

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**FASE EMBRIONÁRIO E LARVAL DO HÍBRIDO *Pseudoplatystoma reticulatum* x  
*Leiarius marmoratus* E DO PARENTAL *Leiarius marmoratus***

DIEGO DE OLIVEIRA  
Engenheiro Agrônomo

Dissertação apresentada como um dos requisitos  
para obtenção do título de Mestre em Zootecnia,  
Área de concentração Produção Animal

Porto Alegre, RS, Brasil

Março de 2013

### CIP - Catalogação na Publicação

de Oliveira, Diego  
FASE EMBRIONÁRIO E LARVAL DO HÍBRIDO  
Pseudoplatystoma reticulatum x Leiarius marmoratus E  
DO PARENTAL Leiarius marmoratus / Diego de Oliveira.  
-- 2013.  
75 f.

Orientador: Danilo Pedro Streit Jr..  
Coorientadora: Lígia Uribe Gonçalves.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa  
de Pós-Graduação em Zootecnia, Porto Alegre, BR-RS,  
2013.

1. Ontogenia Inicial. 2. Cachara. 3. Jundiá  
Amazônico. 4. Reprodução. I. Streit Jr., Danilo Pedro,  
orient. II. Uribe Gonçalves, Lígia, coorient. III.  
Título.

DIEGO DE OLIVEIRA  
Engenheiro Agrônomo

## DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos  
para obtenção do Grau de

### MESTRE EM ZOOTECNIA

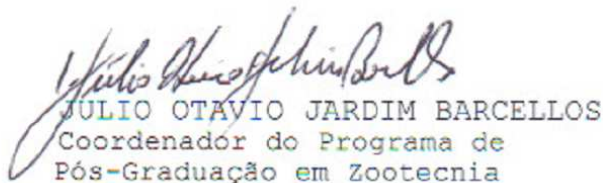
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia  
Faculdade de Agronomia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 21.03.2013  
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 14.06.2013  
Por



DANILO PEDRO STREIT JR.  
PPG ZOOTECNIA/UFRGS  
Orientador



JULIO OTAVIO JARDIM BARCELLOS  
Coordenador do Programa de  
Pós-Graduação em Zootecnia



DARCI CARLOS FORNARI  
Delicious Fish



ELIZABETH ROMAGOSA  
CAUNESP/INSTITUTO DE PESCA



LEANDRO CESAR DE GODOY  
UFRGS



ENIO LUPCHINSKI JUNIOR  
UERGS



PEDRO ALBERTO SELBACH  
Diretor da Faculdade de  
Agronomia

Aos meus irmãos,  
meus pais, e à Ana.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao seu Pedrinho, dona Maria, Simone, Érica, Marcelo e Luci pela oportunidade de realizar o experimento na piscigranja Boa Esperança, Pimenta Bueno, Rondônia, pois não mediram esforços para me ajudar e me acolheram como se fosse um membro da família, e também aos funcionários Alemão, Adauto e Marcelo.

Aos meus colegas, Juliana, Raycon, Luís Ricardo, Lígia, pela dedicação e empenho durante a coleta de material a campo.

Agradeço em especial ao Luís Ricardo, ao Leandro, ao Rodrigo e à Lígia, pelas horas de paciência discutindo sobre o trabalho, ou sobre qualquer outra coisa.

Aos meus colegas do Aquam/UFRGS, pela ajuda nas análises e confecção de material, e por me aguentarem.

Em especial aos meus orientadores, Danilo e Lígia, por confiarem em mim, mesmo quando parecia não haver mais solução.

À Ione, peça chave em diversos momentos, seja para lembrar, relembrar, ou apenas jogar conversa fora.

À Ana Paula, meu amor, por me levar café, fazer sanduíche, ou simplesmente me dar colo (foi muito importante nos momentos de não desistência).

Ao CNPq.

À Deus, que nos guia.

## FASE EMBRIONÁRIO E LARVAL DO HÍBRIDO *Pseudoplatystoma reticulatum* x *Leiarius marmoratus* E DO PARENTAL *Leiarius marmoratus*<sup>1</sup>

Autor: Diego de Oliveira

Orientador: Danilo Pedro Streit Junior

Co-Orientador: Ligia Uribe Gonçalves

### Resumo

À medida que são postuladas novas espécies e algumas são inseridas em modelos já definidos de produção de espécies aquáticas, estudos do desenvolvimento embrionário e larval são necessários para aumentar os índices de sobrevivência em laboratórios de reprodução. Espécies de peixes neotropicais para piscicultura são largamente estudadas, a fim de caracterizar o desenvolvimento embrionário e larval, identificar e localizar áreas de desova, conhecer os pontos críticos do desenvolvimento e o momento exato do início da alimentação exógena. Este trabalho teve por objetivo analisar as diferentes fases do desenvolvimento embrionário e larval do parental *Leiarius marmoratus* e do híbrido *Pseudoplatystoma reticulatum* x *Leiarius marmoratus*. O híbrido, originado do cruzamento interespecífico, apresenta inserção na cadeia produtiva no Norte e Centro-Oeste do Brasil. Logo, compreender o desenvolvimento destes processos agrega conhecimento tanto à espécie quanto ao híbrido em relação à sua ontogenia. A partir da coleta de material em laboratório de reprodução de peixes, utilizaram-se embriões para a realização de fotomicrografias do desenvolvimento embrionário e tecido para análise histológica. Os resultados revelaram o desenvolvimento ontogênico inicial de ambas as espécies, semelhante ao que ocorre em teleósteos, com o estágio de clivagem mostrando assincronia na divisão dos blastômeros, início da formação da camada sincicial de vitelo no estágio de mórula, gástrula com formação de anel vitelínico e escudo embrionário, abertura da boca da larva às 36 e 48 horas para espécie e híbrido, respectivamente, e aquisição de alimento exógeno pelo híbrido às 72 horas após a eclosão. Houve maior espaço perivitelínico e a aquisição de alimento exógeno pela larva do híbrido em relação à larva do parental *L. marmoratus*. A não captura de alimento exógeno por *L. marmoratus* pode ser devido ao reduzido tamanho do aparato bucal em relação ao alimento exógeno oferecido. Com isso, é possível sugerir a necessidade de adequação da alimentação no período larval da espécie, além de satisfazer cuidados específicos como monitorar a vazão da incubadora (3 litros por minuto) durante a incubação, e reduzir a densidade de estocagem de embriões, a fim de evitar choques mecânicos entre os mesmos, pois apresentam distância perivitelínica reduzida, o que determina a fragilidade do embrião de *L. marmoratus*.

---

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Zootecnia – Produção Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, (67p.). Março de 2013.

**EMBRYONIC AND LARVAL STAGE OF THE HYBRID  
*PSEUDOPLATYSTOMA RETICULATUM* X *LEIARIUS MARMORATUS* AND  
THE PARENTAL *LEIARIUS MARMORATUS*<sup>1</sup>**

Author: Diego de Oliveira  
Adviser: Danilo Pedro Streit Junior  
Co-Adviser: Ligia Uribe Gonçalves

**Abstract**

As new species are postulated and some are inserted in templates already defined of aquatic species production, studies of embryonic and larval development are necessary to increase survival rates in laboratory breeding. Neotropical fish species for aquaculture are widely studied, to characterize the embryonic and larval development, identify and locate spawning areas, know the critical points of development and the exact time of first feeding. This study aimed to analyze the different stages of embryonic and larval development of the parental *Leiarius marmoratus* and the hybrid *Pseudoplatystoma reticulatum* x *Leiarius marmoratus*. The hybrid, originated from the interespecific cross, presents insertion in the production chain in the North and Midwest of Brazil. Therefore, to understand the development of these processes adds knowledge to the species as the hybrid relative to its ontogeny. From the collection of material in fish reproduction laboratory, embryos were used to make photomicrographs of embryonic development and tissue for histological analysis. The results revealed the initial ontogenetic development of both species, similar to what occurs in teleosts, with the cleavage stadium showing asynchrony in the division of blastomeres, the early formation of the yolk syncytial layer in the morula stage, gastrula with vitelline ring formation and embryonic shell formation, mouth opening of the larva at 36 and 48 hours for species and hybrid, respectively, and food acquisition by exogenous food by the hybrid at 72 hours after hatching. There was a greater perivitelline space and the acquisition of exogenous food by larvae of the hybrid compared to the larvae of the parental *L. marmoratus*. Failure to capture exogenous food by *L. marmoratus* may be due to the small size of the oral apparatus in relation to the exogenous food offered. So it is possible to suggest the need for an adequate supply during the larval period of the species, in addition to meeting specific care as monitor the flow of the incubator (3 liter per minute) during incubation, and reducing stocking density of embryos, in order to avoid mechanical shocks therebetween, cause they present reduced perivitelline distance, which determines the fragility of the embryo *L. marmoratus*.

---

<sup>1</sup> Master of Science dissertation in Animal Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, (67p.). March, 2013.

## SUMÁRIO

	Página
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>11</b>
INTRODUÇÃO GERAL.....	12
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	13
Espécies estudadas .....	13
<i>Leiarius marmoratus</i> .....	13
<i>Pseudoplatystoma reticulatum</i> .....	14
Reprodução em Cativeiro .....	15
Hibridação .....	16
<i>Pseudoplatystoma reticulatum</i> x <i>Leiarius marmoratus</i> .....	17
Embriogênese .....	17
Descrição dos estádios iniciais de desenvolvimento.....	18
Considerações sobre o desenvolvimento embrionário e larval .....	19
HIPÓTESES .....	22
OBJETIVOS.....	23
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>24</b>
Desenvolvimento embrionário e larval de <i>Leiarius marmoratus</i> (Gill, 1870) e do híbrido <i>Pseudoplatystoma reticulatum</i> (Eigenmann & Eigenmann, 1889) x <i>Leiarius marmoratus</i> : comparação e momentos críticos.....	25
Resumo.....	25
Abstract.....	26
Introdução.....	27
Material e métodos .....	29
Resultados.....	32
Discussão .....	39
Referências.....	48
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>52</b>
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	53
REFERÊNCIAS .....	54
ANEXOS.....	59
APÊNDICES .....	72
VITA.....	75



## RELAÇÃO DE TABELAS

TABELA 1. Médias e desvios-padrão dos diâmetros dos ovócitos, tempo para o fechamento do blastóporo, taxa de fertilização, tempo total do desenvolvimento embrionário à eclosão e taxa de eclosão no desenvolvimento embrionário de *L. marmoratus* e do híbrido *P. reticulatum* x *L. marmoratus*. ..... 32

TABELA 2. Comparação de embriões de *L. marmoratus* e *P. reticulatum* x *L. marmoratus* quanto ao diâmetro e espaço perivitelínico (EP) (média e desvio-padrão)..... 33

TABELA 3. Descrição do desenvolvimento larval a partir da eclosão de *L. marmoratus* e do híbrido *P. reticulatum* x *L. marmoratus*. ..... 35

## RELAÇÃO DE FIGURAS

- FIGURA 1. Representação das médias e desvios-padrão de comprimento de larvas e seus respectivos volumes do saco vitelínico, através do consumo de vitelo ao longo do tempo de *L. marmoratus* e *P. reticulatum* x *L. marmoratus*.....34
- FIGURA 2. Ovos de *L. marmoratus* (A) e híbrido (B). Microscopia de luz com HE.....38
- FIGURA 3. Desenvolvimento embrionário de *L. marmoratus*, da célula-ovo à eclosão (estereomicroscópio).....38
- FIGURA 4. Desenvolvimento embrionário de *P. reticulatum* x *L. marmoratus*, da célula-ovo à eclosão (estereomicroscópio)..... 39
- FIGURA 5. Desenvolvimento embrionário e larval de *L. marmoratus* analisadas sob microscopia de luz em HE..... 40
- FIGURA 6. Desenvolvimento embrionário de *P. reticulatum* x *L. marmoratus*, analisadas sob microscopia de luz em HE..... 41
- FIGURA 7. Desenvolvimento de larvas de *L. marmoratus* e *P. reticulatum* x *L. marmoratus* (estereomicroscópio)..... 42

## RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

EHC – Extrato Bruto de Hipófise de Carpa

HAE – Horas após eclosão

HAF – Horas após fertilização

MAF – Minutos após fertilização

PV – Peso vivo

♂ - Peixe macho

♀ - Peixe fêmea

$\Pi$  – numeral Pi (3,1416)

V – Volume

EP – Espaço perivitelínico

D – Diâmetro

Dv – Diâmetro do vitelo

a – comprimento

b – largura

c - altura

## **CAPÍTULO 1**

## INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil possui potencial hídrico privilegiado em toda sua extensão continental, além de grande diversidade de espécies de peixes e inúmeras com potencial zootécnico inexplorado (Sidonio, 2012). Apesar de existir desenvolvimento de tecnologias para espécies neotropicais no Brasil, ainda são necessárias informações sobre características biológicas das espécies com potencial para piscicultura (Luz et al., 2001; Buzollo, 2011) nas diferentes fases do desenvolvimento.

O domínio da reprodução e do desenvolvimento inicial de espécies de peixes são fundamentais para a propagação controlada das espécies, e assim viabilizam a produção aquícola. Estudos do desenvolvimento embrionário são utilizados para a manutenção dos recursos pesqueiros, envolvendo: cultivo de peixes, desenvolvimento ontogênico, modelos experimentais e avaliação da qualidade ambiental (Ninhaus-Silveira et al., 2006). Apesar disso, faltam estudos especializados da ontogenia inicial, e as informações da biologia de espécies nativas e de seus híbridos são escassas. Esses estudos permitiriam o conhecimento da ontogenia inicial das espécies que se inserem na piscicultura, resultando em avanços no cultivo, no melhoramento genético, aplicação na cadeia produtiva, criopreservação de gametas, embriões e tecidos.

A criação de peixes neotropicais sul-americanos tem se desenvolvido seguindo modelos de sistemas produtivos já definidos, como os de salmão e tilápia, através de formação de cadeia de suprimentos, formação de estruturas para processamento do pescado e cooperativismo ou verticalização (Rotta, 2009). Apesar destes avanços, a aquíicultura tem seu potencial de crescimento reduzido, em que um dos entraves para este crescimento é o pouco conhecimento biológico das espécies nativas que são utilizadas nas pisciculturas (Godinho, 2007).

Estabelecer a cadeia de produção de uma espécie de peixe no Brasil, na maioria das vezes, sobrepõe-se à necessidade de conhecimento de aspectos básicos da biologia. Em muitos casos, tecnologias de produção como utilização de gametas (sêmen) congelado e melhoramento genético, se colocam à frente de informações básicas como estudos de gestão, ciclo reprodutivo e ontogenia dos peixes (Guerreiro, 2012). Apesar disso, ainda são praticadas técnicas rudimentares de produção, dificultando o aprimoramento de índices zootécnicos (Rotta, 2009), como ocorrem com os cruzamentos interespecíficos de forma desregrada, sem possuir um planejamento para contenção de híbridos. Esta busca por híbridos com melhor desenvolvimento que seus parentais, que é adotado largamente no país, pode acarretar uma séria consequência na conservação genética de espécies, já que o resultado destes cruzamentos é a formação de híbridos com reprodução compatível com suas espécies parentais (Abreu et al., 2009; Hashimoto et al., 2012; Prado et al., 2012).

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### Espécies estudadas

A ontogenia inicial de *Leiarius marmoratus* e do híbrido com a fêmea de *Pseudoplatystoma reticulatum* será discutida neste trabalho. A ordem Siluriformes compreende 35 famílias, 446 gêneros e aproximadamente 2867 espécies. Estes números, porém, se modificam com realocações de espécies dentro de diferentes famílias, além da expectativa de descoberta de novas espécies desta ordem (Nelson, 2006).

A família Pimelodidae se restringe a 30 gêneros e 93 espécies reconhecidas que são encontradas em águas doces da América do Sul e regiões ístmicas, possuindo espécies ainda não descritas (Reis et al., 2003; Buirtrago-Suárez & Burr, 2007; Ferraris, 2007).

### *Leiarius marmoratus*

O *Leiarius marmoratus* (Gill, 1870) pertence à Ordem e à Família supracitada, conhecido como jundiá amazônico ou peixe onça. É distribuído ao longo da bacia dos rios Amazonas e Orinoco, abrangendo Venezuela, Colômbia, Brasil, Bolívia e Peru. É uma espécie migradora que realiza o processo migratório no período em que ocorrem as maiores precipitações pluviométricas (Carolsfeld et al., 2003). Tem sido recomendado para diversificar a aquicultura nas regiões onde é endêmico (bacias dos rios Amazonas e Orinoco) e fora dela (Reis et al., 2003; Ramirez-Merlano et al., 2010). No Brasil, é endêmico nos estados que abrangem a Região Norte do país, com exceção de Tocantins. Sua carne é muito apreciada, possuindo a característica dos siluriformes de não apresentar espinhos intermusculares em forma de “y” (Mora Sánchez et al., 2009).

Em seu ambiente natural, a espécie apresenta hábito alimentar piscívoro, com comprovação de 100% de conteúdo estomacal baseado em peixes (Layman et al., 2005). Contudo, estudos relacionam tendências onívoras, habitando o fundo dos rios e consumindo organismos bentônicos, onde a temperatura da água varia de 24 a 26°C e pH entre 5,8 e 7,2 (Reis et al., 2003; Layman et al., 2005; Ramirez-Merlano et al., 2010).

A primeira reprodução induzida em laboratório desta espécie foi relatada em 1986, por Christopher Kossowski, na Venezuela. A partir deste fato, foram iniciados ensaios de hibridação com outras espécies de Pimelodidae, em função da aceitação do jundiá amazônico ao alimento inerte e da tendência à onivoria, diferentemente dos outros bagres piscívoros (Mora Sánchez, 2003; Cruz-Casallas et al., 2010). De todo modo, ocorrem dificuldades na obtenção dos gametas masculinos, uma vez que os testículos possuem numerosas formações digitiformes que terminam no ducto espermático, dificultando a extrusão manual do esperma, além de fatores hormonais para a obtenção dos gametas, como o estresse causado pelas

condições de cativeiro e a perda das condições ambientais apropriadas à sua reprodução natural (Viveiros et al., 2002; Mira et al., 2010a).

Quanto à larvicultura, estratégias produtivas como condicionamento alimentar com alimentos vivos e dietas balanceadas que garantam o crescimento das larvas de *L. marmoratus* na primeira alimentação são essenciais. Os alimentos menores, como náuplios de artêmia recém eclodidos e cladóceros, contribuem para sua alimentação inicial (Ramírez-Merlano et al., 2010). Após a larva consumir o conteúdo do saco vitelínico, inicia-se a adaptação ao alimento inerte, oferecendo-se dieta com 45% de proteína bruta, reduzindo a níveis de 30% na fase de engorda, obtendo resultados satisfatórios de crescimento, com animais pesando cerca de 800g, em um período de 8 meses (Cruz-Casallas et al., 2010).

### ***Pseudoplatystoma reticulatum***

*Pseudoplatystoma reticulatum* (Eigenmann & Eigenmann, 1889) se diferencia de outras espécies do gênero *Pseudoplatystoma* por possuir como características no tegumento (pigmentação externa), máculas que não formam linhas verticais. Elas se conectam entre si formando células, e não possui pintas na lateral do corpo, somente na cabeça e cauda, sendo as da cauda escassas e menores que as da cabeça (Buitrago-Suárez & Burr, 2007).

