

ALEXANDRE NIZIO MARIA

**CARACTERIZAÇÃO ULTRA-ESTRUTURAL DOS
GAMETAS, ASPECTOS DA FERTILIZAÇÃO E
DESENVOLVIMENTO INICIAL DE PIRAPITINGA *Brycon
nattereri* (Günther, 1864)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal, para a obtenção do título de “Doutor”.

Orientadora

Prof^ª. PhD. Ana Tereza de Mendonça Viveiros

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2008

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Maria, Alexandre Nizio.

Caracterização ultra-estrutural dos gametas, aspectos da fertilização e desenvolvimento inicial de pirapitinga *Brycon nattereri* (Günther, 1864) / Alexandre Nizio Maria. – Lavras : UFLA, 2008.

115 p.: il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientadora: Ana Tereza de Mendonça Viveiros.

Bibliografia.

1. Gametas. 2. Peixe. 3. Embrião. 4. Larva. 5. Morfometria. 6. *Brycon nattereri*. I. Universidade Federal de Lavras. II Título.

CDD – 639.37520416

ALEXANDRE NIZIO MARIA

**CARACTERIZAÇÃO ULTRA-ESTRUTURAL DOS
GAMETAS, ASPECTOS DA FERTILIZAÇÃO E
DESENVOLVIMENTO INICIAL DE PIRAPITINGA *Brycon
nattereri* (Günther, 1864)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal, para a obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 28 de fevereiro de 2008

Prof. Dr. José Camisão de Souza	UFLA
Prof. Dr. Rilke Tadeu Fonseca de Freitas	UFLA
Prof. Dr. Alexandre Ninhaus da Silveira	UNESP
Profa. Dra. Elizete Rizzo	UFMG



Profa PhD. Ana Tereza de Mendonça Viveiros
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

Dedico este trabalho:

*A DEUS, pelo dom da vida, do conhecimento e sabedoria;
Aos meus pais, Enédio e Maria, primeiros e eternos mestres;
Ao meu irmão, Wanderson; meus avós, tios e tias;
A minha esposa, Daniela e ao meu filho, Lucas, pelo amor, compreensão
e paciência.*

*“Ele me deu a verdadeira ciência de todas as coisas, me fez
conhecer a constituição do mundo e as virtudes dos
elementos, o começo, o fim e o meio dos tempos, a sucessão
dos solstícios e as mutações das estações, os ciclos do ano e
as posições dos astros, a natureza dos animais.... Tudo o
que está escondido e tudo o que está aparente eu conheço:
porque foi a sabedoria, criadora de todas as coisas, que mo
ensinou.” Sab. 7, 17-21.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade.

À professora. Ph.D. Ana Tereza de Mendonça Viveiros, pela orientação, dedicação, confiança e amizade durante todo estes anos de trabalho.

Aos professores Dra. Elizete Rizzo, pela disponibilização do Laboratório de Ictiohistologia; Dr. Alexandre Ninhaus da Silveira e Dr. Rilke Tadeu Fonseca de Freitas, pelos pelo auxílio na realização das análises e também pelos conhecimentos transmitidos durante o curso.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-Estrutural da UFLA, por meio do professor Dr. Eduardo Alves e da laboratorista Eloísa A. G. L. Lopes, pela atenção e auxílio na preparação das amostras.

A todos integrantes do Laboratório de Ictiohistologia/UFMG, em especial à Mônica, pela ajuda na confecção das lâminas histológicas.

Aos colegas Laura H. Órfão, Ziara A. Isaú, Thiciana B. do Amaral, Alexmiliano V. Oliveira, João Fernando Koch, Rafael V. Araújo, Rafael V. Neto e Ivan B. Allaman, pelo auxílio em todas as horas e valiosa colaboração.

À Companhia Energética de Minas Gerais (Cemig), pela disponibilização dos reprodutores e instalações da Estação de Piscicultura.

À equipe da Estação de Piscicultura da CEMIG, Gilson, Jailson e Darli, em especial ao Oscar Moura e Newton José Schimit Prado, pelo auxílio e colaboração.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Lista de Tabelas	i
Lista de Figuras.....	ii
RESUMO GERAL	iv
ABSTRACT	vi
CAPITULO I - Introdução geral.....	01
1 INTRODUÇÃO	02
2 OBJETIVOS	04
2.1 Objetivo geral	04
2.2 Objetivos específicos	04
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	05
3.1 A espécie em estudo	05
3.2 Ovócitos de peixes	06
3.3 Características do sêmen e espermatozóides de peixes teleósteos.....	08
3.4 Eventos da fertilização.....	11
3.5 Desenvolvimento inicial em peixes	12
3.6 Morfometria corporal.....	15
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17
CAPITULO II- Parâmetros reprodutivos e morfologia dos gametas de <i>Brycon nattereri</i>	24
1 RESUMO.....	25
2 ABSTRACT	27
3 INTRODUÇÃO	29
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
5 RESULTADOS	34

