente são pares, de igual tamanho, formando um oviduto que desemboca no poro urogenital, posterior ao ânus (DE LULIIS; PULERÀ, 2007). São localizados na cavidade celomática, presos à linha sagital mediana por um curto mesovário, dorsalmente ao intestino, sendo que o tamanho, peso e coloração podem sofrer variações com o estágio de desenvolvimento e diferenças entre as espécies (GANECO et al., 2001).

Observações nos testículos de peixes tem revelado que a maioria dos teleósteos apresenta a gônada masculina par, com ductos espermáticos separados que desembocam no poro urogenital (DE LULIIS; PULERÀ, 2007). Semelhante aos ovários, os testículos podem sofrer variações de tamanho, peso e coloração com o estágio de desenvolvimento e diferenças entre as espécies (ALEXANDRINO et al., 1985).

Ao longo do ciclo reprodutivo dos peixes, modificações marcantes podem ser observadas em suas gônadas, no que diz respeito ao peso, decorrente do acúmulo de material de reserva nas gônadas em maturação (GANECO et al., 2001). Como indicativo do estado funcional das gônadas, frequentemente tem-se reportado ao índice gonadossomático, uma vez que expressa a porcentagem que os órgãos reprodutivos representam do peso corporal dos indivíduos (COSTA et al., 2005).

O esqueleto dos peixes, como de outros vertebrados, pode ser dividido em duas partes: esqueleto axial (do grego *axon*, eixo), constituído pelo crânio e pela coluna vertebral, e esqueleto apendicular, constituído pelos elementos de sustentação das nadadeiras (CARDEIRA et al., 2012). Estudos da morfologia óssea constitui uma etapa importante em estudos ictiológicos, sendo importante a caracterização dos ossos do crânio e diferenciação dos caracteres ósseos das espinhas (BEMVENUTI, 2005) são bastante empregados na diferenciação das espécies. Os ossos do crânio dos peixes são formados muitas vezes, por elementos dérmicos (bem como elementos endocondrais) formando um crânio bastante complexo (DE LULIIS; PULERÀ, 2007) variando entre as espécies. A coluna vertebral dos peixes é formada por vértebras articuladas, constituídas por uma região central compacta e

por um anel dorsal onde se aloja a medula espinhal, apresentando projeções como as espinhas neurais, espinhas hemais e costelas, que apresentam variações entre as espécies (BEMVENUTTI, 2005).

O objetivo do presente trabalho foi de estudar comparativamente a anatomia do sistema digestório, reprodutor e esquelético dos peixes curimbatá (*Prochilodus hartii*), piabanha (*Brycon sp*) e piau (*Leporinus steindachneri*), nativos do rio Pardo, relacionando com o hábito alimentar e fornecendo contribuições para estudos anatômicos dessas espécies ainda pouco conhecidas.

10 MATERIAL E MÉTODOS

10.1 Amostragem

Para estudo da anatomia funcional, seis exemplares de curimbatá (*Prochilodus hartii*), seis de piabanha (*Brycon sp*) e seis de piau (*Leporinus steindachneri*) capturados no rio Pardo e mantidos em cativeiro na Estação de Piscicultura de Machado Mineiro no município de Águas Vermelhas/MG, foram eutanaziados com hidrocloreto de benzocaína (200 mg/L de água), de acordo com Resolução do CFMV nº 714 (2002) e identificados.

10.2 Dissecção e biometria

Seis exemplares (três machos e três fêmeas) das espécies descritas foram dissecados por perfusão com solução aquosa de formalina 4% v/v e, para a preservação dos órgãos, foi realizada uma incisão longitudinal ventral, da região gular até próximo ao ânus, ficando, assim, os órgãos expostos à solução fixadora. Foi considerada a divisão do tubo digestório de acordo com Bèrtin (1958), correspondendo, então, o intestino propriamente dito ao intestino médio e o último segmento, ao intestino posterior. Em seguida foi realizada uma biometria do peso corporal e do comprimento padrão, peso da gônada, peso do fígado, comprimento do intestino, diâmetro intestinal, comprimento e diâmetro do estômago. Para isso foram

utilizadas réguas de 30 e 60 cm, balança analítica de precisão (Toledo, Brasil), balança digital KC-01 5 kg (Western, China) e paquímetro digital 150 mm (Western, China).

Imagens dos órgãos foram adquiridos utilizando câmera digital EasyShare P880 (Kodak, Estados Unidos da América) e então capturadas com auxílio do software Adobe Photoshop CS versão 8.0.1 para Windows (2003).

Foram calculados alguns parâmetros biológicos, a partir da mensuração dos dados biométricos, como o coeficiente intestinal (comprimento total do intestino/comprimento padrão), índice gonadossomático (peso da gônada/peso corporal x 100) e índice hepatossomático (peso do fígado/peso corporal x 100).

O peso da desova foi conseguido após aplicação de três doses de Extrato 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 na Estação de Piscicultura de Machado Mineiro, e então coletado a desova a seco com auxílio de um béquer, sendo pesado com auxílio de uma balança digital (Filizola, Brasil) e descontado o valor do recipiente.

10.3 Histologia das gônadas

Amostras das gônadas (testículos e ovários) foram coletadas e fixadas em solução de Bouin durante 12 horas, conservados em etanol 70% e incluídos em parafina, seccionadas em série com 5 µm de espessura e coradas com hematoxilina/eosina, conforme técnicas histológicas de rotina. Posteriormente, imagens foram capturadas através do Microscópio de luz Olympus BX3, acoplado à câmera AxioCam HCr com software de captura AxioVision/Olympus do Laboratório de Anatomia Microscópica e Imunohistoquímica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

10.4 Maceração e montagem dos esqueletos

Para estudo dos ossos do esqueleto dos peixes, em três exemplares de cada espécie foi realizada a técnica de maceração com a utilização de besouros do gênero *Dermestis* para consumir os tecidos, mantendo apenas as estruturas esqueléticas. Para isso, foram retiradas as

escamas, vísceras, olhos e parte da musculatura dos peixes, sendo conservados em etanol 70% e transportados para o Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo. Em seguida foram secos à temperatura ambiente por 24 horas e posteriormente, acondicionados em caixas plásticas contendo mechas de algodão, besouros e larvas de insetos dermestídeos, sendo controlada a umidade e temperatura. Os peixes ficaram durante 4 a 6 meses para maceração, sendo adicionados à coleção da referida instituição.

Imagens dos esqueletos foram adquiridos utilizando câmera digital EasyShare P880 (Kodak, Estados Unidos da América) e Canon G2 (Canon, Estados Unidos da América), e então capturadas com auxílio do software Adobe Photoshop CS5 versão 8.0.1 para Windows (2003).

10.5 Análises estatísticas

Todos os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão e submetidos à análise de variância ANOVA e ao teste de Tukey com 5% de significância, utilizando o software GraphPad Prism versão 5.00 para Windows (2007).

11 RESULTADOS

11.1 Biometria

Os resultados biométricos mostram que o peso corporal e comprimento padrão das fêmeas de curimbatá (*Prochilodus hartii*) e piabanha (*Brycon sp*) foram maiores que os machos, exceto nos exemplares de piauí (*Leporinus steindachneri*), cujos machos foram maiores.

Nas fêmeas, o comprimento padrão, peso das gônadas, peso das vísceras, peso do fígado, comprimento do intestino médio e coeficiente intestinal foram maiores estatisticamente nos exemplares de *P. hartii*, e não tiveram diferenças em *Brycon sp* e *L. steindachneri*. O peso corporal nas fêmeas foi numericamente maior nos exemplares de *P.*

hartii, seguido de *L. steindachneri* e sendo menor em *Brycon sp.* O índice gonadossomático (IGS) nas fêmeas tiveram valores elevados nos exemplares de *P. hartii*, seguido de *Brycon sp* e com menores valores em *L. steindachneri*. Já o comprimento do estômago apresentou valores maiores nos exemplares de *P. hartii* e *L. steindachneri* (sem diferenças estatísticas) e menores em *Brycon sp.* Entretanto o índice hepatossomático (IHS), largura do intestino, largura do estômago e peso da desova em todas as fêmeas, não tiveram diferenças estatísticas (Tabela 2).