Na descrição de Buitrago-Suárez & Burr (2007) sobre novas espécies de *Pseudoplatystoma*, a espécie em estudo não era reconhecida. A nomenclatura de *P. reticulatum* era atribuída à espécie *P. fasciatum*, e confundida com *P. tigrinus*. Porém, na PCA (Análise dos Componentes Principais) deste gênero, foi verificada diferença significativa entre os grupos citados. Apesar destas constatações a partir do estudo do tegumento, novas espécies poderão ser nomeadas ou retiradas por meio de estudos como o de Torrico et al. (2009). Neste estudo, analisando a variabilidade genética entre estas espécies, constatou-se a possibilidade de vicariância<sup>1</sup> na existência das mesmas, principalmente por serem de bacias hidrográficas diferentes.

O *P. reticulatum*, também conhecido como surubim cachara, é distribuído em parte da bacia do rio Amazonas e na bacia do rio Paraná (Buitrago-Suárez & Burr, 2007; Torrico et al., 2009). O hábito alimentar carnívoro ictiófago do gênero *Pseudoplatystoma* lhe confere importante papel como predador nos rios em que se encontra. Migram longas distâncias para que possam se reproduzir, possuem desova total e não possuem cuidado parental (Faustino et al., 2007; Abreu et al., 2009). Ultimamente, tem ocorrido redução do número de indivíduos devido às mudanças ambientais, tais como construção de barragens, poluição agrícola e industrial (Bignotto et al., 2009;

---

<sup>1</sup> mecanismo evolutivo no qual a distribuição de uma espécie ancestral é fragmentada em duas ou mais áreas, devido ao surgimento de uma barreira natural (Instituto Antônio Houaiss, Editora Objetiva, Copyright 2001-2009).

Torrigo et al., 2009), além da pesca predatória. A pesca deste gênero para a formação de plantel de reprodutores, realizada tanto por piscicultores quanto por pescadores que comercializam para os piscicultores, contribui para o setor produtivo por ser uma importante espécie nativa para a piscicultura comercial, embora esta formação resulta em impacto ambiental pela redução de indivíduos adultos (Torrigo et al., 2009; Abreu et al., 2009).

A reprodução de *P. reticulatum*, em laboratório, ocorre com facilidade através da indução hormonal com extrato bruto de hipófise de carpa (EHC). Entretanto, altas taxas de mortalidade larval podem ocorrer devido ao frequente canibalismo já no segundo dia de vida (Faustino et al., 2007), o que demanda manejo alimentar intensivo para que as larvas capturem organismos vivos de espécies forrageiras. Além disso, essa espécie necessita ser submetida a um treinamento alimentar para a adaptação ao consumo de dieta comercial seca e extrudada (Baras & Jobling, 2002), fase que também pode ocorrer perdas de larvas e alevinos.

O surubim cachara é considerado uma espécie nobre com alto valor comercial, possui carne saborosa e com baixo teor de gordura, não possuindo espinhos intramusculares (Romagosa et al., 2003; Faustino et al., 2010). Devido aos fatores que promovem a redução de seus indivíduos nos rios (sobrepesca, poluição dos mananciais, construção de hidrelétricas), à aceitação mercadológica e às boas características zootécnicas (Crepaldi, 2006), surge no mercado a oportunidade de desenvolvimento de um sistema de cultivo próprio à espécie. Desse modo, estudos são desenvolvidos na geração de um pacote tecnológico para produzir surubins em cativeiro com índices de produção zootécnica satisfatórios ao produtor (melhores rendimentos de carcaça, redução da conversão alimentar e aumento no ganho de peso) (Crepaldi et al., 2006; Faustino et al., 2007; Resende et al., 2010).

### **Reprodução em Cativeiro**

As espécies escolhidas para realizar este estudo são reofílicas, ou popularmente, de piracema. A piracema é um fenômeno de migração de peixes contra a correnteza do rio, para que ocorra a maturação das gônadas, através de controle hormonal. Ainda, para ocorrer sua reprodução no período reprodutivo, há necessidade de sincronização da maturação das gônadas com fenômenos climáticos, que no caso de espécies tropicais, significa o início da estação das chuvas, aumento dos valores de temperatura da água e aumento do fotoperíodo (Romagosa, 2010; Honji et al., 2012; Boncompagni-Júnior et al., 2013).

Para o sucesso na obtenção de gametas em cativeiro, a utilização de hormônios é imprescindível, pois nestes sistemas os efeitos ambientais (chuva, temperatura, fotoperíodo) não possibilitam a liberação dos gametas. A indução hormonal permite que ocorra a maturação final e desova, através da migração e desintegração da vesícula germinal, rompimento do envelope folicular e liberação dos ovócitos para a luz dos ovários, com consequente eliminação dos ovócitos. Para os machos, a função básica da indução



hormonal é aumentar o volume de sêmen para ocorrer maior fluidez do mesmo no momento da extrusão (Zaniboni Filho & Weingartner, 2007).

Quanto ao processo reprodutivo em cativeiro, tradicionalmente utiliza-se EHC, como relatado no estudo de Marques et al. (2008) na indução hormonal de *P. corruscans*. O autor utilizou EHC de acordo com o protocolo desenvolvido por Woynarovich & Hórvath (1983). Com duas doses deste hormônio administrados em intervalos de 10 horas, obtiveram os gametas femininos a fim de prosseguir com a fertilização a seco. Uma única dose foi utilizada para o macho, que a recebeu no momento de indução da segunda dose da fêmea. A indução hormonal, no entanto, pode ser modificada através da variação do tempo para aplicação das doses nas fêmeas, diferentes dosagens hormonais e diferentes hormônios (Leonardo et al., 2004; Crepaldi et al., 2006; Caneppele et al., 2009), providenciando desta forma a liberação dos ovócitos, de acordo com a resposta das diferentes espécies, ou objetivando a redução de custos.

### **Hibridação**

A hibridação interespecífica é vista como uma técnica para explorar o vigor híbrido ou a heterose das espécies progenitoras (Bartley et al., 2001). É uma forma de obter características desejáveis na primeira geração após o acasalamento, sem necessitar de um longo programa de melhoramento genético (Resende et al., 2010). Estas características podem significar maior ganho em peso em um menor período de tempo, aumento de tolerâncias ambientais e resistência às condições de cultivo (Bartley et al., 2001; Prado, 2012).

Embora as técnicas de reprodução induzida e incubação estejam compreendidas em várias espécies de peixes, o que contribui para a produção de híbridos, ainda há poucos relatos sobre os aspectos básicos da ontogenia destes híbridos (Faustino et al., 2010). Assim, aumentar o conhecimento sobre os aspectos ontogênicos de híbridos é crucial na compreensão e tomada de decisões no manejo em laboratórios de pisciculturas durante o processo de embriogênese e larvicultura.

É importante ressaltar que o escape de híbridos de pisciculturas para mananciais pode representar uma ameaça à integridade genética das populações locais pelo potencial risco de retrocruzamento e subsequente introgressão genética, sendo um dos problemas mais sérios enfrentados pelos países em todo o mundo. Os laboratórios de reprodução, porém, não possuem estrutura adequada para evitar os escapes de larvas, alevinos e até mesmo de indivíduos adultos para os rios (Abreu et al., 2009 e Bignotto et al., 2009). Este fato se torna agravante à medida que são demonstrados estudos comprovando a viabilidade reprodutiva destes híbridos (Ashikaga et al., 2010; Paes, 2011; Hashimoto et al., 2012). O conhecimento da ontogenia de híbridos como parte da cadeia produtiva permite a identificação tanto em pisciculturas como em mananciais, de escapes provindos dos laboratórios, facilitando no processo de conservação da variabilidade genética nos plantéis e na natureza, através da

não utilização destes indivíduos nos processos reprodutivos para que se mantenha a variabilidade genética, seja de indivíduos capturados da natureza, ou de indivíduos do plantel. Por outro lado, este conhecimento aplicado às espécies permite reproduzi-las para reposição na natureza através de soltura de animais nos mananciais, ou utilização dos indivíduos para reprodução nas pisciculturas, evitando sua extração do ambiente natural, além de contribuir para programas de melhoramento genético (Ninhaus-Silveira, 2006; Ponzetto, 2009).

### ***Pseudoplatystoma reticulatum* x *Leiarius marmoratus***

Na América Latina, bagres autóctones são propícios à exploração piscícola devido à sua qualidade de carne, demanda e preços de mercado, inclusive para exportação, além da intrínseca resistência ao clima (Pereira, 2006; Cruz-Casallas, 2010). Para isso, diversos grupos de pesquisa e instituições privadas tiveram como iniciativa desenvolver tecnologias de produção para aumentar a oferta de alevinos destas espécies (Mora & Kossowski, 2006; Bignotto et al., 2009; Foresti, 2009; Almeida, 2011). No entanto, o caráter piscívoro de algumas espécies (no caso, o gênero *Pseudoplatystoma*) conduziu à busca de peixes com hábito alimentar onívoro, como o *Leiarius marmoratus*, para a obtenção de híbridos, mantendo o fenótipo *Pseudoplatystoma* sp. e incorporando o hábito alimentar onívoro (Mora & Kossowski, 2006).

A conservação cromossomal de *P. reticulatum* no momento da reprodução com indivíduos do mesmo gênero é alta. Análises genéticas de indivíduos encontrados em mananciais são dificilmente identificadas como indivíduos puros ou híbridos, também pela caracterização do tegumento. Além disso, os indivíduos gerados de cruzamentos interespecíficos são férteis (Prado et al., 2012; Ponzetto et al., 2009).

A espécie *L. marmoratus*, apesar de ser essencialmente piscívora, possui facilidade em adaptar-se ao cativeiro e ao alimento inerte, diferenciando-a das espécies do gênero *Pseudoplatystoma*, pois se adapta rapidamente ao condicionamento alimentar (Marciales-Caro et al., 2011). Este autor preconiza o balanceamento da dieta, sendo essencial para que haja atendimento da exigência nutricional da espécie, evitando assim o canibalismo.

Em função deste contexto, estas espécies estão sendo utilizadas largamente por piscicultores para adquirir estas características de qualidade de carne e hábito alimentar, principalmente, conduzindo a ganhos de produção satisfatórios (Bignotto et al., 2009; Almeida, 2011).

### **Embriogênese**

O desenvolvimento embrionário em peixes fornece informações a respeito da morfologia na cronologia dos eventos durante o processo de desenvolvimento inicial, podendo servir de informação a pesquisas tanto para a piscicultura comercial quanto para a conservação de espécies ameaçadas

(Ganeco, 2003; Perini et al., 2009). Estudos da biologia reprodutiva de pimelodídeos brasileiros são escassos (Honji et al., 2012), embora haja estudos de estratégias de indução à reprodução (Leonardo et al., 2004; Crepaldi et al., 2006; Caneppele et al., 2009; Romagosa, 2010; Nogueira et al., 2012) e desenvolvimento embrionário das principais espécies utilizadas comercialmente e híbridos (Marques et al., 2008; Faustino et al., 2010; Honji et al., 2012; Nogueira et al., 2012). No entanto, não foi encontrado na literatura estudos sobre o desenvolvimento embrionário do cruzamento interespecífico entre *P. reticulatum* x *L. marmoratus*.

### **Descrição dos estádios iniciais de desenvolvimento**

A ontogenia inicial em peixes é definida do momento da fertilização até que a espécie atinja forma e hábitos semelhantes ao peixe adulto (Kendall et al., 1984). Os principais estádios que envolvem o desenvolvimento embrionário são: zigoto, clivagem, blástula, gástrula, segmentação e organogênese, larval e eclosão (Ninhaus-Silveira et al., 2006). Estes estádios podem ser representados por outras nomenclaturas dependendo da especificidade do estudo, ou da referência utilizada pelo autor, havendo adição ou supressão de etapas, como os relatos de Faustino et al. (2010) que acrescenta o estágio de mórula antes do estágio de blástula, e a segmentação é dividida em histogênese e organogênese. Quanto ao desenvolvimento larval, este pode ser representado pelos estádios de larva com saco vitelínico, larva pre-flexionada, larva flexionada, larva pós-flexionada e larva em transformação (Kendall et al., 1984).

O desenvolvimento embrionário ocorre a partir do contato de espermatozoide e ovócito, ocorrendo fusão celular dos núcleos destas células a partir do contato com a água. Na maioria dos teleósteos, a fertilização somente ocorre quando o espermatozoide entra na micrópila (Ganeco, 2003). A partir da fertilização, na fase de zigoto, iniciam-se movimentos citoplasmáticos em direção ao polo animal para formação do blastodisco. Oposto ao polo animal, o polo vegetal se forma com densos grânulos de vitelo (Honji et al., 2012). Uma camada de citoplasma cortical está presente neste estágio, cuja função é de elevar a camada de córion, encontrada na camada externa do embrião (Faustino et al., 2010).

Os ovos de peixe são classificados como telolécitos (apresentam o vitelo acumulado em uma das extremidades), tendo o polo animal uma simetria discoidal (em forma de disco) e com clivagem meroblástica (por ocorrer somente no polo animal) (Gilbert, 1997).

O período de clivagem se caracteriza pela divisão do blastodisco em blastômeros, dividindo sequencialmente, sem necessidade de contagem, pois cada divisão gera o dobro de blastômeros do estágio anterior (Kimmel et al., 1995).

A mórula forma-se quando o blastodisco se encontra com 64 ou mais células. Os blastômeros dispõem-se em camadas, mas não há um plano

definido de divisão; dando sequência, a blástula apresenta-se espessa, e os núcleos das células marginais migram para formar o periblasto (Iwamatsu, 2004), responsável pela interação entre o polo animal e vitelo.

Durante o estágio de gástrula, podem ser descritas importantes conformações. Primeiramente, ocorre a migração do polo animal sobre o vitelo, através de movimentos de epibolia. Formam-se duas camadas, o epiblasto que se direciona a favor do movimento de epibolia, e o hipoblasto, exercendo movimento contrário a este movimento e abaixo do epiblasto. Há formação do anel germinativo (dupla camada de células formando um aro em volta do embrião) aproximadamente quando a epibolia se encontra cobrindo 50% do vitelo, e do escudo embrionário (mais espesso, contendo cerca de 6 camadas) (Morrison et al., 2001). Ao final da gástrula (fim do movimento de epibolia), há espessamento de células que levam à formação da notocorda, formação do tampão vitelino e espessamento do epiblasto dorsal, acima da notocorda, que originará a placa neural (Ganeco, 2003).

Na segmentação, destacam-se as regiões cefálica e caudal, formam-se os somitos, a vesícula ótica e de Kupffer, o embrião se torna maior, alongando-se no eixo cabeça-cauda (Marques et al., 2008). A organogênese corresponde à formação de órgãos rudimentares, como o sistema digestivo rudimentar e identificação do prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo (Ninhaus-Silveira, 2006; Marques, 2008).

O período larval do desenvolvimento embrionário corresponde à identificação da cauda livre, possuindo 25 ou mais pares de somitos, e uma larva com formato que esteja pronta para eclodir, a notocorda está visível da região cefálica à cauda, e movimentos semelhantes a espasmos ocorrem (Ninhaus-Silveira et al., 2006).

A eclosão tem início quando há liberação de enzimas pela glândula da eclosão, que facilita a digestão do córion. A partir deste mecanismo, e da movimentação intensa da cauda da larva ainda dentro do córion, por atrito há rompimento do mesmo e a larva eclode (Morrison et al., 2001; Ninhaus-Silveira et al., 2006).

No estágio larval, a larva está com seus órgãos quase completos, bem como a morfogênese, ocorre inflação da bexiga natatória, a larva gradualmente começa a nadar com mais agilidade, ocorre a abertura da boca, há início de movimentos mandibulares, do opérculo, nadadeiras peitorais e olhos (Kimmel et al., 1995).

### **Considerações sobre o desenvolvimento embrionário e larval**

Estudos relatam preocupação à interferência humana e consequentes distúrbios ambientais provocados nos mananciais, seja através de construção de barragens, poluição da água, introdução de novas espécies ou sobrepesca (Ganeco, 2003; Marques et al., 2008; Perini et al., 2009;

Faustino et al., 2010; Honji et al., 2012; Nogueira et al., 2012) e desta forma estudam o desenvolvimento embrionário como forma de proteção às espécies.

A embriogênese auxilia na identificação de ovos e larvas coletados em ambientes naturais (Perini et al., 2009), e desta forma permite a avaliação precisa dos locais de desova (Reynalte-Tataje et al., 2009) pela identificação realizada, a fim de definir áreas de conservação, quando espécies são consideradas ameaçadas pelas variações do ambiente.

Para laboratórios de piscicultura, estudos da ontogenia inicial são essenciais para determinação dos eventos relacionados à fertilização, eclosão, e abertura de boca, sem os quais seria difícil determinar a eficiência do processo reprodutivo e o momento de fornecimento de alimento às larvas (Honji et al., 2012). Ainda, o sucesso da produção de peixes depende do conhecimento da fase inicial de desenvolvimento, que permite uma produção massal para que a espécie seja sistematicamente comercializada (Faustino et al., 2010).

Para teleósteos, existe um padrão no desenvolvimento embrionário que é observado para diversas espécies (*Oryzias latipes*, *Oreochromis niloticus*, *Rhamdia quelen*, *Steindachneridion parahybae*). Ovos de *Oryzias latipes* são transparentes, sendo fácil a visualização dos processos embrionários, além de auxiliar estudos de embriogênese por seguirem o padrão de desenvolvimento comum em teleósteos: zigoto, clivagem, blástula, gástrula, segmentação e organogênese, larval e eclosão (Iwamatsu, 2004). Essas etapas foram observadas por Landines et al. (2003) e Marques et al. (2008), apesar de alguns autores considerarem diversos estágios intermediários ou nomenclaturas diferentes em seus estudos (Kimmel et al., 1995; Morrison et al., 2001; Honji et al., 2012).

É comum que ocorram variações no desenvolvimento de peixes. Há desenvolvimento assíncrono (quando embriões dos estádios iniciais apresentam-se com diferente número de blastômeros em um mesmo tempo de coleta) em *Prochilodus lineatus* para indivíduos de uma mesma desova, quando a temperatura se mantém abaixo da faixa de temperatura ideal, gerando também embriões anômalos durante sua ontogenia. Quando o mesmo experimento ocorreu em temperaturas adequadas, essas alterações se mostraram reduzidas (Ninhaus-Silveira et al., 2006). O período de desenvolvimento aumenta caso a temperatura esteja abaixo da temperatura adequada para a espécie (Marques et al., 2008), bem como outros parâmetros ambientais também podem influenciar no desenvolvimento tanto embrionário como de formação dos gametas (Bonislawski, 2001; Weingartner, 2010). As variações no desenvolvimento embrionário podem ser reduzidas quando se busca atingir as condições ambientais ótimas para cada espécie, porém é difícil anular todos os fatores que influenciam essas variações, como qualidade física e físico-química da água e condições climáticas, sempre ocorrendo diferenças no desenvolvimento gonadal e embrionário (Ninhaus-Silveira, 2006).

No **Capítulo 2**, será apresentado o Artigo “Desenvolvimento embrionário e larval de *Leiarius marmoratus* e do híbrido *Pseudoplatystoma reticulatum* x *Leiarius marmoratus*: comparação e momentos críticos”. Neste trabalho, será descrita a ontogenia inicial de ambos os cruzamentos. Serão indicados os momentos críticos em que é exigida uma maior atenção na incubação, além de comparar características como o diâmetro do embrião e o comprimento da larva. Este trabalho visa contribuir ao conhecimento da biologia da espécie e do híbrido, auxiliando em projetos de cunho científico e comercial.

## HIPÓTESES

O embrião do híbrido *P. reticulatum* x *L. marmoratus* possui um espaço perivitelínico maior, comparado ao embrião de *L. marmoratus*?