6 DISCUSSÃO	46
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

CAPITULO III- Aspectos ultra-estruturais da superfície dos ovos associados ao bloqueio à polispermia em *Brycon nattereri*

1 RESUMO.....	60
2 ABSTRACT	62
3 INTRODUÇÃO	64
4 MATERIAL E MÉTODOS	65
5 RESULTADOS	67
6 DISCUSSÃO	72
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

CAPITULO IV- Desenvolvimento inicial e características morfométricas de *Brycon nattereri*

1 RESUMO.....	81
2 ABSTRACT	83
3 INTRODUÇÃO	85
4 MATERIAL E MÉTODOS	87
5 RESULTADOS	92
6 DISCUSSÃO	103
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109

CAPITULO V- Considerações finais

113

Capítulo 2

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Reatividade das estruturas ovocitárias à histoquímica de carboidratos em <i>B. nattereri</i>	37
TABELA 2	Parâmetros analisados de fêmeas de pirapitinga <i>B. nattereri</i> , submetidas a hipofiseção	40
TABELA 3	Parâmetros analisados de machos de pirapitinga <i>B. nattereri</i> , submetidos a hipofiseção	41
TABELA 4	Morfometria da superfície de ovócitos recém-extruídos de <i>B. nattereri</i>	42
TABELA 5	Média e desvio padrão dos diferentes parâmetros estruturais dos espermatozóides de <i>B. nattereri</i> ...	44
Capítulo 4		
TABELA 1	Desenvolvimento embrionário de <i>B. nattereri</i>	93
TABELA 2	Comprimento e volume do saco vitelínico das larvas de pirapitinga <i>B. nattereri</i> entre a eclosão (dia 0) e o 15º dia de vida	95
TABELA 3	Razões morfométricas de <i>B. nattereri</i>	99
TABELA 4	Coefficientes de correlação de Pearson entre as medidas morfométricas e peso	100

Capítulo 1

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Exemplar de pirapitinga *Brycon nattereri*..... 06

Capítulo 2

FIGURA 1 Distribuição de frequência porcentual dos diâmetros dos ovócitos intra-ovarianos 35

FIGURA 2 Secção histológica dos ovócitos de *B. nattereri* 36

FIGURA 3 Histoquímica de carboidratos em ovócitos de *B. nattereri*..... 38

FIGURA 4 Superfície dos ovócitos de *B. nattereri* analisados através de microscopia eletrônica de varredura 43

FIGURA 5 Micrografia eletrônica do espermatozóide de *B. nattereri*..... 45

Capítulo 3

FIGURA 1-2 Eletromicrografia do ovócito após a remoção da zona radiata, no momento da mistura do sêmen com ovócito (tempo = 0)..... 68

FIGURA 3-4	Ovos fertilizados evidenciando a entrada dos espermatozóides na micrópila.....	69
FIGURA 5-6	Eletromicrografia mostrando a obstrução do canal micropilar e o cone de fertilização.....	70
FIGURA 7-8	Eletromicrografia mostrando o estreitamento do canal micropilar e espermatozóides aglutinados no vestibulo micropilar.....	71
FIGURA 9-10	Eletromicrografia mostrando espermatozóides supranumerários aglutinados no espaço perivitelinico.....	71
 Capítulo 4		
FIGURA 1	Medidas morfométricas dos peixes.....	90
FIGURA 2	Taxa de crescimento específico e a reabsorção do vitelo, desde a eclosão até o 15º dia de vida das larvas.....	96
FIGURA 3	Medidas morfométricas largura e altura corporal média de <i>B. nattereri</i> , em cada região avaliada	97
FIGURA 4	Médias das razões morfométricas.....	98
FIGURA 5	Ovário em repouso com lamelas ovulíferas contendo ovócitos perinucleolar inicial e ovócitos perinucleolar avançado.....	102
FIGURA 6	Testículos em diferentes estágios de maturação.....	103

RESUMO GERAL

MARIA, Alexandre Nizio. **Caracterização ultra-estrutural dos gametas, aspectos da fertilização e desenvolvimento inicial de pirapitinga *Brycon nattereri* (Günther, 1864)**. 2008. 115p. Tese (Doutorado em Produção Animal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