Nos machos, o peso corporal, comprimento padrão, peso das vísceras, largura do intestino e comprimento do estômago foram maiores nos exemplares de *P. hartii* e *L. steindachneri*, e menores em *Brycon sp.* O IGS, comprimento do intestino e coeficiente intestinal em machos, foi maior nos exemplares de *P. hartii* e menor em *Brycon sp* e *L. steindachneri*, sem diferenças estatísticas nos últimos. O peso do fígado foi maior nos exemplares machos de *P. hartii* e *Brycon sp*, e menor em *L. steindachneri*. Entretanto, o IHS e largura do estômago, não houve diferenças estatísticas em todos os machos (Tabela 3).

11.2 ANATOMIA E HISTOLOGIA DAS GÔNADAS

Os ovários das espécies estudadas apresentaram estruturas pares, alongadas, situadas dorsalmente na cavidade celomática, relacionadas lateralmente com a bexiga natatória e separadas entre si, fusionando-se em sua parte caudal, nas proximidades do poro genital. No entanto, houve variações no aspecto dos ovários, sendo que apresentaram uma coloração verde-acinzentada em *P. hartii*, verde-azulada em *Brycon sp* e amarelo-palha em *L. steindachneri* (Figura 9 A, C e E).

Os testículos das espécies estudadas são órgãos pares, alongados e cordonais, situados na cavidade celomática, lateroventralmente à bexiga natatória, à qual se prendem por meio do mesórquio que os liga também à parede corporal. Os testículos convergem uns para os outros na extremidade caudal e seus curtos ductos espermáticos extratesticulares se unem próximo do orifício urogenital. No entanto os testículos apresentaram coloração avermelhada em *P. hartii*, branca em *Brycon sp* e rosa em *L. steindachneri* (Figura 9 B, D e F).

Histologicamente, ovários das três espécies são revestidos pela túnica albugínea que emite septos para o interior do órgão formando lamelas ovulíferas contendo ovócitos em diferentes fases de desenvolvimento. No presente trabalho foram coletados apenas exemplares

no período reprodutivo, onde foram encontrados ovócitos vitelogênicos em maioria e ovócitos perinucleolares avançados em todas as fêmeas. No exemplar de *L. steindachneri* foi encontrado um folículo pós-ovulatório, indicando a desova e sucesso reprodutivo (Figura 10 A, C e E).

Os testículos das espécies estudadas, quanto aos aspectos histológicos, são alongados e envoltos por uma túnica albugínea de natureza conjuntiva que emite septos para o interior das franjas formando lóbulos preenchidos com túbulos seminíferos contendo cistos de células espermatogênicas. A parede dos cistos é formada por prolongamentos citoplasmáticos das células de sustentação ou células de Sertoli. Nos testículos, as espermatogônias distribuem-se em toda extensão dos túbulos seminíferos, os quais se conectam formando anastomoses que convergem para o ducto espermático (Figura 10 B, D e F).

Figura 9 - Fotografias de ovários (OV) e testículos (TC) de exemplares adultos de *P. hartii* (A e B), de *Brycon sp* (C e D) e de *L. steindachneri* (E e F), respectivamente.

Legenda: nota-se uma coloração verde-acinzentada, verde-azulada e amarelo palha nos ovários e coloração avermelhada, branca e rosa nos testículos de *P. hartii*, *Brycon sp* e *L. steindachneri*, respectivamente.

Figura 10 - Fotomicrografias de ovários e testículos de exemplares adultos de *P. hartii* (A e B), de *Brycon sp* (C e D) e de *L. steindachneri* (E e F), respectivamente

Legenda: nota-se a presença de ovócitos vitelogênicos (OVT) e de ovócitos perinucleolares avançados em todas fêmeas (OPN), presença de folículo pós-ovulatório (FPO) na fêmea de *L. steindachneri*, lume dos túbulos seminíferos repletos de espermatozoides nos testículos de *P. hartii* e *L. steindachneri* (TS) e ducto espermático repleto de espermatozoide no testículo de *Brycon sp* (DE).

11.3 Anatomia funcional do sistema digestório

Os estômagos das espécies estudadas estão presentes no intestino anterior, sendo que variaram em formato e presença de estruturas, sendo em forma de “U” com presença de uma estrutura muscular semelhante a uma moela em *P. hartii*, em forma de “J” com presença de cecos pilóricos aderidos no intestino médio de *Brycon sp* e em forma de “Y” sem a presença de cecos pilóricos em *L. steindachneri* (Figura 11 A, C e E).

Os intestinos médios (propriamente ditos) neste estudo apresentaram diferenças em estrutura e tamanho, sendo presente uma estrutura semelhante anatomicamente às alças espirais dos ruminantes em *P. hartii*, reto com presença de cecos pilóricos em *Brycon sp* e em forma de “N” sem presença de cecos pilóricos em *L. steindachneri*.

Os fígados das três espécies utilizadas neste estudo apresentaram três lobos e vesícula biliar (Figura 11 B, D e F), sendo classificados como lobo esquerdo, lobo direito e lobo central.

11.4 Osteologia

No esqueleto das espécies estudadas, foram evidenciados numerosos elementos de ossos dérmicos, bem como elementos endocondrais, formando um crânio bastante complexo. Uma série de ossos rodeia e ajuda a formar a órbita, como o frontal, lacrimal (também chamado de antorbital), pré-frontal e infraorbitais. Existe uma variação no número de ossos infraorbitais, sendo quatro nos exemplares de *L. steindachneri*, seis nos exemplares de *Brycon sp* e quatro nos exemplares de *P. hartii*. Foi identificada uma fontanela cranial ampla em todas as espécies estudadas, que é um espaço entre os ossos etmoides, frontais, parietais até quase a parte posterior dos supraoccipitais, cobertos por uma membrana na parte superior do crânio.

Figura 11 - Fotografias do estômago (EST), intestino médio (IM) e fígado de exemplares adultos de *P. hartii* (A e B), de *Brycon sp* (C e D) e de *L. steindachneri* (E e F)

Legenda: nota-se a presença de uma estrutura semelhante a uma moela (ML) no estômago e presença de uma estrutura semelhante às alças espirais dos ruminantes (AP) no intestino médio (IM) de *P. hartii*, e também, presença de cecos pilóricos (CP) no intestino médio de *Brycon sp*. O formato do estômago é em “U”, em forma de “J” com presença de cecos pilóricos e em forma de “Y” sem cecos pilóricos nos exemplares de *P. hartii*, *Brycon sp* e *L. steindachneri*, respectivamente. O fígado de todos os exemplares apresenta três lobos hepáticos e vesícula biliar (>).

O osso maxilar é um osso desdentado (exceto em *Brycon sp* que possui uma fileira com 10 pequenos dentes tricuspidados) que articula com o lacrimal (antorbital), sendo sua extremidade posterior alargada, não fazendo parte da boca. No entanto, o osso pré-maxilar tem três fileiras com 8 dentes cuspidados em *Brycon sp* e uma fileira com 6 dentes incisiviformes em *L. steindachneri* na sua superfície anteroventral. Entretanto, nos exemplares de *P. hartii* não foi observada presença de dentes no pré-maxilar. O osso pré-maxilar está localizado na parte mais anterior do crânio, articulando-se com o pré-maxilar do antímero oposto, e posteriormente com o nasal e maxila.

Uma série de três ossos principais, situado entre a órbita e o pré-opérculo, são os ossos hiomandibular, metapterigóide e quadrado, que contribuem para formar o *suspensorium*, o aparelho que suporta as mandíbulas sobre o restante do crânio. O hiomandibular e metapterigóide apoiam o quadrado, que faz a articulação com a mandíbula. A mandíbula é formada por três ossos, o osso articular (que articula com o quadrado), o osso angular (que é bem pequeno nas espécies em estudo) e o osso dentário que possui 4 dentes tricuspidados nos exemplares de *Brycon sp* e 3 dentes incisiviformes nos exemplares de *L. steindachneri*. Entretanto, não foi observada presença de dentes no pré-maxilar de exemplares de *P. hartii*.