O embrião do híbrido de *P. reticulatum* x *L. marmoratus* gera uma larva maior, possibilitando aquisição do alimento com maior facilidade?

## OBJETIVOS

### Geral

Descrever o desenvolvimento embrionário e larval do parental *Leiarius marmoratus* e do híbrido *Pseudoplatystoma reticulatum* x *Leiarius marmoratus*

### Específicos

- Realizar avaliações biométricas do espaço perivitelínico, do tamanho das larvas e quantificar o consumo de alimento exógeno;

- Determinar quais os pontos críticos no desenvolvimento de embriões e larvas de *L. marmoratus* e *P. reticulatum* x *L. marmoratus*, a fim de sugerir ações/metodologias que melhorem o manejo nos laboratórios de reprodução.



## **CAPÍTULO 2**

**Desenvolvimento embrionário e larval de *Leiarius marmoratus* (Gill, 1870) e do híbrido *Pseudoplatystoma reticulatum* (Eigenmann & Eigenmann, 1889) x *Leiarius marmoratus*: comparação e momentos críticos**

Diego de Oliveira<sup>1\*</sup>, Danilo Pedro Streit Junior<sup>1</sup>, Nívia Lothhammer<sup>1</sup>, Juliana Minardi Galo<sup>2</sup>, Leandro Cesar de Godoy<sup>1</sup>, Ligia Uribe Gonçalves<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Porto Alegre, RS.

<sup>2</sup> Instituto Federal de Rondônia, Ariquemes, RO.

<sup>3</sup> Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

\*diegodeoliveira1982@gmail.com

## **Resumo**

O conhecimento do desenvolvimento embrionário de peixes é essencial para o entendimento da biologia das espécies, desenvolvimento da cadeia produtiva e estudos de melhoramento genético e de tecnologias da reprodução de peixes. Assim, o objetivo deste trabalho foi descrever o desenvolvimento embrionário e larval do parental *L. marmoratus* e do híbrido *P. reticulatum* x *L. marmoratus*; verificar as etapas críticas durante o processo de desenvolvimento embrionário da espécie e do híbrido; comparar a distância perivitelínica dos embriões em relação ao córion; e comparar as larvas resultantes destes cruzamentos. Foram utilizados três indivíduos de cada parental, induzidos hormonalmente e realizada coleta de embriões. Os tempos para cada coleta foram de 10 em 10 minutos nas 6 primeiras horas, de 30 em 30 minutos até a eclosão da larva, e de 12 em 12 horas até a observação do consumo de alimento exógeno. Foram coletados 20 embriões e 20 larvas para cada tempo de coleta, e realizadas fotomicrografias em estereomicroscópio e em microscópio de luz utilizando cortes histológicos com coloração HE para análises. Os resultados revelaram o desenvolvimento ontogênico inicial de ambas as espécies, semelhante ao que ocorre em teleósteos, com o estágio de clivagem mostrando assincronia na divisão dos blastômeros, início da formação da camada sincicial de vitelo no estágio de mórula, gástrula com formação de anel vitelínico e escudo embrionário, abertura da boca da larva às 36 e 48 horas para espécie e híbrido, respectivamente. Em *L. marmoratus*, o

fechamento do blastóporo ocorreu 5,5 horas após a fertilização, e a eclosão das larvas ocorreu após 12,5 horas, e a temperatura média foi de  $27,98 \pm 0,06^\circ\text{C}$ . No híbrido, o fechamento do blastóporo ocorreu 6 horas após a fertilização, e a eclosão das larvas ocorreu após 13 horas, e a temperatura média foi de  $28,16 \pm 0,12^\circ\text{C}$ . As larvas do híbrido ( $6,36 \pm 0,69$  mm) foram em média 70% maiores quando comparadas às larvas de *L. marmoratus* ( $3,66 \pm 0,14$  mm). As larvas do híbrido iniciaram o consumo de alimento exógeno no quarto dia de desenvolvimento (72 horas após a eclosão), caracterizando a adaptação ao cativeiro, sendo observados náuplios de artêmia no trato digestivo das mesmas. Por outro lado, a larva de *L. marmoratus* apresentou uma redução no crescimento após a absorção do conteúdo do saco vitelínico, em função de não capturar o alimento exógeno, podendo inferir em um aparato bucal pequeno em relação ao tamanho do alimento fornecido.

**Palavras-chave:** larva, ontogenia inicial, jundiá amazônico, surubim cachara, reprodução.

**Embryonic and larval development of *Leiarius marmoratus* and of the hybrid *Pseudoplatystoma reticulatum* x *Leiarius marmoratus*: comparison and critical moments**

**Abstract**

The knowledge of the embryonic development of fish is essential to understanding the biology of the species, development of supply chain and studies of fish breeding and fish reproduction technologies. Thus, the objective of this study was to describe the embryonic and larval development of the parental *L. marmoratus* and of the hybrid *P. reticulatum* x *L. marmoratus*, verifying the critical steps in the process of embryonic development of species and hybrid; comparing the perivitelline distance of the embryos in relation to the corium, and comparing the resulting larvae from these crosses. Were used three individuals of each parental, hormonal induced and performed embryo collection. The times for each sample were 10 to 10 minutes in the first 6 hours, 30 to 30 minutes until the larvae eclosion, and 12 in 12 hours until the observation of the consumption of exogenous food. Were collected 20 embryos and 20 larvae for each sampling time and photomicrographs were taken with a stereomicroscope and light microscope using histological sections with HE staining for analysis. The results

revealed the initial ontogenetic development of both species, similar to what occurs in teleosts, with the cleavage stadium showing asynchrony in the division of blastomeres, the early formation of the yolk syncytial layer in the morula stage, gastrula with vitelline ring formation and embryonic shell formation, mouth opening of the larva at 36 and 48 hours for species and hybrid, respectively. In *L. marmoratus*, closing the blastopore occurred 5.5 hours after fertilization, and the larvae eclosion occurred after 12.5 hours, and the average temperature was  $27.98 \pm 0.06^\circ\text{C}$ . In the hybrid, closing the blastopore occurred 6 hours after fertilization, the larvae eclosion occurred after 13 hours, and the average temperature was  $28.16 \pm 0.12^\circ\text{C}$ . The larvae of the hybrid ( $6.36 \pm 0.69$  mm) were on average 70% higher when compared to the larvae of *L. marmoratus* ( $3.66 \pm 0.14$  mm). The larvae of the hybrid began exogenous food intake on the 4th day of development (72 hours after hatching), characterizing the adaptation to captivity, being observed brine shrimp nauplii in the digestive tract of them. On the other hand, the larva of *L. marmoratus* showed a reduction in growth after absorbing the yolk sac content, due to not trap exogenous food, and can infer in a small oral apparatus in relation to the size of the food provided.

**Keywords:** early ontogeny, Amazon catfish, surubim cachara, breeding

### **Introdução**

O jundiá amazônico (*Leiarius marmoratus* (Gill, 1870)) é uma espécie nativa das bacias dos rios Amazonas e Orinoco, abrangendo grande parte da América do Sul. Como características zootécnicas positivas destacam-se a tendência onívora, facilidade em adaptação ao consumo de alimento inerte, menor exigência nutricional proteica em relação a peixes carnívoros e boa qualidade da carne (Ramírez-Merlano et al., 2010; Mira et al., 2010).

O híbrido resultante do cruzamento *P. reticulatum* x *L. marmoratus*, mantém a tendência onívora como característica desejável do parental *L. marmoratus*, em detrimento do hábito carnívoro com elevado índice de canibalismo na fase larval do *Pseudoplatystoma reticulatum* (Eigenmann & Eigenmann, 1889). Embora *L. marmoratus* seja considerada uma espécie para diversificação da piscicultura em suas regiões endêmicas (Ramírez-Merlano et al., 2010), a participação no cruzamento interespecífico com *P. reticulatum*, principalmente no Brasil, torna a espécie valiosa por

gerar um híbrido comercial de alto valor no mercado (Almeida, 2011; Mateo, 2008). De todo modo, são escassas as informações sobre o *L. marmoratus*, principalmente sobre a biologia, o que dificulta a compreensão de sua ontogenia e por consequência obtenção de resultados zootécnicos satisfatórios.

Na formação do híbrido interespecífico, é usada a fêmea de *P. reticulatum*, pois os ovos de espécies do gênero em questão possuem diâmetro maior que os de *L. marmoratus* (Almeida, 2011), e os gametas masculinos são obtidos do macho de *L. marmoratus*, para obter as características desta espécie (Mateo, 2008). Ressalta-se a difícil extrusão dos gametas masculinos de *L. marmoratus*, que possui testículos que se assemelham a outros Siluriformes, com numerosas formações digitiformes que terminam no ducto espermático, dificultando a extrusão manual do sêmen (Viveiros, 2002).

A identificação de espécies pode ser feita através de ovos de peixes, porém muitas vezes os ovos são caracterizados erroneamente, sem considerar variações nas relações da espécie com seu habitat, como as diferenças existentes no período reprodutivo, tamanho individual do animal, desova total ou proteção à prole, idade do animal, dentre outras características (Bonislawska et al., 2001).

Informações sobre a embriologia são usadas em laboratórios de reprodução de peixes para acompanhar, identificar e avaliar o desenvolvimento dos embriões e larvas, o que pode ser aliado à mensuração das estimativas das taxas de fertilização e eclosão, proporcionando controle da produção nos laboratórios de reprodução de peixes (Amorim, 2009). Não há relatos na literatura científica sobre o desenvolvimento embrionário do cruzamento entre *L. marmoratus* e *P. reticulatum*, ou sobre a comparação entre o desenvolvimento de *L. marmoratus* e o híbrido gerado.

Este estudo teve por objetivo avaliar as características embrionárias e larvais do parental *L. marmoratus* e do híbrido *P. reticulatum* x *L. marmoratus*, identificar os momentos críticos no desenvolvimento embrionário de espécie e híbrido e verificar se existem características vantajosas do híbrido (*P. reticulatum* x *L. marmoratus*) em comparação à *L. marmoratus*.

## Material e métodos

A coleta de amostras foi realizada na Piscigranja Boa Esperança, município de Pimenta Bueno, estado de Rondônia, Brasil, coordenadas 11°41'50"S e 61°13'48"O. Foram selecionados animais durante o período reprodutivo das espécies utilizadas, compreendendo os meses de janeiro e fevereiro, no ano de 2011. Os reprodutores passaram por um período de restrição alimentar de três meses antes de iniciar a seleção, com uma taxa de arraçoamento de 0,5% do peso vivo ao dia e ração com 38% de proteína bruta. Houve diferença de 21 dias entre os cruzamentos de *L. marmoratus* e *P. reticulatum* x *L. marmoratus*.

Foram selecionados 2 indivíduos adultos de cada parental (2 fêmeas e 2 machos de *L. marmoratus* na primeira coleta de amostras, e duas fêmeas de *P. reticulatum* e dois machos de *L. marmoratus*, na segunda coleta). Características reprodutivas secundárias impostas pela maturação sexual foram verificadas para a escolha dos reprodutores, como a papila genital avermelhada e abaulamento da região ventral para as fêmeas e liberação de sêmen. Os animais utilizados estavam identificados com “microchips”, com acompanhamento reprodutivo dos últimos 4 anos, porém por serem animais selvagens não foi possível definir a idade dos mesmos. Os animais apresentaram os seguintes pesos médios: machos de *L. marmoratus*, 3,22±0,27 kg; fêmeas de *L. marmoratus*, 3,34±1,40 kg; fêmeas de *P. reticulatum*, 3,54±2,74 kg. Foi utilizado extrato bruto de hipófise de carpa (EHC) para indução hormonal, seguindo-se as recomendações de Woynarovich & Hórvath (1983).

Após liberação dos ovócitos através de massagem abdominal, realizou-se fertilização dos mesmos utilizando o sêmen de cada macho para fertilizar uma única fêmea. Os ovos de cada cruzamento foram pesados em balança de precisão e divididos e estocados em três incubadoras de 60 litros cada, na densidade de 1 g/L, totalizando 60 g em cada incubadora e seis incubadoras para cada cruzamento. As incubadoras foram mantidas com renovação de água constante de três litros por minuto, e temperatura média de 27,98±0,06°C para *L. marmoratus*, e 28,16±0,12°C para híbrido até o final das coletas.

Para avaliação do desenvolvimento embrionário, as amostragens foram realizadas no momento da liberação dos ovócitos, na fertilização e durante o processo

de desenvolvimento embrionário de 10 em 10 minutos até completar quatro horas; de 30 em 30 minutos até completar 13 horas e por fim no estágio larval de 12 em 12 horas até o completo consumo do saco vitelínico. Para cada coleta foram amostrados 20 embriões ou larvas para análise em estereomicroscópio, e 20 embriões ou larvas para análise histológica.

Para estimar as taxas de fertilização e eclosão, foram amostrados de cada incubadora dois recipientes e retirados 50 embriões ao acaso de cada recipiente, totalizando 600 embriões. A taxa de fertilização foi avaliada no momento de fechamento do blastóporo após 5,5 horas para *L. marmoratus* e 6 horas para *P. reticulata* x *L. marmoratus*, para aferir a eficiência da fertilização dos gametas. A taxa de eclosão foi avaliada uma hora antes da eclosão dos embriões, no momento em que foi observado movimento larval dentro do córion, determinando assim o desenvolvimento embrionário até o momento da eclosão e completo desenvolvimento da larva. Tanto a taxa de fertilização quanto a de eclosão foram calculadas pelo quociente de ovos viáveis e totais.

Trinta e seis horas após a eclosão iniciou-se alimentação exógena para as larvas de *L. marmoratus* e do híbrido com náuplios de artêmia (*Artemia spp.*) recém-eclodidos até o período final das coletas.

Das amostras coletadas de ovócitos, embriões e larvas, metade foram fixadas em formol tamponado a 10% e destinada para avaliação do desenvolvimento embrionário e larval em estereomicroscópio e a outra metade, fixadas em solução de Bouin por 6 horas, realizada tríplice lavagem com água destilada e armazenada em álcool 70% para avaliação histológica das estruturas em microscópio de luz.

As amostras coletadas que foram fixadas em formol tamponado a 10%, foram processadas em laboratório. Foi realizada a retirada do córion dos embriões com pinça histológica e agulha de relojoeiro para melhor visualização do desenvolvimento embrionário, e estes foram cuidadosamente lavados com formol tamponado a 4% para retirada de impurezas que pudessem prejudicar a visualização das etapas do desenvolvimento embrionário. As fotomicrografias foram obtidas com estereomicroscópio LABOMED CZM6 (15,6 a 48X) com auxílio de câmera Olympus serie S.

Foram identificados para cada cruzamento de parentais dez embriões viáveis (formação do polo vegetal e animal evidentes) a partir das coletas das fases de célula-ovo, blástula e gástrula, os quais foram utilizados para mensurar seu diâmetro e espaço perivitelínico. Os embriões ficaram estocados em solução de formol tamponado a 4%. A fórmula utilizada para determinar o espaço perivitelínico foi a seguinte (Bonislawska et al.(2001), adaptado):  $EP = (D-Dv)/2$ , onde EP= espaço perivitelínico, D= diâmetro do embrião, Dv= diâmetro do vitelo.

No período pós-eclosão foram avaliados o surgimento de novas estruturas, momento da abertura da boca e consumo de alimento exógeno (náuplios de artêmia) bem como o saco vitelínico, a fim de observar as diferenças existentes entre a espécie e o híbrido. Foram realizadas para cada tempo de coleta de larvas (eclosão, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 horas após a eclosão) cinco medições do comprimento da larva, além de comprimento e largura do saco vitelínico, transformando este em um elipsoide para determinar seu volume através da seguinte fórmula, descrita por Bonislawska et al.(2001), adaptado:  $V = 4/3*\Pi*a*b*c$ , onde V= volume do vitelo,  $\Pi = 3,1416$ , a= comprimento, b= largura e c= altura, em que a altura considerou-se congruente à largura devido à sua semelhança em dimensão.

Utilizando a técnica rotineira preconizada em laboratório, quinze amostras de cada parental em diferentes estádios foram fixadas em solução de Bouin (6 horas). Em seguida, foram lavadas por três vezes com água destilada e armazenadas em álcool 70°GL. As amostras sofreram desidratação em álcool 80, 90, 96 e 99°GL I e II e a seguir, lavagens de diafanização em xilol, imersão em parafina e blocagem em parafina.

Os blocos foram seccionados em 5µm, organizados em lâminas e secos em estufa a 37°C. Após, passaram por processo de extração da parafina em xilol, de hidratação em álcool 99, 96, 80 e 70°GL e água destilada para então receber os corantes de hematoxilina e eosina (HE). Após coloração, foram desidratados em álcool 80, 96, 99°GL I e II e colocados em xilol para então receber bálsamo canadense e lamínula. A análise histológica e fotodocumentação ocorreram em microscópio Olympus BX 41 (aumentos 200X e 400X), com auxílio de câmera Olympus serie S.

As biometrias das imagens foram obtidas a partir de uma adaptação dos recursos de medição do laboratório, com o auxílio de uma lâmina graduada colocada na



base da lupa ou microscópio e fotomicrografada nos diferentes aumentos em que foram realizadas a captura das imagens. Esta lâmina possui comprimento total na parte graduada de 1 milímetro (mm) e as divisões, de 10 $\mu$ m. Utilizando o software livre GNU Image Manipulation Program 2.8.2 (Kimbal et al., 1995), foi mensurado a quantidade de pixels (unidade de imagem) da lâmina graduada e também das imagens que foram analisadas. Com os tamanhos das imagens em pixels (tamanho do embrião, comprimento da larva, comprimento do vitelo, etc) e a quantidade de pixels da lâmina graduada, foi possível determinar as dimensões em unidade métrica.

### Resultados

A liberação dos ovócitos ocorreu 7 horas e 15 minutos após a segunda dose hormonal para a fêmea de *L. marmoratus* ( $T = 27,8 \pm 0,06^\circ\text{C}$ ) e 7 horas e 40 minutos para a fêmea de *P. reticulatum* ( $T = 28,8 \pm 0,12^\circ\text{C}$ ). O diâmetro médio dos ovócitos no momento da extrusão foi de  $776 \pm 0,03 \mu\text{m}$  e de  $1447 \pm 0,05 \mu\text{m}$  para *L. marmoratus* e *P. reticulatum*, respectivamente (Tab. 1).

O período embrionário até a eclosão para *L. marmoratus* foi de 12,5 horas. O fechamento do blastóporo (momento em que se quantifica a taxa de fertilização) ocorreu 5,5 horas após a fertilização (HAF) dos ovócitos, e a taxa de eclosão foi quantificada 11 HAF. Todavia para o híbrido, o período embrionário até a eclosão foi de 13 horas. O fechamento do blastóporo ocorreu 6 HAF e a taxa de eclosão ocorreu 11 HAF (Tab. 1).

TABELA 1. Médias e desvios-padrão dos diâmetros dos ovócitos, tempo para o fechamento do blastóporo, taxa de fertilização, tempo total do desenvolvimento embrionário à eclosão e taxa de eclosão no desenvolvimento embrionário de *L. marmoratus* e do híbrido *P. reticulatum* x *L. marmoratus*.

PARÂMETROS	Parentais	
	<i>L. marmoratus</i>	<i>P. reticulatum</i> x <i>L. marmoratus</i>
Diâmetro dos ovócitos ( $\mu\text{m}$ )	$776 \pm 0,03$	$1447 \pm 0,05$
Tempo para o fechamento do blastóporo (horas)	5,5	6
Taxa de fertilização (%)	39,6	17,9
Tempo total do desenvolvimento embrionário à eclosão (horas)	12,5	13
Taxa de eclosão (%)	16,7	15,6

Deve-se destacar que os ovos e embriões do híbrido possuíam maior espaço perivitelínico e diâmetro em todas as fases mensuradas (Tab. 2).