O trabalho foi realizado na Estação de Piscicultura da Companhia Energética de Minas Gerais (Itutinga, MG) nos meses de maio e agosto de 2006 e de 2007. Os objetivos gerais deste estudo foram analisar morfológicamente os gametas, os eventos da fertilização e o desenvolvimento inicial da pirapitinga *Brycon nattereri*. Os ovócitos do *B. nattereri* são levemente adesivos, de coloração vinho ou marrom, apresentando micrópila no pólo animal e superfície constituída por zona radiata lisa com poros-canais simples. A maior parte dos ovócitos das fêmeas estudadas estava com vitelogênese completa e núcleo central ou ligeiramente excêntrico. Foram detectados polissacarídeos neutros na zona radiata e nos glóbulos de vitelo, polissacarídeos carboxilados nos alvéolos corticais e polissacarídeos neutros e carboxilados nas células foliculares. O sêmen possui coloração branca e aspecto leitoso, volume médio de 5,6 mL e concentração de 42×10^9 espermatozóides por mL. Os espermatozóides são do tipo primitivo, com cabeça ovóide sem vesícula acrossomal, peça intermediária curta e flagelo longo com arranjo axonêmico do tipo 9+2. Os eventos observados na fertilização mostraram que existem vários fatores responsáveis pela prevenção à polispermia, entre eles: o canal micropilar em formato de funil restringindo o número de espermatozóides a alcançarem o espaço perivitelínico; a formação do cone de fertilização que rejeita os espermatozóides supranumerários e os encaminha para fora do canal micropilar e a aglutinação dos espermatozóides supranumerários no canal micropilar e no espaço perivitelínico por meio da liberação do conteúdo dos alvéolos corticais. A

eclosão das larvas ocorreu entre 50-54 horas após a fertilização, na temperatura média de 19°C. As larvas recém-eclodidas são pouco desenvolvidas, totalmente despigmentadas, desprovidas de boca ou de capacidade natatória, apresentando 6,32 mm de comprimento total e um grande saco vitelínico, com 3,64 mm³. A abertura da boca ocorreu entre o 3º e o 4º dia após a eclosão e a reabsorção total do saco vitelínico após 10 dias, coincidindo com o início da alimentação exógena. Durante os 15 dias de avaliação das larvas, não foi observado canibalismo. A análise das medidas morfométricas corporais, aos 14 meses de idade, mostrou que o *B. nattereri* apresenta-se mais arredondando na região próxima a cabeça e vai se tornando mais comprimido lateralmente na parte posterior do seu corpo. A proporção sexual observada foi de 1:1 (macho:fêmea). Aos 14 meses de idade, a maioria dos machos apresentava testículos em maturação, enquanto que as fêmeas apresentavam-se imaturas.

* Comitê Orientador: Ana Tereza de Mendonça Viveiros - UFLA (Orientadora), José Camisão de Souza- UFLA e Rilke Tadeu Fonseca de Freitas- UFLA (co-orientadores)

ABSTRACT

Maria, Alexandre Nizio. **Ultrastructural characterization of gametes, aspect fertilization and initial development of pirapitinga *Brycon nattereri* (Günther, 1864)**. 2008. 115 p. Ph.D. Thesis (Animal Production) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

This study was carried out at the Fish Culture of the Companhia Energética de Minas Gerais (Itutinga/MG) from May to August of 2006 and 2007. The objectives of this study were to analyze morphologically the gametes, the events of fertilization and initial development of the pirapitinga *Brycon nattereri*. The *B. nattereri* oocytes were weakly adhesive, wine or brown colored, the micropyle was present at the animal pole, and the surface contained a smooth zona radiata with simple pore-canals. Most of the oocytes were with complete vitellogenesis with middle or slightly eccentric nucleus. Neutral polysaccharides were detected in the zona radiata and yolk globules, carboxylated polysaccharides in cortical alveoli and both neutral and carboxylated polysaccharides in follicular cells. Semen was white with milky appearance, volume of 5.6 mL and concentration of 42×10^9 sperm per mL. The spermatozoa were primitive, ovoid-shape head without acrosomal vesicle, short midpiece and long flagellum with axonemic arrangement type 9+2. There were some events responsible for the prevention of polyspermy: a funnel-shape micropylar canal which reduce the number of spermatozoa that come in contact with the perivitelline space; the formation of a fertilization cone that rejects the supernumerary spermatozoa and pushes them out of the micropylar canal and; supernumerary sperm agglutination inside the micropylar canal and perivitelline space caused by cortical material released from the alveoli. The larvae hatched 50-54 hours after fertilization, at approximately 19°C. The newly-hatched larvae were poorly developed, completely depigmented, devoid of mouth or swimming ability, a total length of 6.32 mm, and a large yolk-sac of 3.64 mm³. The opening

of the mouth occurred 3-4 days after hatching and the total reabsorption of the yolk sac after 10 days, coinciding with the beginning of the exogenous feeding. During the 15 days of evaluation, no cannibalism was observed. According to the morphometric analysis at 14 months of age, the *B. Nattereri* body shape is more rounded near the head and more compressed laterally on the back of the body. A sex ratio of 1:1 (male: female) was observed. At 14 months of age, most of the males presented testes in maturation, while the females presented immature.