Os ossos operculares são formados por quatro ossos: opérculo, pré-opérculo, sub-opérculo e infra-opérculo. O opérculo é uma grande placa óssea triangular localizada na região da faringe, que recobre as brânquias. O pré-opérculo é um osso em forma de “L” localizado anteriormente nas três espécies em estudo. No entanto, o sub-opérculo está localizado posterior e ventral ao opérculo, e o infra-opérculo está localizado ventralmente ao opérculo em todas as espécies estudadas.

O esqueleto de *P. hartii* é constituído por 37 vértebras, enquanto de *Brycon sp* é formado por 35 vértebras e de *L. steindachneri* é formado por 32 vértebras, sendo contadas a partir da primeira vértebra do aparelho de Weber até o uróstilo. No esqueleto das espécies, as vértebras apresentaram projeções ventrais pontiagudas, as costelas, no qual envolvem a cavidade celomática, sustentando a parede do corpo e protegendo os órgãos internos, além das espinhas neurais (localizadas dorsalmente) e hemais (localizadas ventralmente) no qual foram encontradas em todas as espécies estudadas. Nos exemplares de *P. hartii* foram identificadas 18 pares de costelas, enquanto em *Brycon sp* foram identificadas 17 pares e em *L. steindachneri* foram encontradas 16 pares. As nadadeiras peitorais das três espécies estudadas são fixadas ao corpo pelos ossos procoracóide, escápula e ossos radiais. Já as nadadeiras pélvicas, o osso basipterígio é o principal elemento de sustentação, enquanto as nadadeiras

dorsal e anal são fixadas através da articulação entre os processos interneurais ou hemais e os pterigióforos.

Nas espécies estudadas, as nadadeiras dorsais são suportadas por finos e alongados raios, que são ossificados e apoiados em uma base por um pterigióforo, que é um elemento ósseo localizado ventralmente. A ponta de um pterigióforo estende ventralmente para o tecido conjuntivo entre as espinha neurais. Foi notado que a série de pterigióforos é contínua, estendendo-se por todo o trajeto ao longo do dorso e entre as nadadeiras dorsais das espécies em estudo. Exemplares de *P. hartii* foram encontrados 15 pterigióforos, 10 pterigióforos em *Brycon sp* e 11 pterigióforos em *L. steindachneri* na fixação da nadadeira dorsal.

As nadadeiras anais também são apoiadas por pterigióforos, mas dorsalmente, diferindo das nadadeiras dorsais. Os dois pterigióforos anteriores são elementos ósseos maiores que estendem-se dorsalmente para anexar as costelas ventrais. Posterior a este ponto de fixação, começa a se formar uma série de espinhas hemais. Foram identificados 10 pterigióforos em *P. hartii*, 18 pterigióforos em *Brycon sp* e 10 pterigióforos em *L. steindachneri* para fixação da nadadeira anal.

A nadadeira caudal é suportada por raios moles que formam um arranjo constituindo uma nadadeira tipo homocerca. Este tipo de nadadeira exibe uma simetria, estendendo-se posteriormente a partir da coluna vertebral. As espinhas uroneurais e hipurais, estão achatadas após a última vertebra caudal e fornece apoio para os raios da nadadeira caudal em *P. hartii* (Figura 12 A e B), *Brycon sp* (Figura 12 C e D) e *L. steindachneri* (Figura 12 E e F). As nadadeiras adiposas das três espécies estudadas não apresentaram raios e pterigióforos.

Figura 12 - Fotografias do esqueleto apendicular e axial de *P. hartii* (A e B), de *Brycon* sp (C e D) e *L. steindachneri* (E e F)

Legendas: a) Esqueleto axial – 1- O. pré-maxilar, 2- O. maxilar, 3- O. dentário, 4- O. quadrado, 5- O. articular, 6- O. supraorbital, 7- O. lacrimal (antorbital), 8- O. infraorbital I, 9- O. infraorbital II, 10- O. infraorbital III, 11- O. infraorbital IV, 12- O. infraorbital V, 13- O. infraorbital VI, 14- O. frontal, 15- O. parietal, 16- O. supra-occipital, 17- O. esfenótico, 18- O. nasal, 19- O. etmóide, 20- fontanela cranial, 21- O. pré-opérculo, 22- O. opérculo, 23- O. sub-opérculo; V- vértebras, H- hipural, E- espinha neural, C- costela, HE- espinha hemal; b) Esqueleto apendicular: P- raios das nadadeiras pélvicas, D- raios da nadadeira dorsal, Rc- raios da nadadeira caudal, Rp- raios das nadadeiras peitorais, Ra- raios da nadadeira anal, Pt- pterigióforos, B- basipterígio, Pc- procoracóide, Cl- cleitro.

Tabela 2 - Comparações dos parâmetros biológicos de fêmeas de *P. hartii*, *Brycon sp* e *L. steindachneri*, capturadas no rio Pardo, utilizadas na reprodução no período de janeiro 2011 e janeiro 2012 na Estação de Piscicultura de Machado Mineiro (média $\pm$ desvio padrão)

Parâmetros biológicos	<i>P. hartii</i>	<i>Brycon sp</i>	<i>L. steindachneri</i>
Número de animais	3	3	3
Peso corporal (g)	949 $\pm$ 267,29 a	278 $\pm$ 52,33 b	355 $\pm$ 9,90 ab
Comprimento padrão (cm)	36 $\pm$ 5,66 a	24 $\pm$ 1,41 b	25,4 $\pm$ 0,71 b
Peso da gônada (g)	173 $\pm$ 52,33 a	34,5 $\pm$ 5,66 b	26,85 $\pm$ 5,45 b
Índice gonadossomático (%)	18,17 $\pm$ 0,40 a	12,43 $\pm$ 0,30 b	7,58 $\pm$ 1,75 c
Peso das vísceras (g)	66 $\pm$ 4,24 a	6,5 $\pm$ 0,71 b	21 $\pm$ 5,66 b
Peso do fígado (g)	11 $\pm$ 2,83 a	2,23 $\pm$ 0,32 b	3,5 $\pm$ 0,71 b
Índice hepatossomático (%)	1,16 $\pm$ 0,03 a	0,89 $\pm$ 0,08 a	0,99 $\pm$ 0,23 a
Comprimento do intestino (cm)	156,5 $\pm$ 19,09 a	23 $\pm$ 4,24 b	28,5 $\pm$ 3,54 b
Largura do intestino (mm)	3,09 $\pm$ 1,10 a	2,83 $\pm$ 0,07 a	1,89 $\pm$ 0,85 a
Coefficiente intestinal	4,36 $\pm$ 0,16 a	0,96 $\pm$ 0,12 b	1,12 $\pm$ 0,17 b
Comprimento do estômago (mm)	73,81 $\pm$ 6,3 a	21,52 $\pm$ 3,43 b	57,99 $\pm$ 12,42 a
Largura do estômago (mm)	13,74 $\pm$ 0,42 a	8,88 $\pm$ 0,16 a	8,04 $\pm$ 4,26 a
Peso da desova (g)	135,78 $\pm$ 31,63 a	97,15 $\pm$ 30,5 a	113,5 $\pm$ 33,8 a

Valores seguidos de letras diferentes na mesma linha são diferentes estatisticamente (P<0,05).