TABELA 2. Comparação de embriões de *L. marmoratus* e *P. reticulatum* x *L. marmoratus* quanto ao diâmetro e espaço perivitelínico (EP) (média e desvio-padrão).

	Diâmetro Total (mm)	EP (mm)
Embrião (Célula-ovo)		
<i>L. marmoratus</i>	1,177±0,266	0,128±0,105
<i>P. reticulatum</i> x <i>L. marmoratus</i>	1,985±0,112	0,273±0,046
Blástula		
<i>L. marmoratus</i>	1,616±0,094	0,261±0,061
<i>P. reticulatum</i> x <i>L. marmoratus</i>	2,550±0,518	0,529±0,266
Gástrula		
<i>L. marmoratus</i>	1,857±0,101	0,139±0,154
<i>P. reticulatum</i> x <i>L. marmoratus</i>	2,193±0,122	0,401±0,056

O aumento dos valores no comprimento total da larva foi verificado, à medida que o volume do saco vitelínico se reduzia (Fig. 1). Apesar da redução ao longo do tempo, ao final do desenvolvimento do híbrido o trato digestivo apresentou aumento de volume devido ao alimento consumido. Em contrapartida, no *L. marmoratus* houve uma tendência de estabilização do crescimento, provavelmente devido ao consumo quase total do conteúdo do saco vitelínico. No desenvolvimento larval, novas estruturas nas larvas foram facilmente identificadas, onde se notou o surgimento de barbilhões e pigmentação às 12 HAE (horas após a eclosão), abertura da boca às 36 HAE para *L. marmoratus* e às 48 HAE para híbrido a partir de visualização em estereomicroscópio, e formação do trato gastrintestinal (maior evidência na visualização do trato gastrintestinal em estereomicroscópio para híbrido a partir de 60 HAE) (Tab. 3).

Para os embriões, independente da origem *L. marmoratus* ou híbrido, o desenvolvimento embrionário foi semelhante, sendo identificados mais de um estágio para um mesmo período de coleta, principalmente durante as primeiras divisões do blastodisco até a fase de gástrula, por exemplo, eram encontrados embriões com quatro e oito células aos 50 minutos de desenvolvimento, como também estádios de mórula e blástula aos 140 minutos de desenvolvimento. Os ovos mostraram-se esféricos durante todo desenvolvimento, tipo demersal, com córion nítido translúcido e não foi identificada gota de lipídio durante o desenvolvimento. A coloração era amarelada no *L. marmoratus* e no híbrido.

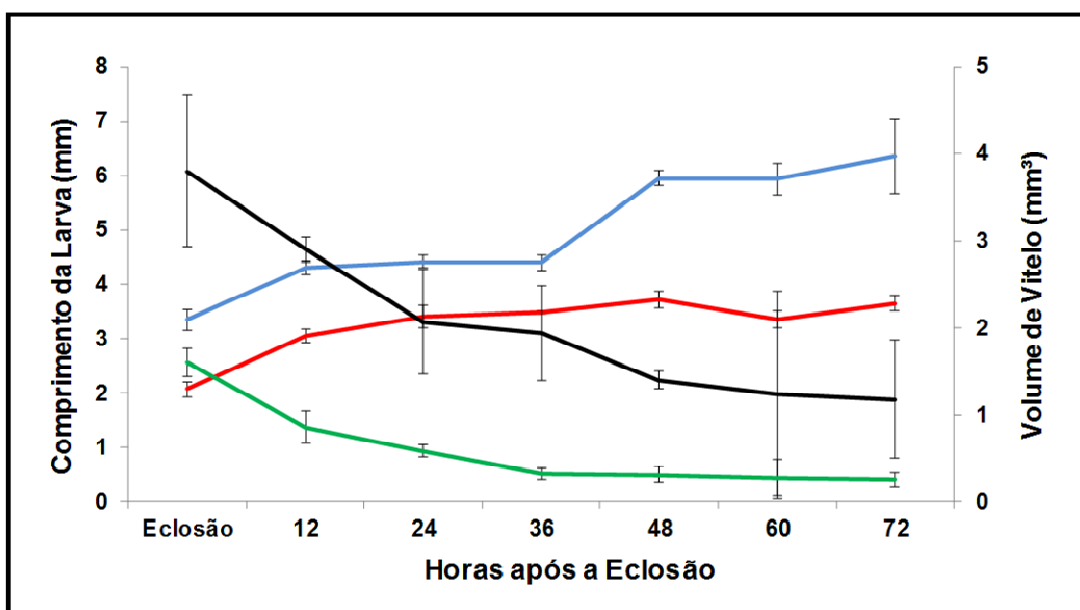


FIGURA 1. Representação das médias e desvios-padrão de comprimento de larvas e seus respectivos volumes do saco vitelínico, através do consumo de vitelo ao longo do tempo de *L. marmoratus* e *P. reticulatum* x *L. marmoratus*. —→ Comprimento de *L. marmoratus*; —→ Comprimento de *P. reticulatum* x *L. marmoratus*; —→ Volume de vitelo de *L. marmoratus*; —→ Volume de vitelo de *P. reticulatum* x *L. marmoratus*.

Houve formação de camada adesiva nos embriões de *L. marmoratus* 3 HAF, ocorrendo adesão dos ovos uns aos outros e à parede da incubadora. Para o híbrido, esta camada formou-se e os ovos aderiram à parede da incubadora após 1 HAF. Neste momento pode ser visualizada uma fina camada de um revestimento gelatinoso na superfície dos embriões, mostrando-se semi-aderente, devido à aderência de partículas à camada adesiva na análise em estereomicroscópio para as duas espécies. Não pode ser definido o grau e o tipo de adesividade dos ovos.

Entre 4 e 6 horas de incubação, foram registrados elevados números de ovos inférteis para as duas origens de parentais, o que refletiu nas baixas taxas de fertilização (39,6 e 16,7% para o *L. marmoratus* e híbrido) e eclosão (17,9 e 15,6% para *L. marmoratus* e híbrido).

No momento da fertilização, foi possível observar a formação do polo animal pela migração dos pró-núcleos masculino e feminino e citoplasma deslocado, basófilo e do polo vegetal formado por grânulos de vitelo, apresentando-se acidófilos. Nota-se também a presença de citoplasma cortical e alvéolos corticais, com características também basófilas, onde ocorreu a quebra dos alvéolos corticais e, conseqüentemente, elevação do córion (Fig. 2A e 2B).

TABELA 3. Descrição do desenvolvimento larval a partir da eclosão de *L. marmoratus* e do híbrido *P. reticulatum* x *L. marmoratus*.

Tempo (horas)	Cruzamento	
	<i>Leiarius marmoratus</i>	<i>P. reticulatum</i> x <i>L. marmoratus</i>
0 (eclosão)	Cauda solta e movimento natatório rápido; notocorda evidente; grande volume de vitelo.	Volume de vitelo se destacando em relação ao tamanho da larva; notocorda evidente.
12	Primeiros barbilhões rudimentares surgem; pigmentos nos olhos e ao longo do corpo	Primeiros barbilhões rudimentares surgem; pigmentos nos olhos e ao longo do corpo
24	Coluna vertebral é visível em função da transparência do embrião	Barbilhões aumentam em comprimento e se estendem paralelamente ao comprimento da larva, vestígios de abertura bucal
36	Abertura da boca; pigmentação aumenta no corpo e cabeça; barbilhões aumentam em tamanho e surge o segundo par de barbilhões, ainda rudimentares	Maior quantidade de pigmentos; barbilhões se estendem até o comprimento da abertura anal; segundo par de barbilhões é notável
48	Sinais de abertura do sistema digestório	Abertura da boca; redução brusca do saco vitelínico
60	Consumo total do conteúdo do saco vitelínico	Sistema digestório evidente e formado
72	Pigmentação intensa em todo corpo da larva	Saco vitelínico totalmente consumido; pigmentação intensa em todo corpo da larva
84	Larva com trato gastrointestinal vazio	Início da captura de alimento exógeno – presença de náuplios de artêmia no trato digestório (aproximadamente 10 náuplios)
96	-	Surgimento da nadadeira peitoral e desenvolvimento de raios da nadadeira caudal

Foram observados sete estádios no desenvolvimento de *L. marmoratus* e do híbrido, até a eclosão da larva, conforme apresentado a seguir:

**Célula-ovo ou blastodisco:** Da fertilização dos ovócitos até 30 MAF para *L. marmoratus* e até 20 minutos após a fertilização (MAF) para o híbrido (Fig. 2A, 2B) e nas (Fig. 3A, 4A). No polo animal formado (blastodisco) iniciou-se a clivagem.

**Clivagem:** se caracterizou como meroblástica (ou incompleta) e discoidal, além de um vitelo telolécito. Grânulos de vitelo foram encontrados nos blastômeros durante a divisão, indicando absorção de vitelo pelo polo animal (Fig. 5A e 6A), além de ser visualizada uma divisão entre o polo animal e o vegetal, mas sem uma barreira física.

O sulco da primeira clivagem foi observado do centro do blastodisco até a periferia, com aprofundamento até o limite do vitelo. Entre 30 e 40 MAF, dois blastômeros formados de tamanhos iguais encontravam-se ligeiramente alongados longitudinalmente (Fig. 3B e 4B). Na segunda clivagem, a partir de 40 MAF para o híbrido e 50 MAF para *L. marmoratus*, houve a formação de quatro blastômeros isométricos, ocorrendo a divisão dos dois blastômeros da fase anterior, em sentido

perpendicular à primeira clivagem. A divisão em oito blastômeros ocorreu pela divisão paralela à primeira divisão do blastodisco, a partir de 50 MAF, formando oito células. Dezesesseis células foram encontradas aos 60 MAF (quarta clivagem), a partir da divisão paralela à segunda clivagem, momento em que as células já apresentavam formatos irregulares. Aos 70 MAF foram encontradas 32 células, momento em que se observava um arranjo desalinhado dos blastômeros.

Mórula: com 80 MAF foi possível observar o polo animal inicialmente com 64 e em seguida com 128 células, notando-se desalinhamento dos blastômeros. Várias camadas foram observadas nesta fase, em um arranjo semelhante à metade de uma amora. A diferenciação de núcleos pôde ser visualizada histologicamente. A camada sincicial de vitelo teve início nesta fase, onde se observa a formação de um anel ao redor do blastodisco, ficando evidente para *L. marmoratus*, muito embora algumas células do embrião do híbrido eram mais basófilas que as células do blastodisco, indicando o início desta camada também para o híbrido (Fig. 3D, 4D, 5B, 6B).

Blástula: a determinação dos limites das células embrionárias no polo animal não era notada (Fig. 3E e 4E). A camada sincicial de vitelo se formou. Foram observados blastômeros limítrofes ao vitelo na divisão entre polo animal e vegetal, e estes foram responsáveis pela formação da camada sincicial de vitelo (ou periblasto). Este estágio teve início aos 140 MAF para *L. marmoratus* e 150 MAF para o híbrido.

Gástrula: O movimento de epibolia iniciou após 190 MAF no *L. marmoratus* e 220 MAF para híbrido, estendendo-se até 330 MAF e 390 MAF respectivamente, quando o vitelo encontrava-se totalmente coberto por células embrionárias, formando o saco vitelínico (Fig. 3F e 4F, respectivamente). Durante o estágio de gástrula, foi observada a presença da camada sincicial de vitelo entre o polo vegetal e o blastodisco; o surgimento do anel germinativo (Fig. 5C e 6C); o surgimento do escudo embrionário quando houve espessamento de determinada região do anel germinativo (região que originará a região dorsal do corpo da larva); e a formação de dois folhetos germinativos, o epiblasto e o hipoblasto, que é conduzido por um movimento contrário ao movimento de epibolia (movimento de migração), como indicado nas Fig. 5D e 6D (setas). Ainda, houve acúmulos celulares semelhantes às células do epiblasto e hipoblasto, possivelmente relacionados ao terceiro folheto

embrionário, denominado mesendoderma (Fig. 5E e 6E). As células deste folheto que se localizaram abaixo e centralmente ao escudo germinativo foram indicadas como mesoderma axial (Fig. 5F e 6F). Nesta região, quando o movimento de epibolia está com 90% de cobertura do vitelo, ocorreu um acúmulo de células que representariam a formação de um segundo eixo do embrião, conhecido como notocorda. Ao término da gastrulação, observou-se o início do espessamento do epiblasto dorsal, acima da notocorda formada. Esta região, denominada de placa neural, é um primórdio do sistema nervoso (Fig. 5E, 5F, 6E, 6F).

Segmentação: no espessamento do epiblasto dorsal observou-se a formação de um sulco que posteriormente fundiu a margem externa para formação do tubo neural (Fig. 5F e 6F). Ao lado da notocorda, originou-se o mesoderma para-axial, que na porção anterior originou a musculatura dos órgãos desta região, e na posterior representou a placa de segmentação que deu origem aos somitos (Fig. 5 F e G, 6 F e G). Na segmentação, ocorreu o surgimento das dobras subcefálica e subcaudal quando houve redução do vitelo e prolongamento da cauda, definindo assim a forma corporal da futura larva, além do aparecimento das vesículas óptica e de Kupffer e dos somitos (Fig. 3G e 4G, 5G e 6G). A identificação das diferentes formações do embrião para espécie e híbrido durante a organogênese ocorreu na seguinte sequência: cabeça, cauda, somitos, vesícula óptica, vesícula de Kupffer, além do alongamento da larva com o aumento das regiões cefálica e caudal. Este estágio estendeu-se do fechamento do blastóporo até a eclosão, aos 750 MAF para o jundiá e 780 MAF para híbrido.

Eclosão: a eclosão das larvas iniciou aos 750 MAF para *L. marmoratus* e em 780 MAF para o híbrido, estendendo-se aproximadamente por uma hora até o completo desprendimento do córion. Pela evaginação avançada da porção posterior do prosencéfalo foi possível observar claramente a presença da vesícula óptica (Fig. 5G e 6G). Neste momento a cauda do embrião estava desenvolvida, iniciando os movimentos da cauda, resultando na eclosão do mesmo (Fig. 3H e 4H). Na região posterior, próxima ao saco vitelínico, observou-se um cordão maciço de células, indicando um sistema digestório inicial (Fig. 5H e 6H).

As larvas de *L. marmoratus* atingiram menor comprimento e volume do saco vitelínico comparadas às de *P. reticulatum* x *L. marmoratus* no momento da

eclosão (Fig. 3H e 4H) e durante o desenvolvimento, como pode ser visualizado às 24 HAE (Fig. 1, 7A e 7B). As larvas de híbrido com 48 e 84 HAE, são maiores em relação a *L. marmoratus*, de acordo com o gráfico contido na Fig. 1 e nas Fig. 7C a 7F. A abertura da boca pôde ser visualizada às 36 HAE para *L. marmoratus* e 48 HAE para híbrido, permitindo a captura de alimento exógeno. Ainda, larvas de *L. marmoratus* não consumiram o alimento exógeno fornecido durante o desenvolvimento (Fig. 7E) comparando-as ao desenvolvimento do híbrido, como pode-se observar no trato digestivo recém-formado (Fig. 7F).

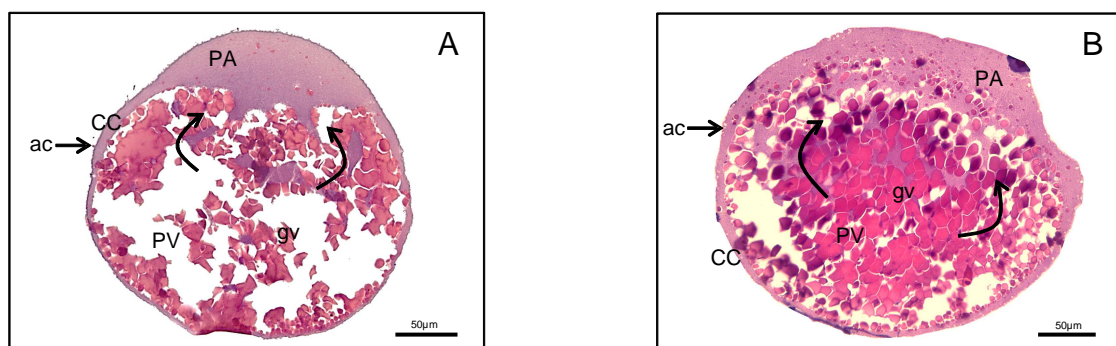


FIGURA 2. Ovos de *L. marmoratus* (A) e híbrido (B). Flechas indicam os movimentos dos pró-núcleos e citoplasma; PA – polo animal; PV – polo vegetal; CC – citoplasma cortical; ac→ – alvéolo cortical; gv – grânulo de vitelo. Microscopia de luz com HE.

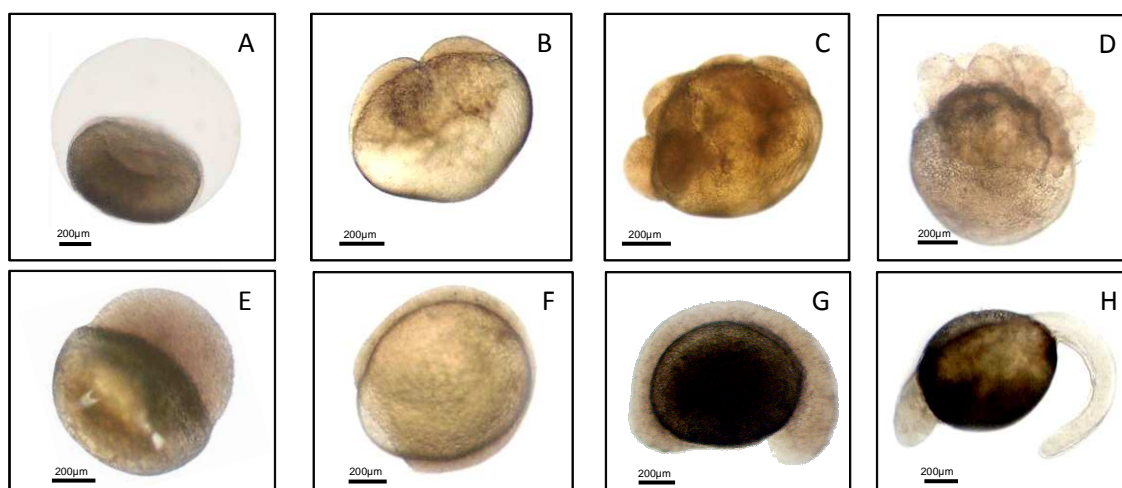


FIGURA 3. Desenvolvimento embrionário de *L. marmoratus*, da célula-ovo à eclosão (estereomicroscópio). A) Célula-ovo com a formação do blastodisco na parte superior do embrião. B) Fase de divisão do blastodisco com duas células. C) Blastodisco com dezesseis células. D) Estádio de mórula. E) Estádio de blástula. F) Estádio de gástrula com 90% do movimento de epibolia. G) Morfogênese do embrião com 8 horas de desenvolvimento. H) Larva recém-eclodida.