* Comitê Orientador: Ana Tereza de Mendonça Viveiros - UFLA (Orientadora), José Camisão de Souza - UFLA e Rilke Tadeu Fonseca Freitas - UFLA (co-orientadores)

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

A ictiofauna de água doce do Brasil é a mais rica do mundo, com cerca de 2.587 espécies, existindo ainda muitas desconhecidas (Buckup et al., 2007). Destas espécies, poucas são utilizadas ou apresentam potencial para aquicultura. A criação de peixes em cativeiro tem aumentado no mundo inteiro e novas espécies têm chamado a atenção de investidores. A difusão das tecnologias de cultivo desenvolvidas para espécies nativas ao setor produtivo pode culminar na geração de espécies alternativas de alto valor comercial para a piscicultura.

O gênero *Brycon* compreende um grupo com 43 espécies e mostra ampla distribuição na América do Sul e Central. Este gênero se destaca pela presença de algumas espécies com elevado potencial zootécnico. No Brasil, essas espécies são encontradas nas principais bacias hidrográficas. Assim, cada região brasileira pode produzir uma espécie endêmica de *Brycon*, evitando seu translocamento, fator de risco para a biodiversidade de cada região. Além disso, cada uma das espécies evoluiu e se adaptou, fenotípica e genotipicamente, à sua bacia de origem, principalmente em relação aos fatores climáticos que afetam o desempenho zootécnico de cultivo (Zaniboni-Filho et al., 2006).

O *B. nattereri* é um dos representantes da bacia do rio Grande, no entanto, não é mais encontrado em várias seções deste rio, devido às alterações ocorridas em seu hábitat (CEMIG/CETEC, 2000). Esses fatores levaram o *B. nattereri* a entrar na lista nacional das espécies ameaçadas de extinção. Estudos e tentativas de reprodução em laboratório têm sugerido que a maturação de suas gônadas ocorre na estação seca, nos meses mais frios (entre maio e agosto). Essa espécie se apresenta bastante promissora, do ponto de vista comercial, visto que, além de apresentar características favoráveis ao cultivo e à pesca esportiva, também permitirá a produção de larvas e alevinos nos meses de temperaturas baixas, diferente dos peixes de piracema. Assim, a produção comercial ocuparia

as instalações e a mão-de-obra da piscicultura que, normalmente, estariam ociosas ou apenas em atividade de manutenção durante os meses mais frios.

O conhecimento da biologia dos peixes é fundamental quando se deseja realizar a criação intensiva, principalmente no que se refere aos aspectos reprodutivos. Embora algumas espécies de peixes encontrados no Brasil sejam potencialmente promissoras para a piscicultura sob diversos aspectos, o conhecimento sobre sua biologia ainda é escasso.

O estudo da morfologia dos gametas de peixes possibilita análises filogenéticas, conhecimento da organização celular e do padrão de distribuição das organelas. Já o conhecimento do desenvolvimento embrionário e larval de peixes é importante nos estudos taxonômicos e tem aplicação direta na aqüicultura. Durante o desenvolvimento embrionário e larval, são avaliadas a eficiência do processo de fertilização e a qualidade dos ovos fertilizados de peixes submetidos à indução hormonal.

A identificação dos eventos que ocorrem na reprodução induzida, fertilização, desenvolvimento inicial e de juvenis, contribuirá para a melhor compreensão da reprodução de teleósteos e de seu manejo na piscicultura. O conhecimento dos primeiros momentos do desenvolvimento embrionário, tanto quanto da morfologia do adulto, é essencial para entender a fisiologia do sistema reprodutivo de peixes.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Analisar a morfologia dos gametas, os eventos da fertilização e o desenvolvimento inicial de pirapitinga *Brycon nattereri*