Tabela 3 - Comparações dos parâmetros biológicos de machos de *P. hartii*, *Brycon sp* e *L. steindachneri*, capturadas no rio Pardo, utilizados na reprodução no período de janeiro 2011 e janeiro 2012 na Estação de Piscicultura de Machado Mineiro (média $\pm$ desvio padrão)

Parâmetros biológicos	<i>P. hartii</i>	<i>Brycon sp</i>	<i>L. steindachneri</i>
Número de animais	3	3	3
Peso corporal (g)	644 $\pm$ 96,17 a	201 $\pm$ 49,50 b	671 $\pm$ 144,25 a
Comprimento padrão (cm)	31,75 $\pm$ 1,01 a	22 $\pm$ 1,41 b	29,5 $\pm$ 2,12 a
Peso da gônada (g)	7,5 $\pm$ 2,12 a	1,45 $\pm$ 0,07 b	4,55 $\pm$ 0,21 ab
Índice gonadossomático (%)	1,15 $\pm$ 0,16 a	0,72 $\pm$ 0,18 b	0,66 $\pm$ 0,11 b
Peso das vísceras (g)	37,5 $\pm$ 4,95 a	6,5 $\pm$ 0,71 b	46 $\pm$ 18,38 a
Peso do fígado (g)	6,41 $\pm$ 0,14 a	3,2 $\pm$ 0,28 a	10 $\pm$ 1,41 b
Índice hepatossomático (%)	0,94 $\pm$ 0,14 a	1,54 $\pm$ 0,38 a	1,5 $\pm$ 0,11 a
Comprimento do intestino (cm)	114 $\pm$ 5,66 a	19,5 $\pm$ 0,71 b	29,5 $\pm$ 4,95 b
Largura do intestino (mm)	3,52 $\pm$ 0,47 a	2,03 $\pm$ 0,48 b	3,31 $\pm$ 0,47 a
Coefficiente intestinal	3,59 $\pm$ 0,06 a	0,89 $\pm$ 0,08 b	0,99 $\pm$ 0,09 b
Comprimento do estômago (mm)	57,31 $\pm$ 3,28 a	14,43 $\pm$ 2,30 b	44,73 $\pm$ 6,34 a
Largura do estômago (mm)	10,35 $\pm$ 0,56 a	5,47 $\pm$ 1,31 a	7,52 $\pm$ 2,88 a

Valores seguidos de letras diferentes na mesma linha são diferentes estatisticamente (P<0,05).

12 DISCUSSÃO

12.1 Biometria

O comprimento padrão de *P. hartii* e *Brycon sp* de fêmeas encontradas no presente estudo foi maior que dos machos, semelhante aos resultados descritos por Meireles et al. (2011) trabalhando com as mesmas espécies. No entanto, em *L. steindachneri* foi encontrado valores dessas medidas, maior em machos, semelhante resultados descritos para *Leporinus macrocephalus* por Navarro et al. (2008) em condições de cativeiro.

Na comparação das fêmeas em estudo, o comprimento padrão, peso dos ovários, peso das vísceras, peso do fígado, comprimento do intestino médio e coeficiente intestinal foram maiores nos exemplares de *P. hartii*, uma vez que são os maiores exemplares da bacia do rio Pardo (MEIRELES et al., 2011) e que possuem o hábito iliófago, conforme descrito por Castro e Vari (2004). O peso corporal foi maior nas fêmeas de *P. hartii*, seguido dos exemplares de *L. steindachneri* e menor em *Brycon sp*, semelhante ao encontrado por Meireles et al. (2011), trabalhando com exemplares na mesma bacia hidrográfica. Os índices gonadosômáticos (IGS) nas fêmeas foram maiores em exemplares de *P. hartii*, seguido por *Brycon sp* e menores em *L. steindachneri*, indicam variações específicas individuais dos padrões reprodutivos, semelhante a estudos comparativos com exemplares de *Prochilodus argenteus*, *Brycon orthotaenia* e *Leporinus piau* na bacia do rio São Francisco (GODINHO; GODINHO, 2003). O comprimento do estômago foi maior nos exemplares de fêmeas de *P. hartii* e *L. steindachneri*, sendo menor em *Brycon sp*, no qual pode estar relacionado com o hábito alimentar iliófago e onívoro dos primeiros, e onívoro nos últimos, cujos dados são similares aos de *Prochilodus lineatus* (MORAES; BARBOLA; GUEDES, 1997), *Leporinus macrocephalus* (RODRIGUES; NAVARRO; MENIN, 2008) e *Brycon orbignyanus* (SEIXAS-FILHO et al., 2000). Variações podem ocorrer em peixes de mesmo hábito alimentar, sendo descrito variações entre *Leporinus reinhardti* e *Brycon lundii* quanto ao comprimento de intestino e estômago (MENIN; MIMURA, 1993). No entanto, não houve diferenças estatísticas do índice hepatossômático (IHS), largura do intestino, largura do estômago e peso da desova nas espécies estudadas, cujas comparações costumam apresentar poucas variações específicas, conforme relatado por Al-Hussaini (1949).

Nos machos, o peso corporal e comprimento padrão foram maiores nos exemplares de *P. hartii* e *L. steindachneri*, e menores em *Brycon sp*, diferente do relatado por Meireles et al. (2011), em que foram encontrados machos de *P. hartii* com maiores dados biométricos que as outras espécies na bacia do rio Pardo. O peso das vísceras, largura do intestino e comprimento do estômago foram maiores nos exemplares de *P. hartii* e *L. steindachneri* e menores em *Brycon sp*, o que pode estar relacionado com o hábito alimentar iliófago e onívoro dos primeiros, e onívoro e/ou ictiófago últimos, cujos dados são similares aos de *Prochilodus lineatus* (MORAES; BARBOLA; GUEDES, 1997), *Leporinus macrocephalus* (RODRIGUES; NAVARRO; MENIN, 2008) e *Brycon orbignyanus* (SEIXAS-FILHO et al., 2000). O IGS, foi maior nos exemplares de *P. hartii* e menor em *Brycon sp* e *L. steindachneri*, indicando variações específicas individuais dos padrões reprodutivos, semelhante a estudos comparativos com exemplares de *Prochilodus argenteus*, *Brycon orthotaenia* e *Leporinus piau* na bacia do rio São Francisco (GODINHO; GODINHO, 2003). O comprimento do intestino e coeficiente intestinal também foram maiores em *P. hartii* e menor nos exemplares de *Brycon sp* e *L. steindachneri*, o que pode estar relacionado com os hábitos alimentares, sendo considerado iliófago no primeiro e onívoros nos últimos, o que pode explicar as diferenças, semelhante trabalhos comparativos de hábitos alimentares de peixes descrito por Menin (1988). O peso do fígado foi maior nos exemplares de *P. hartii* e *Brycon sp*, sendo menor em *L. steindachneri*, podendo estar associado com estoques de gordura, glicogênio, estado sanitário e ciclo reprodutivo (TAVARES-DIAS; MARTINS; MORAES, 2000). Entretanto, o IHS e largura do estômago não tiveram diferenças nas comparações entre as espécies estudadas, pois costumam apresentar poucas variações específicas, conforme relatado por Al-Hussaini (1949).

12.2 Anatomia e histologia das gônadas

Os ovários apresentaram coloração verde-acinzentada nos exemplares de *P. hartii*, semelhante descrições para *Prochilodus lineatus* (NINHAUS-SILVEIRA; FORESTI; AZEVEDO, 2006), verde-azulada em *Brycon sp*, similar às descrições para *Brycon insignis* (ANDRADE-TALMELLI et al., 2001) e amarelo-palha em *L. steindachneri* semelhante descrições para *Leporinus piau* (SAMPAIO; SATO, 2009) em outras bacias hidrográficas.

Os testículos apresentaram coloração avermelhada nos exemplares de *P. hartii*, semelhante descrições para *Prochilodus cearensis* após estar esgotado (ARAÚJO; GURGEL; NASCIMENTO, 2003), branca em *Brycon sp* similar às descrições para *Brycon insignis* (ANDRADE-TALMELLI; KAVAMOTO; FENERICH-VERANI, 2001) e rosa em *L. steindachneri* similar às descrições para *Leporinus piau* (SILVA-FILHO et al., 2012) em outras bacias hidrográficas.

As descrições histológicas dos ovários e testículos de *P. hartii*, *Brycons sp* e *L. steindachneri* em maturação avançada são semelhantes aos exemplares de *Prochilodus lineatus*, *Brycon orthotaenia* e *Leporinus piau* na bacia do rio São Francisco (GODINHO; GODINHO, 2003). As fêmeas parcialmente desovadas possuem microscopicamente, ovários contendo ovócitos perinucleolar inicial e avançado, pré-vitelogênicos, vitelogênicos e folículos pós-ovulatórios (QUEIRÓZ-SILVA et al., 2012). Os folículos vazios ou pós-ovulatórios são remanescentes de ovócitos vitelogênicos ovulados, constituídos de parede contendo células foliculares, teca e lume, indicando sucesso no processo reprodutivo em peixes (GODINHO; GODINHO, 2003).