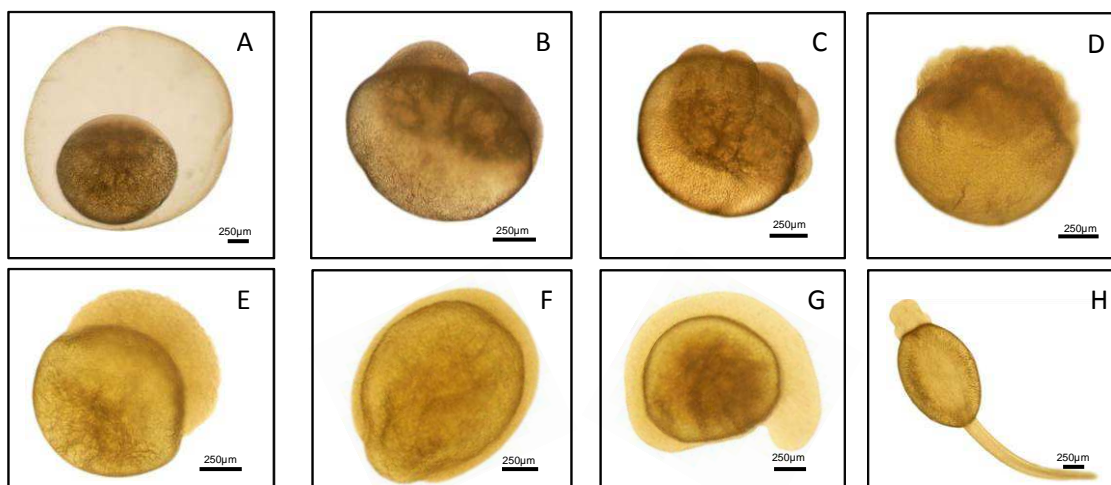


FIGURA 4. Desenvolvimento embrionário de *P. reticulatum* x *L. marmoratus*, da célula-ovo à eclosão (estereomicroscópio). A) Célula-ovo com a formação do blastodisco na parte superior do embrião. B) Fase de divisão do blastodisco com duas células. C) Blastodisco com oito células. D) Estádio de mórula. E) Estádio de blástula. F) Gastrulação com 90% do movimento de epibolia. G) Morfogênese do embrião com 8 horas de desenvolvimento. H) Larva recém-eclodida.

## Discussão

O período para liberação dos gametas femininos de espécie e híbrido experimentadas neste trabalho foi semelhante à maioria dos Siluriformes neotropicais migradores, em que o desenvolvimento ontogenético se completa em 200 a 300 horas-grau, como observado em *Pseudoplatystoma fasciatum* (Leonardo et al., 2004), *Steindachneridion parahybae* (Caneppele et al., 2009), *Zungaro jahu* (Nogueira et al., 2012) e *Rhinelepis aspera* (Perini et al., 2009).

Foi visualizado que os ovócitos de *L. marmoratus* e *P. reticulatum* eram esféricos, com coloração amarela e vitelogênicos, semelhantes a outras espécies de Siluriformes, como *Rhinelepis aspera* (Perini et al., 2009) e *Pimelodus maculatus* (Luz et al., 2001). Ovócitos de *L. marmoratus* no momento da extrusão eram menores comparados aos de *P. reticulatum*, sendo aproximadamente 50% inferior em relação ao diâmetro. O diâmetro médio dos ovócitos de *L. marmoratus* após extrusão foi 32% superior em relação ao descrito por Almeida (2011) para a mesma espécie. Da mesma forma, os ovócitos de *P. reticulatum* apresentaram diâmetros superiores em 36 a 94% em relação aos dados encontrados na literatura (Faustino et al., 2010; Almeida, 2011) com fêmeas de *P. corruscans*. As variações no diâmetro dos ovócitos estão relacionadas com as diferenciações de tamanho e idade das matrizes, alimentação durante o processo



de desenvolvimento gonadal, além das variações nos ovócitos existentes no próprio indivíduo (Bonislawska et al., 2001).

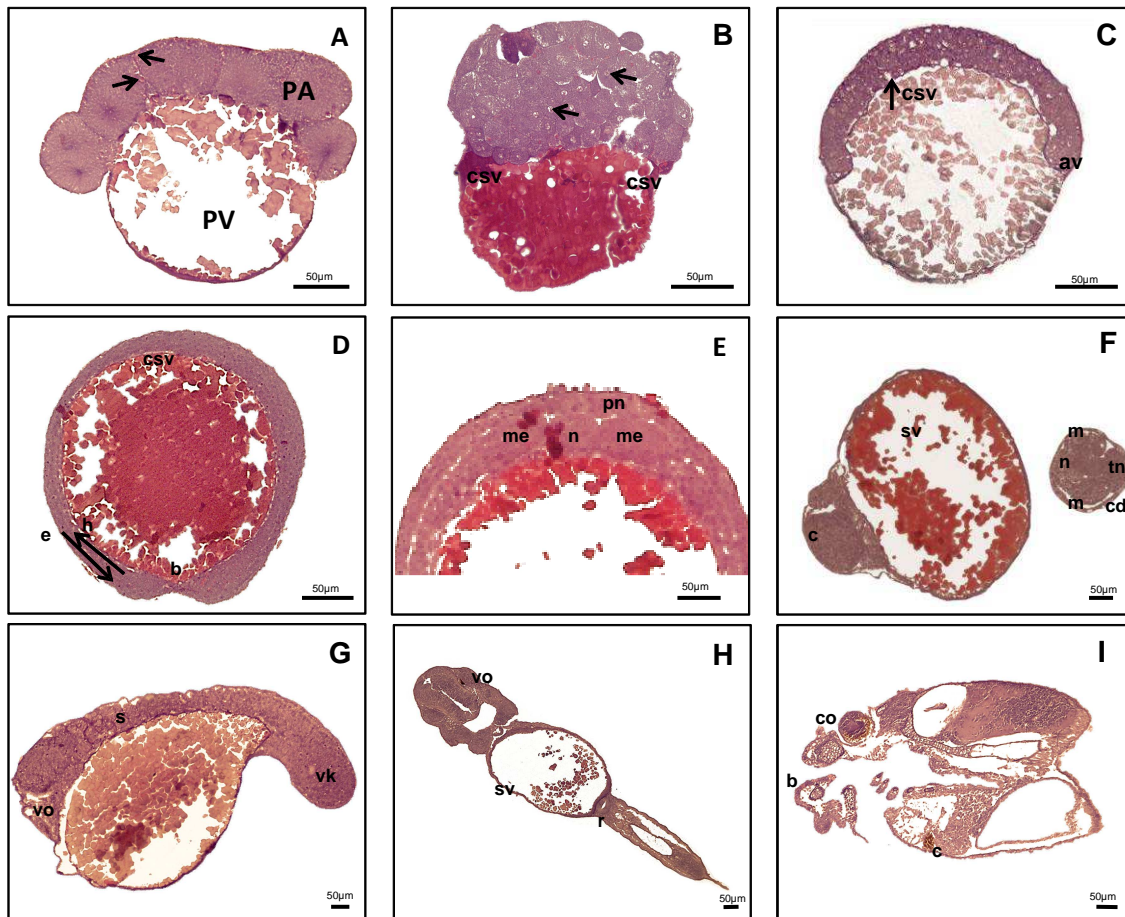


FIGURA 5. Desenvolvimento embrionário e larval de *L. marmoratus* analisadas sob microscopia de luz em HE. A –blastodisco mostrando grânulos de vitelo no polo animal (PA) (flechas) e o polo vegetal (PV); B – Estádio de mórula com visualizações dos núcleos no blastodisco (flechas); C – Gástrula, indicando o anel vitelínico (av) e a camada sincicial de vitelo (csv); D – Fechamento do blastóporo (b), com camada sincicial de vitelo, epiblasto (e), hipoblasto (h) e indicação dos movimentos de epibolia e migração; E – destaque para o fechamento do blastóporo, com formação do tampão vitelino indicando placa neural (pn), notocorda (n) e mesendoderma (me); F – momento da segmentação, indicando cabeça (c), cauda (cd) e saco vitelínico (sv), com destaque para notocorda (n), tubo neural (tn) e mesoderma para-axial (m); G – segmentação com 660 MAF destacando-se a vesícula de Kupffer (vk), a vesícula óptica (vo) e os somitos (s); H – corte da larva com 13 horas após a eclosão (HAE), com destaque para sistema digestivo rudimentar (r), vesícula óptica (vo) e saco vitelínico (sv); I – larva com 84 HAE, destacando o cálice óptico (co), o coração (c), a abertura da boca (b).

Os ovócitos de *P. reticulatum* apresentaram diâmetros superiores aos de *L. marmoratus*. Ovócitos maiores geram larvas maiores por possuírem maior quantidade de nutrientes, sendo em geral mais aptas para a busca e captura de alimento e na fuga de predadores (Coleman & Galvani, 1998; Brooks et al., 1997).

A partir da fertilização e concomitante a uma leve hidratação dos ovos, houve a quebra dos alvéolos corticais com a elevação do córion e a formação do blastodisco no polo animal, e oposto a este, o polo vegetal, com a coalescência de grânulos de vitelo como observado em outras espécies tropicais de água doce, como *Brycon orbignyanus* (Ganeco et al., 2008) e *Rhinelepis aspera* (Perini et al., 2009).

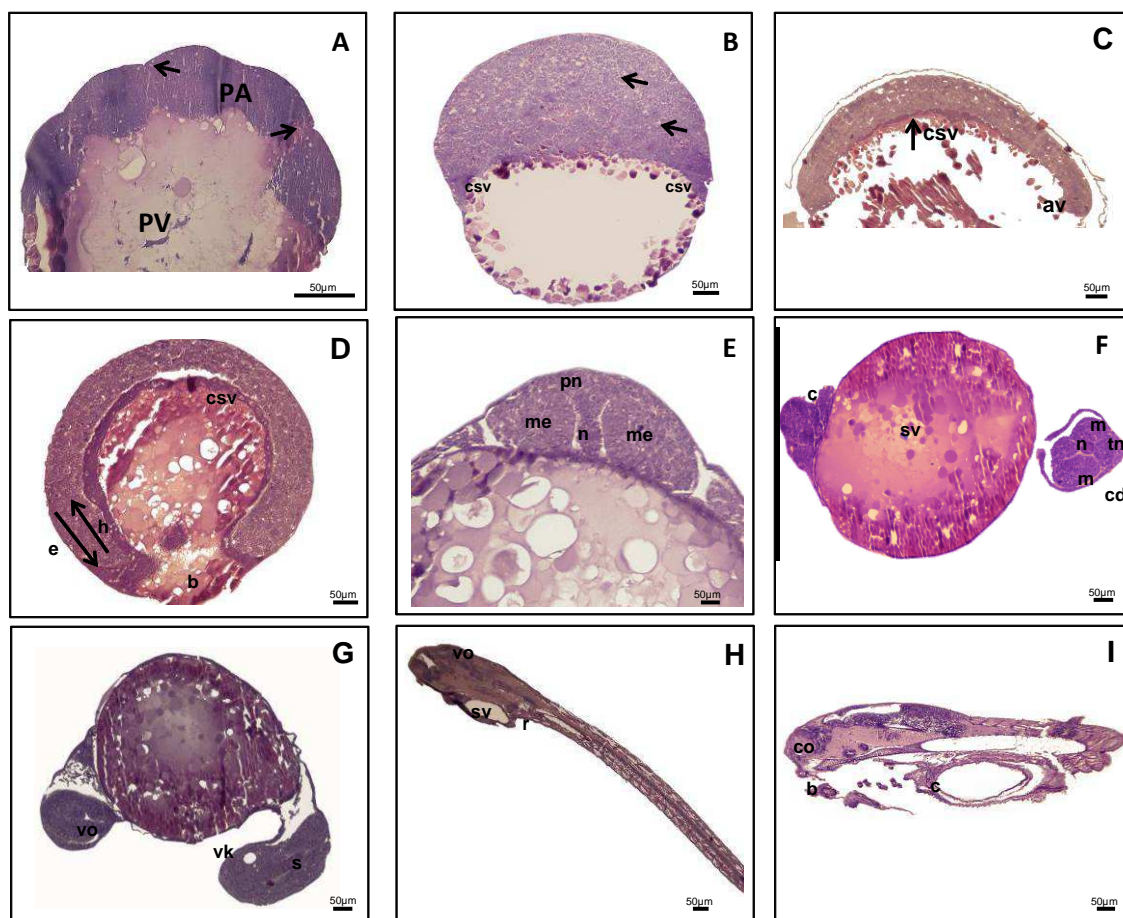


FIGURA 6. Desenvolvimento embrionário de *P. reticulatum* x *L. marmoratus*, analisadas sob microscopia de luz em HE. A – divisões do blastodisco indicando grânulos de vitelo no polo animal (PA) (flechas) e o polo vegetal (PV); B – Estádio de mórula com visualizações dos núcleos no blastodisco (flechas); C – Gástrula, indicando o anel vitelínico (av) e a camada sincicial de vitelo (csv); D – Fechamento do blastóporo (b), com camada sincicial de vitelo, epiblasto (e), hipoblasto (h) e indicação dos movimentos de epibolia e migração; E – destaque para o fechamento do blastóporo, com formação do tampão vitelino indicando placa neural (pn), notocorda (n) e mesendoderma (me); F – momento da segmentação, indicando cabeça (c), cauda (cd) e saco vitelínico (sv), com destaque para notocorda (n), tubo neural (tn) e mesoderma para-axial (m); G – segmentação com 11 horas de desenvolvimento destacando a vesícula de Kupffer (vk), a vesícula óptica (vo) e os somitos (s); H – corte da larva com 13 horas após eclosão, com destaque para sistema digestivo rudimentar (r), vesícula óptica (vo) e saco vitelínico (sv); I – larva com 84 horas após a eclosão, destacando o cálice óptico (co), o coração (c), a abertura da boca (b).

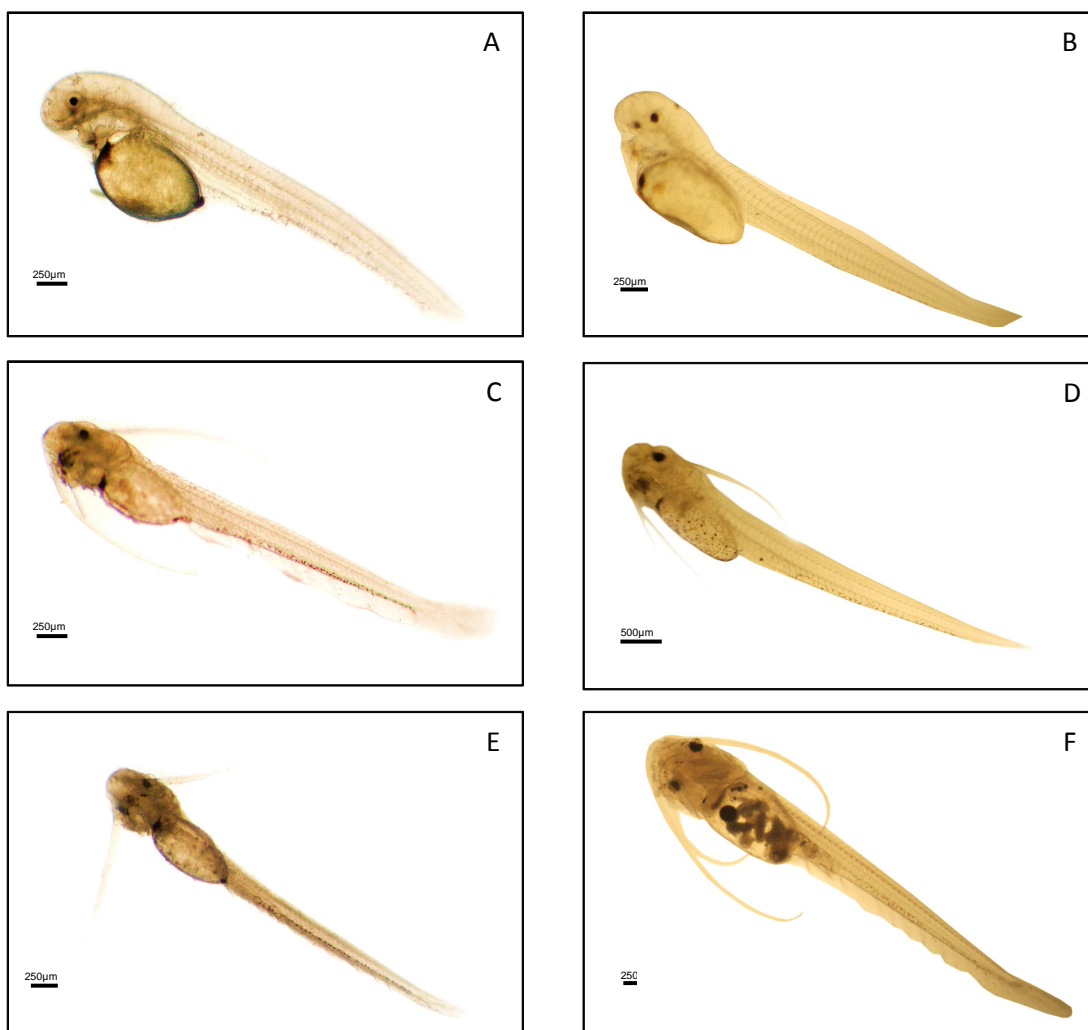


FIGURA 7. Desenvolvimento de larvas de *L. marmoratus* (A, C e E) e *P. reticulatum* x *L. marmoratus* (B, D e F) (estereomicroscópio). A, B) larvas de espécie e híbrido às 24 HAE; C, D) larvas de espécie e híbrido às 48 HAE; E, F) larvas de espécie e híbrido às 84 HAE com aparente consumo de alimento exógeno para a larva de *P. reticulatum* x *L. marmoratus*.

A maior proporção de vitelo com relação ao polo animal na célula-ovo classifica-a como polilécito, e a formação do blastodisco no polo animal indica que o ovo é telolécito. O padrão de clivagem e a posição da mesma classifica os ovos como meroblásticos discoidais (Hoar & Randall, 1988; Landines, 2003; Ninhaus-Silveira et al., 2006; Ganeco et al., 2008; Faustino et al., 2010; Almeida, 2011). Os ovos de *L. marmoratus* e do híbrido seguiram os padrões de divisão mencionados, que fica restrita ao polo animal, como é normalmente observado em peixes teleósteos (Leonardo et al., 2004; Ninhaus-Silveira et al., 2006; Perini et al., 2009).

A embriogênese foi observada em um período semelhante ao relatado por Almeida (2011), em que este autor observou o desenvolvimento do híbrido *P. corruscans* x *L. marmoratus* em 13 horas, e o de *L. marmoratus* em 14 horas. Fatores como temperatura, idade dos reprodutores e condições ambientais podem influenciar o momento da eclosão, como foi observado em trabalhos de ontogenia nas primeiras fases de vida do peixe, ao comparar diferentes temperaturas da água no desenvolvimento embrionário e larval de uma mesma espécie (Ninhaus-Silveira et al., 2006; Faustino et al., 2007; Marques et al., 2008; Buzollo et al., 2011).

A eclosão da larva de *L. marmoratus* às 12,5 HAF e do híbrido, 13 HAF são semelhantes ao encontrado para outras espécies e cruzamentos intergenéricos de Siluriformes *P. corruscans*, *P. corruscans* x *P. fasciatum*, *P. corruscans* x *L. marmoratus*, *P. maculatus* (Marques et al., 2008; Faustino et al., 2010; Almeida, 2011; Buzollo et al., 2011), apenas diferindo de *P. corruscans* (Landines et al., 2003) em que observou-se o tempo de eclosão das larvas em 18 horas a 26°C, e *P. maculatus* (Buzollo et al., 2011), em que a 25°C as larvas eclodiram com 18 horas após a fertilização.

Estruturas gelatinosas na superfície do córion foram identificadas durante o desenvolvimento embrionário pela visualização de partículas aderidas aos embriões, aderência na parede da incubadora e aderência dos ovos entre si, para espécie e híbrido. Ocorreu aderência dos ovos do híbrido a partir de 1 HAF, enquanto que em ovos de *L. marmoratus* a aderência ocorreu aos 180 MAF. A estrutura gelatinosa é definida como um arranjo superficial adesivo presente na camada sobre o córion, podendo variar entre as espécies a região em que se encontra no ovo, seja sobre o polo animal ou sobre toda a superfície do córion. As estruturas gelatinosas têm como função aderir ao substrato, de forma aderente ou semi-aderente, em plantas, raízes, madeiras, rochas, para que ocorra o desenvolvimento embrionário quando não há cuidado parental protegendo o embrião da correnteza (Rizzo et al., 2002); servem para facilitar o cuidado parental (Melo et al., 2011). Desta forma, a camada gelatinosa protege o embrião contra choques mecânicos, porém no presente trabalho, em que ocorreu semi-adesividade formando uma massa de ovos, houve prejuízo aos mesmos pela falta de oxigenação. Essa substância adesiva também foi observada nos ovos de *Rhinelepis aspera* (Perini et al., 2009), assim como,

nos ovos de *P. corruscans* x *P. fasciatum* e *P. corruscans* x *L. marmoratus* que também aderiram à parede da incubadora ou entre si (Faustino et al., 2007; Almeida, 2011).

O espaço perivitelínico do embrião do híbrido foi 50% superior em relação à *L. marmoratus*. Contudo, ovos de *L. marmoratus* e *P. reticulatum* x *L. marmoratus* apresentam espaço perivitelínico congruente ao encontrado para outras espécies de siluriformes, como em ovos de *R. aspera* (Perini et al., 2009) e nos ovos de *L. marmoratus* e do híbrido *P. corruscans* x *L. marmoratus*, por Almeida (2011). Alguns Characiformes migradores possuem maior proporção no espaço perivitelínico comparado ao volume de vitelo, quando comparado a Siluriformes, por seu desenvolvimento ocorrer em ambientes lóticos, como ocorre nas espécies *Prochilodus lineatus* (Ninhaus-Silveira et al., 2006), *Piaractus mesopotamicus* (Fornari et al., 2010) e *B. orbignyanus* (Reynalte-Tataje et al., 2004).

Kossakowski (2012) revisou 34 espécies de peixes e notou que o tamanho da larva recém-eclodida não possui relação direta com o tamanho do ovo. Desta forma, os ovos com reduzido espaço perivitelínico encontrados neste trabalho indicam maior proporção de vitelo em seus volumes totais, e por consequência na larva recém-eclodida, o que gerará larvas aptas a enfrentar o ambiente em que se desenvolverão (Ganeco, 2003).

As taxas de fertilização e eclosão encontradas foram consideradas baixas (39,6% e 16,7 para *L. marmoratus* e 17,9 e 15,6 para *P. reticulatum* x *L. marmoratus*), e podem ter sido influenciadas por fatores como: má formação dos gametas, qualidade da água de incubação, volume de água para hidratação dos ovos, agregação dos ovos devido à formação de camada adesiva dificultando a oxigenação dos ovócitos, dentre outros. Além desses fatores, o volume de água, o tempo gasto para ativação dos gametas e o tempo que a água de ativação permanece no recipiente em que a fertilização está ocorrendo podem influenciar a taxa de fertilização em ovos de peixes (Weingartner, 2010). As induções hormonais nas fêmeas de *L. marmoratus* foram realizadas no final do período reprodutivo, originando desovas tardias, prejudicando os ovócitos por estarem em fase de regressão, e conseqüentemente a formação das larvas foi afetada. Fêmeas de *P. fasciatum* no final do período reprodutivo têm redução de gametas viáveis

à reprodução ao final do período reprodutivo por estes estarem em fase de regressão (Romagosa, 2010), o que poderia explicar as baixas taxas de fertilização e eclosão.

A primeira clivagem para espécie e híbrido dividiu o blastodisco em dois blastômeros, iniciando a divisão no topo do blastodisco, ao centro, se estendendo até a divisão com o vitelo, como visualizado em *B. orbignyanus* (Ganeco, 2003). Os blastômeros eram de igual tamanho, corroborando com Luz et al. (2001), Botero et al. (2004), Ninhaus-Silveira et al. (2006), Pereira et al. (2006), observado em *P. maculatus*, *P. brachypomus* x *C. macropomum*, *P. lineatus* e *R. quelen*, respectivamente. Nas divisões subsequentes, os blastômeros aumentaram em número e diminuíram em tamanho. A partir da quarta divisão, os blastômeros apresentaram variações em tamanho e formato, o que também foi notado em outros estudos de desenvolvimento embrionário (Luz et al., 2001; Ninhaus-Silveira et al., 2006; Faustino et al., 2007; Marques et al., 2008; e Perini et al., 2009).

Neste trabalho, o arranjo observado na formação de 16 células foi o de 4 linhas com 4 blastômeros por linha, seguindo com 32 células, 4 linhas com 8 blastômeros por linha, assim como o verificado em *S. parahybae* (Honji, 2012) e *P. corruscans* (Marques et al., 2008). Por outro lado, algumas espécies como *B. orbignyanus* possuem 4 blastômeros centrais e 12 periféricos para o estágio de 16 células, sendo que com 32 blastômeros, este arranjo apresenta-se com 8 células em duas camadas centrais e 24 células marginais (Ganeco, 2003).

No início da divisão dos blastômeros, notou-se que o desenvolvimento embrionário apresentava-se assíncrono. Dois ou três estádios puderam ser visualizados em cada momento de coleta, em que havia embriões com 2, 4 e 8 células aos 40 MAF, 16 e 32 aos 70 MAF, mórula e blástula aos 120 MAF e blástula e gástrula aos 160 MAF, tanto para híbrido quanto para espécie. Com *P. lineatus*, o desenvolvimento embrionário foi assíncrono à temperatura de 24°C, enquanto o desenvolvimento apresentou-se homogêneo a 28°C (Ninhaus-Silveira et al., 2006). Diferentes estádios de desenvolvimento embrionário foram observados para o mesmo período em *P. corruscans*, indicando a ocorrência de assincronia para outras espécies de Siluriformes (Marques et al., 2008).

A formação da camada sincicial de vitelo na fase de mórula pode ser observada, enquanto que em espécies como *R. aspera* observa-se esta formação na fase de blástula (Perini et al., 2009). A camada sincicial de vitelo surge da divisão incompleta dos blastômeros (Perini et al., 2009) e é fundamental para que os nutrientes contidos no vitelo sejam transferidos por meio desta camada para alimentar o processo de embriogênese, atingindo assim a blastoderma (Ninhaus-Silveira et al., 2007). É importante salientar que apesar da camada sincicial de vitelo constituir um órgão, essa não faz parte da formação do corpo do embrião, apenas servindo de “ponte” para a passagem de nutrientes (Kimmel et al., 1995; Ganeco, 2003).

No estágio de blástula, a camada sincicial de vitelo formou-se na base do blastodisco; iniciou-se leve migração dos blastômeros periféricos sobre o vitelo, sugerindo o início do movimento de epibolia (Kimmel et al., 1995 e Ninhaus-Silveira et al., 2006), movimento este que continua na fase de gástrula. Espaços irregulares na blastoderma foram observados através de histologia, como relatado em *B. orbignyanus* (Ganeco, 2003), porém nessa espécie se encontravam entre as células do blastodisco, enquanto que no presente estudo ocorreram abaixo da blastoderma, como ocorre à maioria dos teleosteos. Após estes eventos, fica evidente o movimento de epibolia, em que há o envolvimento da blastoderma em torno do vitelo, desenvolvimento do anel germinativo e do escudo embrionário. Estes eventos podem ser verificados em outros estudos de desenvolvimento embrionário com *Pimelodus maculatus* (Buzollo, 2011), e com *L. marmoratus*, *P. corruscans* e seus híbridos (Almeida, 2011).

As fases do movimento de epibolia se caracterizaram pela porcentagem de cobertura do vitelo. Com aproximadamente 50% de cobertura, iniciou-se um movimento contrário ao movimento de avanço sobre o vitelo, formando assim duas camadas, o epiblasto e o hipoblasto, para espécie e híbrido. Este movimento foi observado também em algumas espécies de peixes e ocorreu até o fechamento do blastóporo. Cada camada de células terá sua função na formação dos órgãos da futura larva (Kimmel et al., 1995; Ninhaus-Silveira et al., 2006; Marques et al., 2008; Perini et al., 2009; Faustino et al., 2010).

O sistema nervoso central formou-se a partir da ectoderme, coincidindo com a formação deste sistema nos demais teleosteos (Kimmel, 1995). No fechamento do

tampão vitelino, formou-se uma espessa camada, podendo ser visualizada por meio de cortes histológicos a placa neural (Ganeco, 2003). Tecidos mesodermis formaram-se ao final do estágio de gástrula para formação dos órgãos da parte anterior da larva e dos somitos, paralela e lateralmente à notocorda, da mesma forma como foi observado por Marques et al. (2008), Faustino et al. (2010), Buzollo et al. (2011), Faustino et al. (2011).

O processo de eclosão ocorre devido a um conjunto de fatores, iniciando pela glândula da eclosão, que secreta enzimas (corionases) que desencadeiam processos para digestão do córion, sendo interdependente de fatores ambientais, cujos principais são a temperatura e o oxigênio dissolvido (Kossakowski, 2012). Após o desprendimento da cauda que estava presa ao saco vitelínico, outro fator é agregado ao processo de eclosão, a energia cinética gerada pela larva (Fraysse et al., 2006). Após a eclosão, houve aumento em comprimento das larvas e redução do diâmetro do saco vitelínico de ambos cruzamentos, uma vez que, o vitelo é consumido pela larva para o crescimento, o mesmo foi verificado em estudos com *P. corruscans* (Landines et al., 2003) e *Z. jahu* (Nogueira et al., 2012).

O surgimento dos barbilhões foram identificados às 12 HAE, e a abertura bucal às 36 e 48 HAE, para *L. marmoratus* e híbrido. Landines et al. (2003) observou que a abertura bucal ocorreu às 24 HAE e os primeiros barbilhões surgiram às 36 HAE para *P. corruscans*. Por outro lado, em *Z. jahu*, a abertura bucal foi observada às 15 HAE, e os barbilhões já estavam presentes às 6 HAE (Nogueira et al., 2012). O aparecimento dos barbilhões estão relacionados à busca de alimentos (Guimarães-Cruz, 2009; LeClair & Topczewski, 2010) pois são órgãos sensitivos, principalmente em espécies que habitam o fundo de rios, onde o ambiente possui pouca ou nenhuma luminosidade.

O híbrido iniciou a alimentação exógena com a captura de náuplios de artêmia entre 72 e 84 HAE. Como não foi observada a captura de alimento exógeno por *L. marmoratus*, este consumiu praticamente toda a reserva vitelínica e o crescimento mostrou-se reduzido após o conteúdo do saco vitelínico esgotar-se. Para *P. fasciatum*, a atresia nos gametas femininos afetou as taxas de fertilização, eclosão, e a sobrevivência de larvas, gerando larvas menores e inaptas ao desenvolvimento (Leonardo, 2006).



Ainda, o tamanho dos náuplios de artêmia pode ter prejudicado *L. marmoratus*, que não conseguiu capturá-los devido ao tamanho reduzido de sua boca. O fornecimento de alimentação exógena como pequenos rotíferos pode ser o ponto chave para o sucesso desta espécie, uma vez que o fornecimento da alimentação inicial adequada é fundamental nos primeiros dias de vida da larva (Côrtes & Tsuzuki, 2010).

### Referências

ALMEIDA, I. R. O. **Análise do desenvolvimento embrionário de espécimes provenientes dos cruzamentos interespecíficos entre *Pseudoplatystoma corruscans* e *Leiarius marmoratus***. 2011. 129 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

BONISLAWSKA, M. et al. Fish egg size variability: biological significance. **Electronic Journal of Polish Agricultural Universities: Fisheries**, v. 4, n. 2, 2001.

BOTERO, M. et al. Descripción del desarrollo embrionario de zigotos híbridos obtenidos por el cruce de machos de Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*) y hembras de Cachama Negra (*Colossoma macropomum*). **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 17, supl., 2004.

BROOKS, S.; TYLER, C. R.; SUMPTER, J. P. Egg quality in fish: what makes a good egg? **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 7, p. 387-416, 1997.

BUZOLLO, H. et al. Structural analysis of the *Pimelodus maculatus* (Lacépède, 1803) embryogenesis (Siluriformes: Pimelodidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 9, n. 3, p. 601-616, 2011.

CANEPPELE, D. et al. Induced spawning of the endangered Neotropical species *Steindachneridion parahybae*. **Neotropical Ichthyology**, v. 7, n. 4, p. 759-762, 2009.

COLEMAN, R. M. and GALVANI, A. P. Egg size determines offspring size in neotropical cichlid fishes (Teleostei: Cichlidae). **Copeia**, v. 1998, n. 1, p. 209-213, 1998.

CÔRTEZ, G. F.; TSUZUKI, M. Y. Efeito do tamanho do rotífero na sobrevivência e no crescimento de neon gobi *Elacatinus figaro* durante as fases iniciais de larvicultura. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 36, n. 3, p. 205-212, 2010.

FAUSTINO, F. et al. Fertilização e desenvolvimento embrionário: morfometria e análise estereomicroscópica dos ovos dos híbridos de surubins (pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* x cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum*). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 29, n. 1, p. 49-55, 2007.

FAUSTINO, F. et al. Structural and ultrastructural characterization of the embryonic development of *Pseudoplatystoma* spp. Hybrids. **International Journal of Developmental Biology**, v. 54, p. 723-730, 2010.

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.

FORNARI, D. C. et al. Freezing injuries in the embryos of *Piaractus mesopotamicus*. **Zygote**, v. 19, p. 345-350, 2010.

FRAYSSE, B.; MONS, R.; GARRIC, J. Development of a zebrafish 4-day embryonal bioassay to assess toxicity of chemicals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 63, p. 253-267, 2006.

GANECO, L. N. **Análise dos ovos de piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849), durante a fertilização e desenvolvimento embrionário, sob condições de reprodução induzida.** 2003. 78 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura). Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista.

GANECO, L. N.; FRANCESCHINI—VICENTINI; I. B.; NAKAGHI, L. S. O. Structural analysis of fertilization in the fish *Brycon orbignyanus*. **Zygote**, n. 17, p. 93-99, 2008.

HOAR, W. S. and RANDALL, D. J. **Fish Physiology: The Physiology of Developing Fish (Part A: Eggs and Larvae).** Academic Press (London), v. 11, 546p, 1988.

KIMBALL, S.; MATTIS, P. **GNU Image Manipulation Program**, v. 2.8.2. Free Software Foundation, 2012.

KIMMEL, C. B. et al. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Developmental Dynamics**, v. 203, p. 253-310, 1995.

KOSSAKOWSKI, M. K. Fish hatching strategies: a review. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 22, p. 225-240, 2012.

LANDINES, M. A. et al. Desenvolvimento embrionário do pintado (*Pseudoplatystoma corruscans* Agassiz, 1829). **Boletim Técnico do CEPTA**, v.16, p. 1-13, 2003.

LECLAIR, E. E.; TOPCZEWSKI, J. Development and regeneration of the zebrafish maxillary barbel: a novel study system for vertebrate tissue growth and repair. **Plos One**, v. 5, n.1, 2010.

LEONARDO, A. F. G. et al. Induced spawning of hatchery-raised Brazilian catfish, cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766). **Aquaculture**, n. 240, p. 451-461, 2004.

LEONARDO, A. F. G. et al. Occurrence and significance of ovarian and follicular regression in cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766): a histology approach. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária**, v. 58, n. 5, p. 831 – 840, 2006.

LUZ, R. K. et al. Desenvolvimento embrionário e estágios larvais do mandi-amarelo *Pimelodus maculatus*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 27, n. 1, p. 49 - 55, 2001.

MARQUES, C. et al. Observation of the embryonic development in *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) under light and scanning microscopy. **Zygote**, v. 16, p. 333-342, 2008.

MATEO, F. J.; Delgado, N. & López, H. Caracterización Morfométrica del Híbrido Yaque Pintado (*Pseudoplatystoma fasciatum* x *Leiarius marmoratus*) y sus Progenitores (Siluriformes: Pimelodidae). **Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias**, Maracay, v. 49, n. 1, p. 47-60, 2008.

MELO, R. M. C. et al. Comparative Morphology of the Gonadal Structure Related to Reproductive Strategies in Six Species of Neotropical Catfishes (Teleostei: Siluriformes). **Journal of Morphology**, v. 272, p. 525-535, 2011.

MIRA, L. T. M.; MEDINA-ROBLES, V. M.; CRUZ-CASALLAS, P. E. Testicular Morphology of Yaque *Leiarius marmoratus* (Pisces: Siluridae) in Maturity Reproductive Stage. **International Journal of Morphology**, v. 28, n. 2, p. 421-426, 2010.

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

NINHAUS-SILVEIRA, A. et al. Structural and ultrastructural characteristics of the yolk syncytial layer in *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Teleostei; Prochilodontinae). **Zygote**, v. 15, p. 267–71, 2007.

NOGUEIRA, L. B. et al. Induced spawning and early ontogeny in hatchery-reared catfish *Zungaro jahu* (Siluriformes:Pimelodidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 10, n. 1, p. 89-98, 2012.

PEREIRA, C. R. et al. Embryonic and larval development of jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard, 1824, Pisces, Teleostei), a southern American catfish. **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, n. 4, p. 1057-1063, 2006.

PERINI, V. R. et al. Biology of eggs, embryos and larvae of *Rhinelepis aspera* (Spix & Agassiz, 1829) (Pisces: Siluriformes). **Zygote**, v. 18, p. 159-171, 2009.

RAMÍREZ-MERLANO, J. A. et al. Utilización de organismos vivos como primera alimentación de larvas de yaque (*Leiarius marmoratus*) bajo condiciones de laboratorio. **Orinoquia**, v. 14, n. 1, p. 45-58, 2010.

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.

RIZZO, E. et al. Adhesiveness and surface patterns of eggs in neotropical freshwater teleosts. **Journal of Fish Biology**, v. 61, p. 615-632, 2002.

ROMAGOSA, E. Reproductive status in females of the Brazilian catfish, *Pseudoplatystoma fasciatum* reared in cages. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 26, n. 5, p. 806-811, 2010.

VIVEIROS, A. T. M. et al. Hand-stripping of semen and semen quality after maturational hormone treatments, in African catfish *Clarias gariepinus*. **Aquaculture**, n. 213, p. 373-386, 2002.

WEINGARTNER, M. **Aperfeiçoamento das técnicas de fertilização de ovócitos de dourado, *Salminus brasiliensis* Cuvier, 1816 (Characiformes: Characidae), utilizando sêmen fresco e congelado durante o processo de reprodução induzida.** 2010. 81 f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina.

## **CAPÍTULO 3**

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O diâmetro do ovócito de *P. reticulatum* apresentou-se 50% superior em relação à *L. marmoratus*, podendo constatar maior conteúdo de vitelo para os embriões do híbrido gerado. O vitelo será utilizado durante o desenvolvimento larval, principalmente, quando o principal alimento ainda é o endógeno (saco vitelínico), podendo inferir em maior reserva energética do híbrido e melhor desenvolvimento com relação a *L. marmoratus*. Com relação ao espaço perivitelínico, este também se apresentou 50% superior no híbrido em relação à espécie, podendo sugerir maior resistência mecânica do híbrido com relação a *L. marmoratus*.