12.3 Anatomia funcional do sistema digestório

O estômago dos exemplares de *P. hartii* é em forma de “U” com presença de uma estrutura semelhante a uma moela, semelhante às descrições para *Prochilodus lineatus*, no qual apresentam estômago com baixa capacidade de armazenamento, bem musculoso e com fortes contrações para fragmentar o alimento, auxiliado pela areia ou outro material sedimentar, para quebrar a parede celular de bactérias, algas e diatomáceas (CASTRO et al., 2003). Já nos exemplares de *Brycon sp*, o estômago possui uma forma de “J”, com presença de cecos pilóricos aderidos na região pilórica semelhante ao encontrado em exemplares de *Brycon sp* n “cristalino” (SILVA, 2007). Em exemplares de *L. steindachneri*, o estômago possui forma de “Y” sem presença de cecos pilóricos aderidos, semelhante ao descrito para *Leporinus reinhardti*, entretanto, diferindo deste, por apresentar cecos pilóricos aderidos nesse órgão (CASTRO et al., 2003).

Os intestinos médios ou propriamente ditos tiveram variações graças ao hábito alimentar dos peixes em estudo. Com um intestino longo e presença de alças espirais em *P. hartii*, foi encontrado um coeficiente intestinal médio de 4,36, semelhante aos trabalhos de

Moraes, Barbola e Guedes (1997) descrevendo sobre o intestino de *Prochilodus lineatus*, que teve um coeficiente intestinal de 4,60, sendo considerado como iliófago. Com um intestino reto e presença de cecos pilóricos, exemplares de *Brycon sp* tiveram um coeficiente intestinal médio de 0,96, semelhante ao relatado para *Brycon orbignyanus*, no qual apresentava presença de cecos pilóricos e um coeficiente intestinal de 1,03 (SEIXAS-FILHO et al., 2000). Exemplares de *L. steindachneri* apresentaram intestino em forma de “N” sem presença de cecos pilóricos e coeficiente intestinal de 1,12, diferindo de *L. reinhardti* (CASTRO et al., 2003) e *L. friderici* (SEIXAS-FILHO et al., 2000) que apresentaram cecos pilóricos, e o último apresentou um coeficiente intestinal de 1,10. Os cecos pilóricos são divertículos cegos de formato digitiforme que se encontram na região pilórica e na porção anterior do intestino médio, estando livres entre si ou ocasionalmente fundidos à parede do estômago (ROTTA, 2003). Sugere-se que os cecos pilóricos sirvam para aumentar a superfície intestinal sem aumentar o comprimento ou espessura do intestino (MENIN; MIMURA, 1993).

Os fígados de todas as espécies estudadas apresentaram presença de vesícula biliar e três lobos hepáticos, semelhante ao descrito por Bombonato et al. (2007) trabalhando com *Leporinus macrocephalus*, no qual classificou os lobos como lateral esquerdo, lateral direito e central.

12.4 Osteologia

As espécies em estudo tiveram diferenças no número de ossos infraorbitais, sendo encontrados quatro nos exemplares de *P. hartii*, conforme detalhado por Castro e Vari (2004) na identificação da espécie, seis nos exemplares de *Brycon sp*, com quinto osso infraorbital largo e alto descrito por Lima (2001) na identificação da nova espécie, e quatro nos exemplares de *L. steindachneri* como também observado por (REIS; KULLANDER; FERRARIS-JÚNIOR, 2003).

Uma fontanela cranial ampla foi observada em todas as três espécies, com espaço formado entre os ossos etmoides, frontais e parietais, semelhante às descrições para *Brycon meeki* (WEITZMAN, 1962).

O maxilar dos exemplares de *Brycon sp* possui uma fileira externa contendo 10 dentes tricuspidados, conforme descrições de Lima (2001), enquanto em *P. hartii* e *L. steindachneri* são desdentados como em outras espécies. O pré-maxilar de *Brycon sp* possui duas fileiras

com 8 dentes cônicos, conforme descrito por Lima (2001), uma fileira com 6 dentes incisiviformes em *L. steindachneri*, como também descrito por Reis, Kullander e Ferraris-Júnior (2003), e no entanto, não foi observada a presença de dentes externos nos exemplares de *P. hartii*, sendo descrito presença de dentes pequenos e móveis na parte interna da mandíbula e maxila nesta espécie por Castro e Vari (2004).

No osso dentário, *Brycon sp* possui 4 dentes cônicos, conforme também descrito por Lima (2001), *L. steindachneri* possui 3 dentes incisiviformes semelhante às descrições de Reis, Kullander e Ferraris-Júnior (2003) e ausência de dentes externos em *P. hartii* conforme Castro e Vari (2004).

No esqueleto de *P. hartii* foram encontradas 37 vértebras e 18 pares de costelas, sendo descrita uma variação de 37 a 40 vértebras e por Castro e Vari (2004). Já o esqueleto de *Brycon sp*, foram encontradas 35 vértebras e 17 pares de costelas, semelhante trabalho descrito com *Brycon meeki* (WEITZMAN, 1962) que foram encontradas 35 a 39 vértebras. No esqueleto de *L. steindachneri* foram encontradas 32 vértebras e 16 pares de costelas, conforme descrições de Reis, Kullander e Ferraris-Júnior (2003).

Na nadadeira dorsal foram encontrados 15 pterigióforos em *P. hartii* conforme relatado por Castro e Vari (2004), 10 em *Brycon sp* semelhante aos relatos com *Brycon meeki* (WEITZMAN, 1962) e 11 em *L. steindachneri* similares ao encontrado em *Leporinus striatus* (MIRANDE, 2010). Na nadadeira anal foram encontrados 10 pterigióforos em *P. hartii* conforme descrito em *Prochilodus lineatus* por Castro e Vari (2004), 18 em *Brycon sp* semelhante relatos em *Brycon meeki* (WEITZMAN, 1962) e 10 em *L. steindachneri* similares ao encontrado em *L. striatus* (MIRANDE, 2010). As nadadeiras adiposas das espécies estudadas não apresentaram quaisquer tipos de raios e pterigióforos semelhante a outros Caraciformes (REIS; KULLANDER; FERRARIS-JÚNIOR, 2003).

As articulações e elementos ósseos descritas nos resultados encontrados nas três espécies em estudo são semelhantes ao descrito em outros peixes teleósteos (DE LILIIS; PULERÀ, 2007).

13 CONCLUSÕES

Com base nas observações realizadas durante a elaboração deste estudo, conclui-se que houve diferenças dos dados biométricos, anatomia funcional do sistema digestório e reprodutivo, além da osteologia dos exemplares de *P. hartii*, *Brycon sp* e *L. steindachneri*. Analisando todas as características estudadas, pode-se concluir que estas espécies possuem uma grande diversidade anatômica, sendo *P. hartii* considerado iliófago, *Brycon sp* e *L. steindachneri* classificados como onívoros de acordo com os dados biométricos e anatômicos encontrados.

Conclusões finais

14 CONCLUSÕES FINAIS

Com base nas observações realizadas durante a elaboração deste estudo, conclui-se que houve diferenças no desenvolvimento ontogenético de *Prochilodus hartii*, *Brycon sp* e *Leporinus steindachneri* na desova induzida no rio Pardo. Os ovos das três espécies estudadas foram classificados como não adesivos e demersais. A temperatura mais baixa influenciou o desenvolvimento embrionário e larval de *L. steindachneri* que apresentou retardo no desenvolvimento. *Brycon sp* apresentou canibalismo intenso após abertura da boca, na fase de pós-larva, enquanto na fase de alevinagem de *P. hartii*, foi encontrado a formação de estruturas semelhante às alças espirais dos ruminantes domésticos no intestino médio, no qual são denominadas de “enrodilhamento” na literatura consultada. Ovos, larvas, pós-larvas e alevinos foram maiores nas amostras de *Brycon sp*, seguido de *P. hartii* e menores em *L. steindachneri*. Em todas as espécies estudadas, BMP-2 foi identificada nas fases de ovos no blastodisco; na fase de clivagem nos blastômeros; na fase de blástula e gástrula na blastoderme; na fase de embriões na notocorda, vesícula óptica e somitos; na fase larval na notocorda, olhos, boca, estômago, fígado e intestino; na fase de pós-larvas nas brânquias, olhos, coração, intestino, bexiga natatória e tecidos conjuntivos; e na fase de alevinos, em todos tecidos já descritos e no processo de ossificação dérmica e endocondral. Com base nas observações realizadas durante a elaboração deste estudo, conclui-se que houve diferenças dos dados biométricos, anatomia funcional do sistema digestório e reprodutivo, além da osteologia dos exemplares de *P. hartii*, *Brycon sp* e *L. steindachneri*. Analisando todas as características estudadas, pode-se concluir que estas espécies possuem uma grande diversidade anatômica, sendo *P. hartii* considerado iliófago, *Brycon sp* e *L. steindachneri* classificados como onívoros, baseado nos achados biométricos e anatômicos, sendo que os resultados deste estudo podem auxiliar em novos estudos de taxonomia, reprodução e nutrição das espécies estudadas. Os próximos passos restantes para complementar o referido estudo, consiste em realizar a morfometria do comprimento padrão e comprimento do saco vitelino das larvas desde a eclosão até a transformação em pós-larvas e comparações estatísticas entre as espécies estudadas.