Este é um dos primeiros estudos comparativos sobre o desenvolvimento embrionário de *L. marmoratus* e do híbrido *P. reticulatum* x *L. marmoratus*, um peixe comercial altamente aceito no mercado.

Estudos de microscopia eletrônica de varredura são altamente recomendados para trabalhos atuais em embriologia, o que não descarta que futuramente seja utilizada esta técnica para descrição da ultraestrutura do desenvolvimento embrionário destes cruzamentos.

A partir da definição do alimento adequado para o tamanho do aparato bucal de *L. marmoratus*, gerando uma quantidade de larvas suficiente para sua comercialização, o condicionamento alimentar a ser definido deve ser planejado, com alimentação inicial de alimentos vivos (cladóceros, rotíferos) passando por proteína animal como coração ou fígado de bovino, e gradual passagem à ração propriamente dita.

Foi possível definir os momentos em que é exigida maior atenção do produtor no manejo durante a incubação dos embriões, para que seja realizada a conferência do desenvolvimento em seus devidos tempos, seja para estimar a taxa de fertilização ou de eclosão, realizar a limpeza das incubadoras após a eclosão, bem como o momento de abertura bucal para início do fornecimento de alimento exógeno.

Este trabalho visa contribuir com a cadeia produtiva e com trabalhos que forem desenvolvidos a partir destes cruzamentos ou de outros híbridos, identificando problemas no momento da incubação de ovos tanto para a espécie quanto para o híbrido. A adequação do manejo no cultivo de organismos em cativeiro é importante para a eficiência da produção, gerando economia para o produtor e é visada neste trabalho, bem como a contribuição para a biologia da espécie *L. marmoratus*. Projetos direcionados à não proliferação de híbridos, também serão auxiliados pelos dados deste trabalho, por ilustrar material para identificação de organismos originados do cruzamento entre parentais (*L. marmoratus* e *P. reticulatum*).

## REFERÊNCIAS

- ABREU, M. M. et al. Genetic variability of two populations of *Pseudoplatystoma reticulatum* from the Upper Paraguay River Basin. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 32, n. 4, 868-873, 2009.
- ALMEIDA, I. R. O. **Análise do desenvolvimento embrionário de espécimes provenientes dos cruzamentos interespecíficos entre *Pseudoplatystoma corruscans* e *Leiarius marmoratus***. 2011. 129 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Instituto de Biociências de Botucatu, Botucatu, Universidade Estadual Paulista.
- ASHIKAGA, F. Y. et al. Invasão dos Híbridos em Águas Continentais Brasileiras. **Boletim da Sociedade Brasileira de Limnologia**, Rio Claro, v. 38, n. 2, p. 1-5, 2010.
- BARAS, E.; JOBLING, M. Dynamics of intracohort cannibalism in cultured fish. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 33, p. 461-479, 2002.
- BARTLEY, D. M.; RANA, K; IMMINK, A. J. The use of inter-specific hybrids in aquaculture and fisheries. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, London, v. 10, p. 325–337, 2001.
- BIGNOTTO, T. S. et al. Genetic divergence between *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum* (Siluriformes: Pimelodidae) in the Paraná River Basin. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 69, n.2, p. 681-689, 2009.
- BONCOMPAGNI-JÚNIOR, O. et al. Reproductive biology of *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Pisces: Prochilodontidae) in São Francisco River, Brazil. **Journal of Applied Ichthyology**, Hamburg, v. 29, n. 1, p. 132-138, 2013.
- BONISLAWSKA, M. et al. Fish egg size variability: biological significance. **Electronic Journal of Polish Agricultural Universities: Fisheries**, Breslávia, v. 4, n. 2, 2001. Disponível em: <<http://www.ejpau.media.pl/volume4/issue2/fisheries/art-02.html>>. Acesso em: 27 fev. 2013.
- BUITRAGO-SUÁREZ, U. A.; BURR, B. M. Taxonomy of the catfish genus *Pseudoplatystoma* Bleeker (Siluriformes: Pimelodidae) with recognition of eight species. **Zootaxa**, Auckland, n. 1512, p. 1–38, 2007.
- CANEPPELE, D. et al. Induced spawning of the endangered Neotropical species *Steindachneridion parahybae*. **Neotropical Ichthyology**, São Paulo, v. 7, n. 4, p. 759-762, 2009.
- CAROLSFELD, J. et al. **Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation status**. Washington: The International Bank for Reconstruction and Development : The World Bank, 2003.

CREPALDI, D. V. et al. O surubim na aquicultura do Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 30, n. 3/4, p. 150-158, 2006.

CRUZ-CASALLAS, N. E. et al. Desempeño productivo del yaque (*Leiarius marmoratus* Gill, 1870) bajo diferentes densidades de siembra en estanques en tierra. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, Medellín, n. 23, p. 325-335, 2010.

FAUSTINO, F. et al. Fertilização e desenvolvimento embrionário: morfometria e análise estereomicroscópica dos ovos dos híbridos de surubins (pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* x cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum*). **Acta Scientiarum Biological Science**, Maringá, v. 29, n. 1, p. 49-55, 2007.

FAUSTINO, F. et al. Structural and ultrastructural characterization of the embryonic development of *Pseudoplatystoma* spp. Hybrids. **International Journal of Developmental Biology**, Vizcaya, v. 54, p. 723-730, 2010.

FERRARIS, C. J. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes, Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. **Zootaxa**, Auckland, n. 1418, p. 340-342, 2007.

GANECO, L. N. **Análise dos ovos de piraicanjuba, *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849), durante a fertilização e desenvolvimento embrionário, sob condições de reprodução induzida.** 2003. 78 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

GILBERT, S. F. **Biologia do desenvolvimento.** 5. ed. Ribeirão Preto: FUNPEC Editora, 2003.

GUERREIRO, L. R. J. **Custos de produção, análise econômica e gerencial em unidade de produção de alevinos de peixes reofílicos: estudo de caso em Rondônia.** 2012. 141 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

HASHIMOTO, D. T. et al. Interspecific fish hybrids in Brazil: management of genetic resources for sustainable use. **Reviews in Aquaculture**, Richmond, v. 4, n. 2, p. 108-118, 2012.

HONJI, R. M. et al. Embryonic development and larval stages of *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae) – implications for the conservation and rearing of this endangered Neotropical species. **Neotropical Ichthyology**, São Paulo, v. 10, n. 2, p. 313-327, 2012.

KENDALL, A. W.; AHLSTROM, E. H.; MOSER, H. G. Early life history of fishes and their characters. In: ONTOGENY and systematics of fishes. New York: American Society of Ichthyologists and Herpetologists, 1984. p. 11-22. (Special publication, 1).



LANDINES, M. A. et al. Desenvolvimento embrionário do pintado (*Pseudoplatystoma corruscans* Agassiz, 1829). **Boletim Técnico do CEPTA**, Pirassununga, v.16, p. 1-13, 2003.

LAYMAN, C. A. et al. Body size and trophic position in a diverse tropical food web. **Ecology**, Washington, v. 86, n. 9, p. 2530–2535, 2005.

LUZ, R. K. et al. Desenvolvimento embrionário e estágios larvais do mandimarelo *Pimelodus maculatus*. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 49-55, 2001.

MARCIALES-CARO, L. J. et al. Adaptation to a commercial diet alters post-larvae growth and development of striped catfish (*Pseudoplatystoma sp*) and yaque (*Leiarius marmoratus*). **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, Medellín, n. 24, p.179-190, 2011.

MARQUES, C. et al. Observation of the embryonic development of *Pseudoplatystoma corruscans* under light and scanning electron microscopy. **Zygote**, Cambridge, n. 16, p. 333-342, 2008.

MIRA, L. T. M.; MEDINA-ROBLES, V. M.; CRUZ-CASALLAS, P. E. Testicular Morphology of Yaque *Leiarius marmoratus* (Pisces: Siluridae) in Maturity Reproductive Stage. **International Journal of Morphology**, Temuco, v. 28, n. 2, p. 421-426, 2010.

MIRA, L. T. M.; MEDINA-ROBLES, V. M.; CRUZ-CASALLAS, P. E. Evaluación de tres protocolos hormonales para la inducción de la espermiación en yaque *Leiarius marmoratus*. **Revista MVZ Córdoba**, Córdoba, v. 15, n. 2, p. 2070-2077, 2010a.

MORA, J. A.; KOSSOWSKI, C. Reproducción inducida del bagre yaque, *Leiarius marmoratus*, (Gil, 1870) con aplicación de LHRHa. In: CONGRESO VENEZOLANO DE PRODUCCIÓN E INDUSTRIA ANIMAL, 13., 2006, Caracas, Venezuela. **Anales...** Mérida, Venezuela: Univeridad de Los Andes, 2006.

MORA SÁNCHEZ, J. A. Avances y perspectivas de la producción comercial de bagres em Venezuela. **El Aquicultor**, Maracay, v.5, p. 9-14, 2003.

MORA SÁNCHEZ, J. A.; MOYETONES, F.; CERDÁ, M. J. Influencia del contenido proteico en el crecimiento de alevines de bagre yaque, *Leiarius marmoratus*, alimentados con concentrados comerciales. **Zootecnia Tropical**, Maracay, v. 27, n. 2, p. 187-194, 2009.

NELSON, J. S. **Fishes of the world**. 4th ed. New York, USA: John Wiley e Sons, 2006. 622 p.

NINHAUS-SILVEIRA, A.; FORESTI, F.; AZEVEDO, A. Structural and ultrastructural analysis of embryonic development of *Prochilodus lineatus*

(Valenciennes, 1836) (Characiforme; Prochilodontidae). **Zygote**, Cambridge, n. 14, p. 217–229, 2006.

NOGUEIRA, L. B. et al. Induced spawning and early ontogeny in hatchery-reared catfish *Zungaro jahu* (Siluriformes:Pimelodidae). **Neotropical Ichthyology**, São Paulo, v. 10, n. 1, p. 89-98, 2012.

PAES, A. D. N. V. A. **Caracterização citogenética das espécies matrinxã (*Brycon amazonicus*), piraputanga (*Brycon hilarii*) e sua geração filial, utilizados na piscicultura Brasileira**. 2011. 97 f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.

PERINI, V. R. et al. Biology of eggs, embryos and larvae of *Rhinelepis aspera* (Spix & Agassiz, 1829) (Pisces: Siluriformes). **Zygote**, Cambridge, v. 18, p. 159-171, 2009.

PONZETTO, J. M. et al. Reprodução induzida de híbridos de siluriformes em cativeiro: potencialidades e ameaças à reprodução das espécies nativas. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNESP, 21., 2009, São José do Rio Preto. **Anais...** São José do Rio Preto: UNESP, 2009.

PRADO, F. D. et al. Cytogenetic characterization of F1, F2 and backcross hybrids of the Neotropical catfish species *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum* (Pimelodidae, Siluriformes). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 35, n. 1, p. 57-64, 2012.

RAMÍREZ-MERLANO, J. A. et al. Utilización de organismos vivos como primera alimentación de larvas de yaque (*Leiarius marmoratus*) bajo condiciones de laboratorio. **Orinoquia**, Villavicencio, v. 14, n. 1, p. 45-58, 2010.

REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. **Checklist of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. 729 p.

RESENDE, E. K. et al. **Melhoramento animal no Brasil: uma visão crítica espécies aquáticas**. Embrapa, 2010. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/24561/1/5.pdf>>. Acesso em: 03 mar. 2013.

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**, Maringá, v. 26, n. 1, p. 67-71, 2004.

ROMAGOSA, E. et al. Biologia reprodutiva de fêmeas de cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei, Siluriformes, Pimelodidae), mantidas em cativeiro. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 151-159, 2003.

ROMAGOSA, E. Avanços na reprodução de peixes migradores. In: AQUACIÊNCIA 2008: tópicos especiais em biologia aquática e aquicultura III. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, 2010. 335 p. Cap. 1.

ROTTA, M. A. **Processo de estruturação de sistema de mensuração de desempenho numa cadeia de suprimentos**: um caso da aquicultura continental. 2009. 354 f. Tese (Doutorado em Agronegócios) - Centro de Estudos e Pesquisas em Agronegócios, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

SIDONIO, L. et al. Panorama da aquicultura no brasil: desafios e oportunidades. **BNDES Setorial: Agroindústria**, Rio de Janeiro, v. 35, p. 421-463, 2012.

TORRICO, J. P. et al. Molecular phylogeny of the genus *Pseudoplatystoma* (Bleeker, 1862): Biogeographic and evolutionary implications. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 51, p. 588-594, 2009.

VIVEIROS, A. T. M. et al. Hand-stripping of semen and semen quality after maturational hormone treatments, in African catfish *Clarias gariepinus*. **Aquaculture**, Amsterdam, n. 213, p. 373-386, 2002.

WOYNAROVICH, E; HÓRVATH, L. **A propagação artificial de peixes de águas tropicais**: manual de extensão. Brasília: FAO: CODEVASF: CNPq, 1983. 220 p.

ZANIBONI FILHO, E., WEINGARTNER, M. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 3, p. 367-373, 2007.

## ANEXOS

### Anexo 1

## INSTRUÇÕES AOS AUTORES

### **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** *(Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences)*

#### **Política Editorial**

O periódico *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science)*, ISSN 0102-0935 (impresso) e 1678-4162 (on-line), é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de artigos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal, aquacultura e áreas afins.

Os artigos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os artigos cujos textos necessitarem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ) citado como *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva ao ABMVZ.

#### **Reprodução de artigos publicados**

A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciado. Não é permitido o uso comercial dos resultados.

A submissão e tramitação dos artigos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico <[www.abmvz.org.br](http://www.abmvz.org.br)>.

Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis nos endereços [www.scielo.br/abmvz](http://www.scielo.br/abmvz) ou [www.abmvz.org.br](http://www.abmvz.org.br).

#### **Orientação para tramitação de artigos**

- Toda a tramitação dos artigos é feita exclusivamente pelo Sistema de publicação on-line do ABMVZ no endereço [www.abmvz.org.br](http://www.abmvz.org.br).
- Apenas o autor responsável pelo artigo deverá preencher a ficha de submissão, sendo necessário o cadastro do mesmo no Sistema.
- Toda comunicação entre os diversos atores do processo de avaliação e publicação (autores, revisores e editores) será feita exclusivamente de forma eletrônica pelo Sistema, sendo o autor responsável pelo artigo informado, automaticamente, por e-mail, sobre qualquer mudança de status do artigo.
- A submissão só se completa quando anexado o texto do artigo em Word e em pdf no campo apropriado.
- Fotografias, desenhos e gravuras devem ser inseridas no texto e também enviadas, em separado, em arquivo com extensão jpg em alta qualidade (mínimo 300dpi),

zipado, inserido no campo próprio.

- Tabelas e gráficos não se enquadram no campo de arquivo zipado, devendo ser inseridas no corpo do artigo.
- É de exclusiva responsabilidade de quem submete o artigo certificar-se de que cada um dos autores tenha conhecimento e concorde com a inclusão de seu nome no mesmo submetido.
- O ABMVZ comunicará, via eletrônica, a cada autor, a sua participação no artigo. Caso pelo menos um dos autores não concorde com sua participação como autor, o artigo será considerado como desistência de um dos autores e sua tramitação encerrada.

### **Tipos de artigos aceitos para publicação:**

- **Artigo científico**

É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Filiação, Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 15, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 30.

- **Relato de caso**

Contempla principalmente as áreas médicas, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Filiação, Resumo, Abstract, Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes), Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 10, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

- **Comunicação**

É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental, dignos de publicação, embora insuficientes ou inconsistentes para constituírem um artigo científico.

O texto, com título em português e em inglês, Autores e Filiação deve ser compacto, sem distinção das seções do texto especificadas para "Artigo científico", embora seguindo aquela ordem. Quando a Comunicação for redigida em português deve conter um "Abstract" e quando redigida em inglês deve conter um "Resumo".

O número de páginas não deve exceder a 8, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

### Preparação dos textos para publicação

Os artigos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal. Para ortografia em inglês recomenda-se o *Webster's Third New International Dictionary*. Para ortografia em português adota-se o *Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa*, da Academia Brasileira de Letras.

### Formatação do texto

- O texto **NÃO** deve conter subitens em qualquer das seções do artigo e deve ser apresentado em Microsoft Word, em formato A4, com margem 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), em fonte Times New Roman tamanho 12 e em espaçamento entrelinhas 1,5, em todas as páginas e seções do artigo (do título às referências), com linhas numeradas.
- Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.

### Seções de um artigo

- **Título.** Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 150 dígitos.
- **Autores e Filiação.** Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. O autor para correspondência e seu e-mail devem ser indicados com asterisco.

#### Nota:

1. o texto do artigo em Word deve conter o nome dos autores e filiação.
  2. o texto do artigo em pdf **NÃO** deve conter o nome dos autores e filiação.
- **Resumo e Abstract.** Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 2000 dígitos incluindo os espaços, em um só parágrafo. Não repetir o título e não acrescentar revisão de literatura. Incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação. Atenção especial às conclusões.
  - **Palavras-chave e Keywords.** No máximo cinco.
  - **Introdução.** Explanação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência e relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, suficientes para balizá-la.
  - **Material e Métodos.** Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Nos trabalhos que envolvam animais e/ou organismos geneticamente modificados deverá constar, obrigatoriamente, o número do protocolo de aprovação do Comitê de Bioética e/ou de Biossegurança, quando for o caso.
  - **Resultados.** Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.
    - ✓ *Tabela.* Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. O título da



tabela recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Tabela 1.). No texto a tabela deve ser referida como Tab seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Tab. 1), mesmo quando se referir a várias tabelas (ex.: Tab. 1, 2 e 3). Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (o menor tamanho aceito é 8). A legenda da Tabela deve conter apenas o indispensável para o seu entendimento. As tabelas devem ser, obrigatoriamente, inseridas no corpo do texto preferencialmente após a sua primeira citação.

- ✓ *Figura.* Compreende qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema, etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Figura 1.) e é referida no texto como Fig seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Fig.1), mesmo se referir a mais de uma figura (ex.: Fig. 1, 2 e 3). Além de inseridas no corpo do texto, fotografias e desenhos devem também ser enviadas no formato jpg com alta qualidade, em um arquivo zipado, anexado no campo próprio de submissão na tela de registro do artigo. As figuras devem ser, obrigatoriamente, inseridas no corpo do texto preferencialmente após a sua primeira citação.

**Nota:**

- ✓ Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve figurar nas Referências.
- **Discussão.** Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer das partes e sem subitens).
- **Conclusões.** As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada e serem apresentadas de forma objetiva, **SEM** revisão de literatura, discussão, repetição de resultados e especulações.
- **Agradecimentos.** Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.
- **Referências.** As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética, dando-se preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. Livros e teses devem ser referenciados o mínimo possível, portanto, somente quando indispensáveis. São adotadas as normas gerais ABNT, **adaptadas** para o ABMVZ conforme exemplos:

**Como referenciar:**

**1. Citações no texto**

- A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:
  - ✓ autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88)
  - ✓ dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974)

- ✓ mais de dois autores: (Ferguson *et al.*, 1979) ou Ferguson *et al.* (1979)
- ✓ mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson *et al.* (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson *et al.*, 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.

- *Citação de citação.* Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão **citado por** e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências, deve-se incluir apenas a fonte consultada.
- *Comunicação pessoal.* Não fazem parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

**2. Periódicos** (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):  
 ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

**3. Publicação avulsa** (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte.* 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.