Referências

REFERÊNCIAS

ADLER, R.; BELECKY-ADAMS, T. L. The role of bone morphogenetic proteins in the differentiation of the ventral optic cup. **Development**, v. 129, p. 3161-3171, 2002.

ADOBE PHOTOSHOP C5 VERSÃO 8.0.1 PARA WINDOWS. **Photoshop C5 user's guide**. Versão 8.0.1. Hamburg: Adobe Software, 2003.

ADRIAENS, D. On how a larva becomes an adult catfish. **A functional morphological approach to the cranial ontogeny of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Siluriformes, Clariidae)**. 1998. 245 f. Thesis (Doctorate in Biology) – Faculteit Wetenschappen, Universiteit Gent, 1998.

ALEXANDRINO, A. C.; PHAN, M. T.; PINHEIRO, E. F. G. Caracterização macroscópica e microscópica das gônadas do curimatá, *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881), durante o ciclo reprodutivo. **Boletim de Zoologia da Universidade de São Paulo**, v. 9, p. 159-75, 1985.

AL-HUSSAINI, A. H. On the functional morphology of the alimentary tract of some fish in relation to differences in their feeding habits. Anatomy and histology. **Quarterly Journal Microseop Science**, v. 90, p. 109-139, 1949.

ANDRADE-TALMELLI, E. F.; KAVAMOTO, E. T.; FENERICH-VERANI, N. Características seminais da Piabanha, *Brycon insignis* (Steindachner, 1876), após estimulação hormonal. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 149-154, 2001.

ANDRADE-TALMELLI, E. F.; KAVAMOTO, E. T.; ROMAGOSA, E.; FENERICH-VERANI, N. Embryonic and larval development of the “Piabanha”, *Brycon insignis*, Steindachner, 1876 (Pisces, Characidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 21-28, 2001.

ARAÚJO, S. A.; GURGEL, H. C. B.; NASCIMENTO, R. S. S. Indicadores do desenvolvimento gonadal e nutricional de *Prochilodus cearenses* (Steindachner, 1911) (Characiformes, Prochilodontidae) no açude Itans/Caicó, Rio Grande do Norte, Brasil. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 25, n. 2, p. 377-384, 2003.

ARAÚJO-LIMA, C. A. R. M.; KIROVSKY, A. L.; MARCA, A. As larvas dos pacus, *Mylossoma spp* (Teleostei; Characidae), da Amazônia Central. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 53, n. 4, p. 591-600, 1993.

BALEMANS, W.; VAN HULL, W. Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: a cocktail of modulators. **Developmental Biology**, v. 250, p. 231-250, 2002.

BALON, E. K. **Early life history of fishes**. Dordrecht: Dr. W Junk Publishers, 1985. p. 13-30.

BARBIERI, G.; HARTZ, S. M.; VERANI, J. R. O fator de condição e o índice hepatossomático como indicadores do período de desova de *Astyanax fasciatus* da represa do Lobo, São Paulo (Osteichthyes, Characidae). **Iheringia**, Série Zoologia, v. 81, p. 97-100, 1996.

BEMVENUTI, M. A. Osteologia comparada entre as espécies de peixes-rei *Odontesthes Evermann & Kendall* (Osteichthyes, Atherinopsidae) do sistema lagunar Patos-Mirim, no extremo sul do Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22, n. 2, p. 293-305, 2005.

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.

BÈRTIN, L. Appereil digestif. In: GRASSÉ, P. P. (Ed.). **Traité de zoologie**. Paris: Masson, 1958. v. 13, p. 1249-1301.

BOMBONATO, M. T. S.; RACHEL, S. S.; VICENTINI, C. A.; VICENTINI, I. B. F. Estudo morfológico do tecido hepático de *Leporinus macrocephalus*. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 29, n. 1, p. 81-85, 2007.

BORÇATO, F. L.; BAZZOLI, N.; SATO, Y. Embriogenesis and larval ontogeny of the “piaú gordura”, *Leporinus piau* (Fowler) (Pisces, Anostomidae) after induced spawning. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 21, n. 1, p. 117-122, 2004.

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.

BRAND, T. Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis. **Developmental Biology**, v. 258, p. 1-19, 2003.

BRITSKI, H. A.; SATO, Y.; ROSA, A. B. S. **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (com chave de identificação para os peixes da bacia do São Francisco)**. 3. Ed. Brasília: Ministério da Irrigação – CODEVASF, 1988. 115 p.

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.

CARDEIRA, J.; VALLÉS, R.; DIONÍSIO, G.; ESTÉVEZ, A.; GISBERT, E.; POUSÃO-FERREIRA, P.; CANCELA, M. L.; GAVAIA, P. J. Osteology of the axial and appendicular skeletons of the meagre *Argyrosomus regius* (Sciaenidae) and early skeletal development at two rearing facilities. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 28, n. 3, p. 464-470, 2012.

CASTELLANI, L. R.; TSE, H. G.; SANTOS, H. S. L.; FARIA, R. H. S.; SANTOS, M. L. S. Desenvolvimento embrionário do curimatá *Prochilodus lineatus* (Valeciennes, 1836) (Cypriniformes, Prochilodontidae). **Revista Brasileira Ciências Morfológicas**, v. 11, n. 2, p. 99-105, 1994.

CASTRO, E. F.; FONSECA, C. C.; MENIN, E.; NEVES, M. T. D. Caracterização histológica e detecção de células endócrinas no estômago de peixes de água doce, com diferentes hábitos alimentares. **Biotemas**, v. 16, n. 2, p. 105-130, 2003.

CASTRO, R. M. C.; VARI, R. P. **Detritivores of the south american fish family Prochilodontidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes). A phylogenetic and revisionary study**. Washington: Smithsonian Contributions and Studies Series, 2004.

CEMIG. Bacia do rio Pardo. 2011. Disponível em:
<<http://www.cemig.com.br/Sustentabilidade/Programas/Ambientais/PeixeVivo/Paginas/RioPardo.aspx>> Acesso em: 22.09.2012.

CFMV. Conselho Federal de Medicina Veterinária. **Resolução nº 714 de 20 de junho de 2002** - Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais, e dá outras providências. Brasília: Conselho Federal de Medicina Veterinária, 2002.

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.

COSTA, A. P. R.; ANDRADE, D. R.; VIDAL-JÚNIOR, M. V.; SOUZA, G. Indicadores quantitativos da biologia reprodutiva de fêmeas de piau-vermelho no Rio Paraíba do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 8, p. 789-795, 2005.

DANESH, S. M.; VILLASENOR, A.; CHONG, D.; SOUKUP, C.; CLEAVER, O. BMP and BMP receptor expression during murine organogenesis. **Gene Expression Patterns**, v. 9, n. 5, p. 255-265, 2009.

DE LULIIS, G.; PULERÀ, D. **The dissection of vertebrates**. A laboratory manual. San Diego: Ed. Elsevier, 2007. 298 p.

DIAS, D. C.; CORRÊA, C. F.; LEONARDO, A. F. G.; TACHIBANA, L.; ROMAGOSA, E.; RANZANI-PAIVA, M. J. T. Probiótico na larvicultura de matrinxã, *Brycon amazonicus*. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 33, n. 4, p. 365-368, 2011.

EIGENMANN, C. H.; OGLE, F. An annotated list of characin fishes in the United States National Museum and the Museum of Indiana University, with descriptions of new species. **Historie Naturelle des poissons**, v. 33, n. 1556, p. 1-36, 1907.

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.

FAUSTINO, F.; NAKAGHI, L. S. O.; NEUMANN, E. *Brycon gouldingi* (Teleostei, Characidae): aspects of the embryonic development in a new fish species with aquaculture potential. **Zygote**, v. 19, n.4, p. 351-363, 2011.

FEINER, N.; BEGEMANN, G.; RENZ, A. J.; MEYER, A.; KURAKU, S. The origin of *bmp16*, a novel *Bmp2/4* relative, retained in teleost fish genomes. **BMC Evolutionary Biology**, v. 9, n. 277, p. 1-14, 2009.

FREITAS, V. **Anatomia: Conceitos e fundamentos**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 272 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.

GALDIOLI, E. M.; HAYASHI, C.; SOARES, C. M.; FURUYA, V. R. B.; FARIA, A. C. E. Substituição da proteína do farelo de soja pela proteína do farelo de canola em rações para alevinos de curimatã (*Prochilodus lineatus* V.). **Revista Brasileira de Zootecnia** v. 31, n. 2, p. 552-559, 2002.

GANECO, L. N.; NAKAGHI, L. S. O.; URBINATI, E. C.; DUMONT-NETO, R.; VASQUES, L. H. Análise morfológica do desenvolvimento ovocitário de Piracanjuba, *Brycon orbinyanus*, durante o ciclo reprodutivo. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 131-138, 2001.

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

GILBERT, S. F. **Developmental biology**. 6. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2000.

GILLIS, J. A.; DAHN, R. D.; SHUBIN, N. H. Shared developmental mechanisms pattern the vertebrate gill arch and paired fin skeletons. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 14, p. 5720-5724, 2009.

GODINHO, H. M. Considerações gerais sobre anatomia dos peixes. In: Comissão interestadual da bacia Paraná-Uruguaí (Ed.). **Poluição e piscicultura**. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP/ Instituto de Pesca de São Paulo. 1970. p. 113-136.

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. In: LOWE-MCCONNELL, R. H. (Ed.). **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. São Paulo: EDUSP, 1999.

GRAPHPAD PRISM 5 PARA WINDOWS. **GraphPad Prism 5 user's guide: statistics**. San Diego: GraphPad Software, 2007.

HAMMOND, K. L.; LOYNES, H. E.; MOWBRAY, C.; RUNKE, G.; HAMMERSCHMIDT, M.; MULLINS, M. C.; HILDERETH, V.; CHAUDHRY, B.; WHITFIELD, T. T. A late role for *bmp2b* in the morphogenesis of semicircular canal ducts in the zebrafish inner ear. **Plos One**, v. 4, n. 2, p. 1-7, 2009.

HEMMATI-BRIVANLOU, A.; THOMSEN, G. H. Ventral mesodermal patterning in *Xenopus* embryos: expression patterns and activities of BMP-2 and BMP-4. **Developmental Genetics**, v. 17, n. 1, p. 78-89, 1995.

HERPIN, A.; ROHR, S.; RIEDEL, D.; KLUEVER, N.; RAZ, E.; SCHARTL, M. Specification of primordial germ cells in medaka (*Oryzias latipes*). **BMC Developmental Biology**, v. 7, n. 3, p. 1-10, 2007.

HILD, M.; DICK, A.; RAUCH, G. J.; MEIER, A.; BOUWMEESTER, T.; HAFFTER, P.; HAMMERSCHMIDT, M. The *smad5* mutation somitabun blocks BMP2b signaling during early dorsoventral patterning of the zebrafish embryo. **Development**, v. 126, n. 10, p. 2149-2159, 1999.

HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. **Fish physiology**. San Diego: Academic Press inc., 1988. v. 11, pt. B, 436p.

HOWES, G. Review of the genus *Brycon* (Teleostei, Characoidei). **Bulletin of Brazilian Museum of Natural History (Zoology)**, v. 43, n. 1, p. 1-47, 1982.

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.

KAN, N. G.; JUNGHANS, D.; BELMONTE, J. C. I. Compensatory growth mechanisms regulated by BMP and FGF signaling mediate liver regeneration in zebrafish after partial hepatectomy. **FASEB Journal**, v. 23, n. 10, p. 3516-3525, 2009.

KIMMEL, C. B.; BALLARD, W. W.; KIMMEL, S. R.; ULLMANN, B. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Development Dynamics**, v. 203, p. 253-310, 1995.

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.

KISHIMOTO, Y.; LEE, K. H.; ZON, L.; HAMMERSCHMIDT, M.; SCHULTE-MERKER, S. The molecular nature of zebrafish swirl: BMP2 function is essential during early dorsoventral patterning. **Development**, v. 124, p. 4457-4466, 1997.

KNOPPERS, B.; MEDEIROS, P. R. P.; SOUZA, W. F. L.; JENNERJAHN, T. The Sao Francisco Estuary, Brazil. In: WANGERSKY, P. (Ed.). **The Handbook of Environment I Chemistry**, Berlin: Springer Verlag, 2006. v. 5, p. 51-70.

LAFOREST, L.; BROWN, C. W.; PLEOG, G.; GERAUDIE, J.; TADA, M.; EKKER, M.; AKIMENKO, M. A. Involvement of the sonic hedgehog, patched 1 and bmp2 genes in patterning of the zebrafish dermal fin rays. **Development**, v. 125, n. 21, p. 4175-4184, 1998.

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.

- LEONARDO, A. F. G.; HOSHIBA, M. A.; SENHORINI, J. A.; URBINATI, E. C. Canibalismo em larvas de matrinxã, *Brycon cephalus*, após imersão dos ovos à diferentes concentrações de triiodotironina (T₃). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 34, n. 2, p. 231-239, 2008.
- LIMA, F. C. T. **Revisão taxonômica do gênero *Brycon* Müller & Troschel, 1844, dos rios da América do Sul cisandina (Pisces, Ostariophysi, Characiformes, Characidae)**. 2001. 312 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
- LUZ, T. K.; REYNALTE-TATAJE, D. A.; FERREIRA, A. A.; ZANIBONI, E. Desenvolvimento embrionário e estágios larvais do mandi-amarelo *Pimelodus maculatus*. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 49-55, 2001.
- 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.
- MACIEL, C. M. R. R.; MACIEL-JÚNIOR, A.; LANNA, E. A. T.; MENIN, E. Anatomia funcional da cavidade bucofaringiana de trairão, *Hoplias lacerdae* Miranda Ribeiro, 1908 (Characiformes, Erythrinidae). **Biotemas**, v. 22, n. 3, p. 95-102, 2009.
- MEIRELES, W. A. **Esteróides sexuais do mandi-amarelo, *Pimelodus maculatus* La Ceppe, 1803 (Pisces, Pimelodidae) em três condições ambientais**. 2005. 35 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.
- 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.
- MELO, C. E.; ROPKE, C. P. Alimentação e distribuição de piaus (Pisces, Anostomidae) na planície do Bananal, Mato Grosso, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 21, n. 1, p. 51-56, 2004.
- MENIN, E. **Anátomo-histologia funcional comparativa do aparelho digestivo de seis Teleostei (Pisces) de água doce**. 1988. 557 f. Tese (Doutorado em Fisiologia) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1988.

MENIN, E.; MIMURA, O. M. Anatomia funcional comparativa do intestino de dois peixes teleostei de água doce de hábito alimentar onívoro. **Ceres**, v. 40, n. 231, p. 450-478, 1993.

MIRANDE, J. M. Phylogeny of the Family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. **Neotropical Ichthyology**, v. 8, n. 3, p. 385-568, 2010.

MORAES, M. F. P. G.; BARBOLA, I. F.; GUEDES, E. A. C. Alimentação e relações morfológicas com o aparelho digestivo do “Curimbatá”, *Prochilodus lineatus* (Valenciennes) (Osteichthyes, Prochilodontidae), de uma lagoa do sul do Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 14, n. 1, p. 169-180, 1997.