**4. Documentos eletrônicos** (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critical6.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. Miami Herald, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerd-Summit-RelatedArticles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.

**Nota:**

- Artigos que não estejam rigorosamente dentro das normas acima não serão aceitos para avaliação.
- O Sistema reconhece, automaticamente, como “Desistência do Autor” artigos em diligência e/ou “Aguardando liberação do autor”, que não tenha sido respondido no prazo dado pelo Sistema.

**Taxas de submissão e de publicação:**

- **Taxa de submissão.** A taxa de submissão de R\$30,00 deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal. Somente artigos com taxa paga de submissão serão avaliados.  
Caso a taxa não seja quitada em até 30 dias será considerado como desistência do autor.
- **Taxa de publicação.** A taxa de publicação de R\$80,00, por página impressa em preto e R\$250,00 por página impressa em cores será cobrada do autor indicado para correspondência, por ocasião da prova final do artigo. A taxa de publicação deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal.

**Recursos e diligências:**

- No caso de o autor encaminhar resposta a diligências solicitadas pelo ABMVZ, ou documento de recurso, o mesmo deverá constar como a(s) primeira(s) página(s) do texto do artigo somente na versão em Word.
- No caso de artigo não aceito, se o autor julgar pertinente encaminhar recurso, o mesmo deve ser feito pelo e-mail [abmvz.artigo@abmvz.org.br](mailto:abmvz.artigo@abmvz.org.br).

## **Anexo 2**

Normas do Comitê de Ética no Uso de Animais – UFRGS

CEUA-UFRGS

GUIA DE SEVERIDADE DOS PROCEDIMENTOS CIENTÍFICOS

Tradução resumida do documento do relatório final de julho de 2009 da comissão européia para revisão da Directive 86/609/EEC

Expert working group on severity classification of scientific procedures performed on animals

FINAL REPORT (Brussels, July 2009)

[ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/pdf/report\\_ewg.pdf](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pdf/report_ewg.pdf)

### **CLASSIFICAÇÃO DE SEVERIDADE DE PROCEDIMENTOS**

Uma categoria de severidade deve ser designada para cada procedimento. Esta classificação auxiliará na análise do dano-benefício do projeto.

A severidade de um procedimento é determinada pelo grau de dor, sofrimento, incômodo ou prejuízo duradouro esperado a ser experienciado pelo animal durante o procedimento. O procedimento consiste de uma combinação de uma ou mais ações técnicas aplicados a um animal que possam causar dor, sofrimento ou prejuízo duradouro. A atribuição de uma categoria de severidade leva em conta uma intervenção ou manipulação de um animal no contexto de um procedimento definido. A categoria de severidade deve ser determinada com base nos efeitos mais severos prováveis de serem experienciados por um animal depois de aplicados todos os refinamentos de técnicas apropriadas.

#### **Definições**

Esta proposta tem 4 categorias de severidade; sem recuperação; leve, moderada e severa. Estas devem ser definidas como segue:

**Sem recuperação:** Procedimentos que são conduzidos sob anestesia geral, da qual o animal não recupera consciência.

**Leve:** Procedimentos em que é provável que os animais experienciem dor, sofrimento ou desconforto leves que durem pouco tempo. São procedimentos que não acarretarão prejuízos no bem-estar ou nas condições gerais dos animais.

Moderado: Procedimentos em que seja provável que os animais experienciem dor, sofrimento ou desconforto moderados, ou dor, sofrimento ou desconforto leves mas prolongados. Procedimentos que provavelmente causarão prejuízos moderados no bem-estar ou condições gerais dos animais.

Severo: Procedimentos que acarretem dor, sofrimento ou desconforto severo, ou dor, sofrimento ou desconforto moderado mas duradouro. Procedimentos que provavelmente causarão prejuízos severos no bem-estar ou condições gerais dos animais.

#### Limiar inferior

O limiar inferior é excedido se o animal experiência um nível de dor, sofrimento ou desconforto maior do que aquele causado pela introdução de uma agulha. Além disso, a administração de anestesia para procedimentos científicos (excluindo eutanásia) vai implicar em um procedimento acima do limiar mais baixo.

Outros tipos de limiares mais baixos são necessários para determinação da equivalência de procedimentos de pesquisa específicos.

Alguns exemplos são dados abaixo que podem ser considerados abaixo do limiar para regulamentação. É importante levar em conta que a aplicação de várias técnicas “abaixo do limiar” conjuntamente no mesmo animal pode requerer que o procedimento seja classificado como moderado ou mais alto.

#### Limiar superior

O limiar superior é excedido se o animal é exposto a dor, sofrimento ou desconforto severos que provavelmente de forma duradoura ou permanente e que não podem ser melhorados. Morte como última consequência deve ser evitada pelo uso de estratégias de monitoramento apropriadas e pelo sacrifício do animal com procedimentos humanizados sempre que possível. O balanço entre o número total de animais utilizados e a severidade do procedimento em um único animal devem ser levados em consideração se o aumento no número de animais implicar numa redução na severidade dos procedimentos aos quais os animais são expostos individualmente.

Poderão haver necessidades excepcional e cientificamente justificáveis que possam ser alcançadas apenas quando se excede o limiar superior.

#### Critérios e elementos para uma categorização

A designação de um procedimento a uma categoria em particular não apenas depende do tipo de procedimento mas de uma série de outros fatores. Quando um procedimento for designado a uma destas quatro categorias, estes outros fatores precisam ser levados em consideração caso a caso. Os fatores incluem: Tipo de manipulação, manejo.

Natureza da dor, sofrimento, desconforto ou duração do prejuízo causado por todos os elementos de um procedimento, e sua intensidade, duração, frequência, e multiplicidade de técnicas aplicadas.

#### Sufrimento acumulado em um procedimento

Impedimentos da expressão de comportamentos naturais que incluem restrições no alojamento, abrigo e cuidados-padrão.

Os fatores acima estão relacionados ao procedimento em questão. Entretanto, para a classificação os seguintes fatores também precisam ser levados em conta pois eles podem influenciar significativamente a classificação:

- Tipo das espécies e genótipo
- Maturidade, idade e gênero do animal
- Experiência de treino do animal no procedimento
- Se o animal for reutilizado, a severidade real dos procedimentos anteriores
- Os métodos usados para reduzir ou eliminar dor, sofrimento ou desconforto, incluindo refinamento de alojamento, abrigo e cuidados
- Sacrifícios humanizados.

Por exemplo, um procedimento considerado como severo devido ao tipo de procedimento aplicado poderia ser designado a uma categoria mais baixa pela aplicação de sacrifícios humanizados.

O monitoramento cuidadoso de animais durante procedimentos, o uso de acompanhamento/avaliações clínicas e indicadores objetivos podem ser de grande valor para minimizar o impacto no animal e portanto podem ter um impacto na classificação de severidade. Estas avaliações terão valor também no acompanhamento de severidade real.

É importante perceber que uma avaliação objetiva de dor, sofrimento e desconforto em animais freqüentemente não é possível. Portanto, muitos aspectos da avaliação irão requerer o exercício do julgamento profissional.

É necessário apontar que os exemplos dados abaixo são meramente indicativos. A categorização final de severidade pode ser feita apenas como uma consequência de uma avaliação caso-a-caso de todos os fatores prováveis de causar um impacto na severidade de um procedimento em uma dada situação. A pressuposição é que todos os procedimentos serão conduzidos por pessoas competentes de acordo com a melhor prática.

#### Leve

- Estudo farmacocinético em que uma única dose é administrada e um número limitado de amostras de sangue é coletado (totalizando menos que 10% do volume circulante) e não é esperado que a substância produza qualquer efeito adverso detectável;
- Exames de imagem (ex. Ressonância Magnética) com sedação ou anestesia apropriadas;
- Procedimentos superficiais, por exemplo, biópsias da orelha ou da cauda, implantes subcutâneos não cirúrgicos ou mini-pumps e transponders;
- Aplicação de aparato e telemetria que possam causar apenas uma interferência ou prejuízo menor a atividade e ao comportamento normais;
- Administração de substâncias pela via subcutânea, intramuscular ou intraperitoneal, por gavagem ou via intravenosa utilizando vasos sanguíneos superficiais, em que as substâncias não tenham um impacto maior do que leve no animal e em que os volumes estejam dentro dos limites apropriados para o tamanho e a espécie do animal;
- Indução de tumores ou tumores espontâneos, que não causem efeitos adversos clínicos detectáveis (ex. Nódulos não invasivos, pequenos, subcutâneos);
- Reprodução de animais geneticamente modificados com fenótipo resultante esperado com efeitos leves;

- Alimentação com dietas modificadas, que não atendam a todas as necessidades nutricionais dos animais e que se espera que cause anormalidades leves dentro do período do estudo;
- Confinamento em gaiolas metabólicas por um período curto (<24h);
- Estudos que envolvam privação social, alojamento solitário de ratos ou camundongos adultos de linhagens sociáveis;
- Modelos que exponham animais a estímulos nocivos que estejam associados brevemente com dor, sofrimento ou desconforto leve, e nos quais o animal possa se esquivar com sucesso.

#### Moderado

- Aplicação frequente de substâncias de teste que produzam efeitos clínicos moderados, e retirada de amostras de sangue (>10% do volume circulante) em um animal consciente durante alguns dias sem reposição do volume;
- Estudos de dose-resposta aguda, toxicidade crônica/testes de carcinogênese, com desfecho não letal;
- Cirurgia sob anestesia geral e analgesia apropriada, associada com dor, sofrimento ou prejuízo da condição geral no período pós-cirúrgico. Exemplos incluem: toracotomia, craniotomia, laparotomia, orquidectomia, linfadenectomia, tiroidectomia, cirurgia ortopédica com estabilização efetiva e curativos, transplante de órgão com tratamento para rejeição, implante cirúrgico de cateter ou aparatos biomédicos (transmissores de telemetria, minipumps, etc);
- Modelos de indução de tumores, ou tumores espontâneos, em que espera-se que causem dor ou desconforto moderados ou interferência moderada do comportamento normal;
- Irradiação ou quimioterapia com uma dose subletal, ou com uma dose que seria letal, mas com reconstituição do sistema imune. Efeitos adversos esperados leves e por período curto (<5 dias);
- Acasalamento de animais geneticamente modificados que resultem num fenótipo esperado com efeitos moderados;
- Criação de animais geneticamente modificados através de procedimentos cirúrgicos;
- Uso de gaiolas metabólicas que envolvam contenção moderada de movimentos por um período prolongado (até 5 dias);
- Estudos com dietas modificadas que não atendam a todas as necessidades nutricionais dos animais e que seja esperado que causem anormalidade clínica moderada no período do estudo;
- Privação de comida por 48h em ratos adultos;
- Evocação de reações de escape ou esquiva nas quais o animal não consegue escapar ou evitar o estímulo, e em que se espera que um desconforto moderado seja produzido.

#### Severo

- Testes de toxicidade nos quais a morte é inevitável, ou fatalidades são severas e esperadas e estados patofisiológicos são induzidos. Por exemplo, uma dose única e aguda de teste de toxicidade;
- Testes de aparatos cuja falha possa causar dor ou desconforto severo ou morte do animal (e.g. aparelho cardíaco assistido);
- Teste de potência de vacina caracterizada pelo prejuízo permanente da condição do animal;
- Doença progressiva que leve à morte, associada com dor, desconforto ou sofrimento moderado e prolongado;
- Quimioterapia ou irradiação com dose letal sem reconstituição do sistema imune, ou reconstituição com produção de doença implantada versus nativa (graft versus host disease);
- Modelos com indução de tumores, ou com tumores espontâneos, que espera-se que causem doença progressiva letal associada com dor, desconforto ou sofrimento moderado

duradouro. Por exemplo, tumores que causem caquexia, tumores ósseos invasivos, tumores que resultem em metástase, e tumores que se permite ulceração;

- Intervenções cirúrgicas e outras intervenções em animais sob anestesia geral que espera-se que resultem em dor, sofrimento ou desconforto pós-operatório moderado e persistente ou prejuízo severo da condição geral do animal;
- Produção de fraturas instáveis, traqueotomia sem analgesia adequada, ou trauma para produzir falência múltipla de órgãos;
- Transplante de órgãos no qual a rejeição provavelmente levará a desconforto severo ou prejuízo das condições gerais do animal (ex.: xenotransplantes);
- Acasalamento de animais com transtornos genéticos em que se espere que o animal tenha prejuízos das condições gerais severas e persistentes, como por exemplo, doença de Huntington, distrofia muscular, modelos de neurite crônica;
- Uso de gaiolas metabólicas envolvendo restrição severa de movimentos por um período prolongado;
- Choque elétrico inescapável (ex. Para produzir desamparo aprendido);
- Isolamento por períodos prolongados em espécies sociais, como por exemplo cães e primatas não-humanos;
- Estresse de imobilização para induzir úlceras gástricas ou problemas cardíacos em ratos;
- Nado forçado ou testes de exercício em que a exaustão é o desfecho esperado.

Exemplos de procedimentos abaixo do limiar inferior

- Avaliação da composição corporal por métodos não-invasivos e por contenção mínima;
- Monitoramento por eletrocardiograma por técnicas não-invasivas com contenção mínima ou animais habituados;
- Aplicação de aparelho de telemetria externo que se espera que não cause prejuízo a animais socialmente adaptados ou não interfiram na atividade e comportamento normais;
- Reprodução de animais geneticamente modificados que se espera que não apresentem fenótipos adversos detectáveis;
- Alimentar com uma dieta que atenda às necessidades nutricionais dos animais;
- Adicionar marcadores inertes na comida para acompanhar a passagem do digesta;
- Privação de comida por menos de 24h em ratos adultos;
- Observação de comportamento normal não invasivo sem perturbar o animal;
- Teste do campo aberto.

### Anexo 3

#### Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – UFRGS

**Mensagem 1:**

Prezado Pesquisador DANILO PEDRO STREIT JUNIOR,

Informamos que o projeto de pesquisa "Estudo da fase embrionária do híbrido *Pseudoplatystoma reticulatum* x *Leiarius marmoratus* e de seus parentais", encaminhado para análise em 27/05/2012, necessita das retificações apresentadas a seguir para obtenção de aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais.

Projeto: 23309 - Estudo da fase embrionária do híbrido *Pseudoplatystoma reticulatum* x *Leiarius marmoratus* e de seus parentais

Parecer Reunião 07/08/2012

De uma forma geral, o projeto está bem fundamentado, os resultados poderão representar efetiva contribuição para o conhecimento. No entanto, solicitamos incluir:

- o grau de severidade no projeto;
- documento do proprietário e/ou responsável pela Piscigranja Boa Esperança, município de Pimenta Bueno, estado de Rondônia, formalizando o aceite que a pesquisa será realizada em suas instalações.

Assim, recomendamos que o projeto seja encaminhado em diligência para resposta às questões acima.

CEUA/UFRGS

Após a atualização do projeto de pesquisa, encaminhe novamente para análise através da opção PESQUISA - PESQUISADOR - Projeto, botão AVALIAÇÕES, disponível no Portal de Serviços.

Atenciosamente,  
Comissão de Ética no Uso de Animais

**Mensagem 2:**

Prezado Pesquisador DANILO PEDRO STREIT JUNIOR,

Informamos que o projeto de pesquisa "Estudo da fase embrionária do híbrido *Pseudoplatystoma reticulatum* x *Leiarius marmoratus* e de seus parentais", encaminhado para análise em 27/05/2012, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais com o seguinte parecer:

Projeto: 23309 - Estudo da fase embrionária do híbrido *Pseudoplatystoma reticulatum* x *Leiarius marmoratus* e de seus parentais

As solicitações do CEUA foram atendidas (grau de severidade e carta de aceite da realização da pesquisa pelo proprietário da fazenda) e recomendo a aprovação do projeto de pesquisa.

CEUA/UFRGS

Atenciosamente,  
Comissão de Ética no Uso de Animais

## Anexo 4

Carta de aceite para realização de pesquisa no projeto intitulado “Estudo da fase embrionária do híbrido *Pseudoplatystoma reticulatum* x *Leiarius marmoratus* e de seus parentais”



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

*ACEITE PARA EXECUÇÃO DE TRABALHOS CIENTÍFICOS*

Eu, **MARCELO YOKOYAMA**, representado na figura de proprietário da **AMAZON PEIXES**, inscrito no CNPJ 04875322/0001-35, situada à rodovia RO-010, Km 5, no município de Pimenta Bueno, estado de Rondônia, onde está sediada a **PISCIGRANJA BOA ESPERANÇA**, concordo com a realização de trabalhos científicos no projeto intitulado: “Estudo da fase embrionária do híbrido *Pseudoplatystoma reticulatum* x *Leiarius marmoratus* e de seus parentais” nesta empresa, através do uso de reprodutores e na utilização de gametas e embriões.

De acordo e abaixo assinado.

Pimenta Bueno -RO, 23 agosto de 2012.



**MARCELO YOKOYAMA**  
Sócio Gerente da Amazon Peixes.



## APÊNDICES

### Apêndice 1

Ajustes fotográficos para captura de imagens:

ISO da máquina: Foi utilizado variação de 200 a 400.

Tempo de abertura da objetiva: Dependendo do aumento utilizado, o tempo de abertura foi sendo ajustado.

Para fotografias em estereomicroscópio, a faixa de variação foi de 1/50 até 1/250 segundos, dependendo da intensidade da luz e do aumento utilizado.

Para fotografias realizadas em microscópio de luz, as faixas de abertura focal foram de 1/125 a 1/320 segundos.

## Apêndice 2

- Cálculos de doses hormonais

Espécie/Sexo	Fêmeas de P. reticulatum	Machos de L. marmoratus	Fêmeas de L. marmoratus	Machos de L. marmoratus
	5,48	2,93	3,58	2,43
Peso (kg)	2,8	3,08	4,23	3,01
	7,08	3,36	4,05	3,8
Média	5,12	3,123333	3,953333	3,08
Desvio Padrão	2,162591	0,218251	0,335609	0,687677
Peso total (kg)	15,36	9,37	11,86	9,24
Hormônio Total	84,48	28,11	65,23	27,72

No momento da aplicação, a quantidade de hormônio foi dividida proporcionalmente ao peso de cada indivíduo.

### Apêndice 3

Registro Fotográfico. Imagens dos momentos reprodutivos: seleção de reprodutores (A), indução hormonal (B), liberação dos gametas/extrusão (C, D, E, F), ovos recém fertilizados (G) e incubação (H).



## VITA

Diego de Oliveira, filho de Jordão José de Oliveira e Delsi Carnaval de Oliveira, é brasileiro, nascido em Lajeado, Rio Grande do Sul, aos oito dias do mês de julho de 1982.

De 1989 a 2000 estudou no Colégio Evangélico Alberto Torres, da Rede Sinodal de Educação, em sua cidade natal, onde veio a concluir esta etapa com dedicação a diversas atividades extracurriculares.

Em 2001, ingressou no curso de Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, realizando estágio no Instituto de Pesquisas Hidráulicas onde surgiu o interesse pelas Ciências Agrárias. O curso, porém, não foi concluído.

Em março de 2006, ingressou no curso de Agronomia desta universidade, onde desde o início demonstrou interesse pela área de Piscicultura, participando de projetos como aluno de Iniciação Científica e desempenhando estágios extracurriculares em diversos estados do Brasil. Concluiu a graduação em dezembro de 2010, com destaque para o projeto desenvolvido junto à disciplina "Planejamento Agrônômico Integrado".

Em abril de 2011 iniciou o curso de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Faculdade de Agronomia da UFRGS, como bolsista CNPq.