MOREIRA, H. L. M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R. P.; ZIMMERMANN, S. **Fundamentos da moderna aquicultura**. Canoas: ULBRA, 2001. 200 p.

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.

NARAHARA, M. Y.; ANDRADE-TALMELLI, E. F.; KAVAMOTO, E. T.; GODINHO, H. N. Reprodução induzida da Pirapitinga-do-Sul, *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819), mantida em condições de confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 3, p. 1070-1075, 2002.

NAVARRO, R. D.; RIBEIRO-FILHO, O. P.; SILVA, R. F.; CALADO, L. L.; PEREIRA, F. K. S. Desempenho produtivo e índice reprodutivo de machos e fêmeas de piaçu (*Leporinus macrocephalus*) alimentados com diferentes níveis de energia digestível. **Revista Acadêmica de Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 6, p. 451-458, 2008.

NIKAIDO, M.; TADA, M.; TAKEDA, H.; KUROIWA, A.; UENO, N. In vivo analysis using variants of zebrafish BMPR-IA: range of action and involvement of BMP in ectoderm patterning. **Development**, v. 126, p. 181-190, 1999.

NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F.; AZEVEDO, A. Structural and ultrastructural analysis of embryonic development of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiformes, Prochilodontidae). **Zygote**, v.14, p.217-229, 2006.

OLIVEIRA, C.; NIRCHIO, M.; GRANADO, A.; LEVY, S. Karyotypic characterization of *Prochilodus mariae*, *Semaprochilodus kneri* and *S. laticeps* (Teleostei: Prochilodontidae) from Caicara del Orinoco, Venezuela. **Neotropical Ichthyology**, v. 1, n. 1, p. 47-52, 2003.

PELICICE, F. M.; AGOSTINHO, A. A. Fish passage facilities as ecological traps in large Neotropical Rivers. **Conservation Biology**, v. 22, n. 1, p. 180-188, 2008.

PREJS, A. Metodos para el studio de los alimentos y las relaciones troficas de los peces. Caracas: Universidad Central de Venezuela y Universidad de Varsovia, 1981. 129 p.

PYATI, U. J.; COOPER, M. S.; DAVIDSON, A. J.; NECHIPORUK, A.; KIMELMAN, D. Sustained BMP signaling is essential for cloaca development in zebrafish. **Development**, v. 133, p. 2275-2284, 2006.

QUEIRÓS-SILVA, F.; ROMAGOSA, E.; AMARAL-JÚNIOR, H.; BORELLA, M. I. Substratos para a postura de ovos de kinguios, *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, n. 1, p. 44-50, 2012.

QUEROL, M. V. M.; QUEROL, E.; GOMES, N. N. A. Fator de condição gonadal, índice hepatossomático e recrutamento como indicadores do período de reprodução de *Loricariichthys platymetopon* (Osteichthyes, Loricariidae), bacia do rio Uruguai médio, Sul do Brasil. **Iheringia**, Série de Zoologia, v. 92, n. 3, p. 79-84, 2002.

RAFAEL, M. S.; LAIZÉ, V.; CANCELA, M. L. Identification of *Sparus aurata* bone morphogenetic protein 2: molecular cloning, gene expression and in silico analysis of protein conserved features in vertebrates. **Bone**, v. 39, n. 6, p. 1373-1381, 2006.

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

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.

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

RODRIGUES, S. S.; NAVARRO, R. D.; MENIN, E. Anatomia do tubo digestório de *Leporinus macrocephalus* Garavello & Britski, 1988 (Characiformes, Anostomidae) em relação ao seu hábita alimentar. **Bioscience Journal**, v. 24, n. 3, p. 86-95, 2008.

ROTA, M. A. **Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestivo dos peixes relacionados à piscicultura**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2003. 48 p. Documentos 53.

SAKOU, T. Bone morphogenetic proteins: from basic studies to clinical approaches. **Bone**, v. 22, p. 591-603, 1998.

SAMPAIO, E. V.; SATO, Y. Aspectos reprodutivos de *Leporinus piau* Fowler, 1941 (Osteichthyes, Anostomidae) da bacia do rio São Francisco, submetido à desova induzida. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 1, p. 157-165, 2009.

SANCHES, P. V.; BAUMGARTNER, G.; BIALETZKI, A.; SUIBERTO, M. R.; GOMES, F. D. C.; NAKATANI, K.; BARBOSA, N. D. C. Caracterização do desenvolvimento inicial de *Leporinus friderici* (Osteichthyes, Anostomidae) da bacia do rio Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 2, p. 383-389, 2001.

SANTOS, G. M.; JEGU, M. Inventário taxonômico dos Anostomideos (Pisces, Anostomidae) da bacia do rio Uatumã – AM, Brasil, com descrição de duas espécies novas. **Acta Amazônica**, v. 26, p. 151-184, 1996.

SATO, Y. **Reprodução de peixes da bacia do rio São Francisco: indução e caracterização de padrões**. 1999. 179 f. Tese (Doutorado em Ciências – Área de concentração: Ecologia e Recursos Naturais) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1999.

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 de Zootecnia**, v. 29, n. 2, p. 313-324, 2000.

SILVA, A. C. G. **Caracterização do desenvolvimento ontogênico inicial de *Anchoviella vaillanti* (Steindachner, 1908)**. 2010. 47 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

SILVA, S. A. A. **Dieta natural de *Brycon sp. n.* “Cristalino” – Matrinxã no Parque Estadual Cristalino, região norte de Mato Grosso, Brasil**. 2007. 75 f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

SILVA-FILHO, J. J.; NASCIMENTO, W. S.; ARAÚJO, A. S.; BARROS, N. H. C.; CHELLAPA, S. Reprodução do peixe piau preto *Leporinus piau* (Fowler, 1941) e as variáveis

ambientais do açude Marechal Dutra, Rio Grande do Norte. **Biota Amazônia**, v. 2, n. 1, p. 10-21, 2012.

SMITH, A.; AVARON, F.; GUAY, D.; PADHI, B. K.; AKIMENKO, M. A. Inhibition of BMP signaling during zebrafish fin regeneration disrupts fin growth and scleroblast differentiation and function. **Developmental Biology**, v. 299, p. 438-454, 2006.

SMITH, K. A.; NOEL, E.; THURLINGS, I.; REHMANN, H.; CHOCRON, S.; BAKKERS, J. BMP and nodal independently regulate lefty 1 expression to maintain unilateral nodal activity during left-right axis specification in zebrafish. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 9, p. e1002289, 2011.

STEINDACHNER, F. Die süßwasserfische des südöstlichen brasilien. **Atlas zu der Reise im nördlichen Africa. Fische des Rothen Meeres**, v. 70, n. 1, p. 499-538, 1875.

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.

TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M. L.; MORAES, F. R. Relação hepatossômica e esplenosômica em peixes teleósteos de cultivo intensivo. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 17, n. 1, p. 273-281, 2000.

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.

WARGA, R. M.; KIMMEL, C. B. Cell movements during epiboly and gastrulation in zebrafish. **Development**, v. 108, p. 569-580, 1990.

WISE, S. B.; STOCK, D. W. *bmp2b* and *bmp4* are dispensable for zebrafish tooth development. **Developmental Dynamics**, v. 239, p. 2534-2546, 2010.

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. Manual de extensão**. Brasília-DF: FAO/CODEVASF/CNPq. 1983. 80p.

WOYNAROVICH, E.; SATO, Y. Special rearing of larvae and post-larvae of matrinxã (*Brycon lundii*) and dourado (*Salminus brasiliensis*). In: HARVEY, B.; CAROSFELD, J. (Ed.). **Workshop on larval rearing of finfish**. Pirassununga: CIDA, ICSU, CASAFA, 1990.

YANG, Z. J.; QI, Y. Y.; ZOU, X. H.; WANG, L. L.; OUYANG, H. W. Comparison the effects of BMP-4 and BMP-7 on articular cartilage repair with bone marrow mesenchymal stem cells. **IFMBE Proceedings**, v. 23, n. 4, p. 1285-1288, 2009.

ZANIBONI-FILHO, E.; NUÑER, A. P. O.; REYNALTE-TATAJE, D. A.; SERAFINI, R. L. Water pH and *Prochilodus lineatus* larvae survival. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, n. 1, p. 151-155, 2009.