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os parâmetros reprodutivos da espécie.
- Analisar morfológicamente ovócitos e espermatozóides.
- Analisar os eventos ocorridos durante os primeiros 10 minutos da fertilização, com ênfase na observação dos eventos responsáveis pela prevenção à polispermia e seu momento de ocorrência.
- Identificar e estabelecer a duração das diferentes fases do desenvolvimento embrionário.
- Determinar o comprimento corporal e a taxa de crescimento específica, durante os primeiros 15 dias de vida da larva.
- Determinar o volume do saco vitelínico e a taxa de reabsorção do vitelo pela larva.
- Avaliar as características morfométricas corporais dos peixes aos 14 meses de idade e estudar suas inter-relações.
- Avaliar o estágio de desenvolvimento gonadal aos 14 meses de idade e a proporção sexual.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A espécie em estudo

O *Brycon nattereri* (Günther, 1864) pertence à família Characidae, subfamília Bryconinae (Figura 1) e, atualmente, seu estado de conservação no Brasil encontra-se na categoria “vulnerável” (Rosa & Lima, 2005). Essa espécie é originária dos rios das bacias do Alto Paraná, São Francisco e Alto Tocantins, sendo encontrada em rios de porte médio com mata ciliar intacta e águas claras de fluxo rápido ou moderado (Lima et al., 2007). Os peixes têm o corpo prateado e uma mancha no pedúnculo caudal, com tamanho médio acima de 30 cm de comprimento padrão (Lima, 2001).

A dieta dessa espécie varia conforme a bacia de origem. Na bacia do Alto Tocantins, a dieta é composta de sementes, frutos e artrópodes (Albrecht, 2005), enquanto que, na bacia do Alto Paraná, é composta de insetos aquáticos e terrestres, detritos, peixes e algas (Luz-Agostinho et al., 2006), e plantas (Lima et al., 2007).

O período reprodutivo do *B. nattereri* ocorre após a estação chuvosa (março-abril) ou durante a metade da estação seca (maio-julho), em distintas áreas da bacia do Alto Paraná e no final da estação seca (junho-agosto), no Alto Tocantins (Lima et al., 2007). A estratégia reprodutiva se encaixa, provavelmente, no tipo sazonal (Winemiller, 1989). Um estudo relatou que o *B. nattereri* se reproduziu em um pequeno trecho de rio, limitado por cachoeiras (Vieira et al., 2005), sugerindo que essa espécie não realiza longas migrações para desovar.

As principais ameaças a essa espécie hoje são o desmatamento, a poluição da água e o represamento dos rios. Até hoje nenhuma ação específica foi tomada para garantir sua conservação. Segundo Lima et al. (2007), o melhor

caminho para assegurar sua conservação é manter os sistemas fluviais intocados e investir no estudo de sua biologia, especialmente a reprodutiva.



FIGURA 1. Exemplar de pirapitinga, *Brycon nattereri*

3.2 Ovócitos de peixes teleósteos

O crescimento do folículo ovariano é semelhante na maioria dos peixes. O ovócito em desenvolvimento é localizado no centro do folículo, sendo rodeado por células foliculares que produzem esteróides. A camada de células foliculares, geralmente, consiste de uma subcamada interior, a camada de células da granulosa e uma ou duas outras subcamadas das células da teca. As camadas de células da teca e da granulosa são separadas por uma membrana basal. Entre a superfície do ovócito e a camada de células da granulosa há uma camada acelular, a zona radiata (Arukwe & Goksøyr, 2003).

O componente básico da superfície, a zona radiata, envolve os ovos de todos os vertebrados e apresenta peculiaridades próprias em cada grupo (Rizzo & Godinho, 2003). Nos peixes teleósteos, a zona radiata tem como características a presença de poros, ou canais, dispostos radialmente na superfície do ovo, sendo por isso denominada zona radiata (Oppen-Berntsen, 1990; Rizzo & Godinho, 2003). Quando completamente desenvolvida, a zona radiata apresenta-se, geralmente, dividida em camadas, predominando dupla estratificação na maioria

das espécies (Bazzoli, 1992). Essas camadas exercem funções nos processos reprodutivos e de desenvolvimento, primariamente como uma interface entre o ovo e o espermatozóide e secundariamente como uma interface entre o embrião e seu ambiente (Grierson & Neville, 1981).

A camada interna da zona radiata fica em contato com a membrana ovocitária e é, geralmente, a mais espessada. Ela confere proteção mecânica ao embrião e é constituída de proteínas e glicoproteínas homólogas às macromoléculas da zona radiata de mamíferos (Brivio et al., 1991; Rizzo & Godinho, 2003). A camada externa na superfície do ovo após a desova é, geralmente, fina, de composição química variável entre as espécies e apresenta glicoproteínas neutras ou ácidas que podem estar associadas a muco-substâncias (Rizzo & Godinho, 2003). As moléculas presentes na superfície de ovócitos têm papel determinante na fertilização e na interação do ovo com o meio. A presença de polissacarídeos ácidos na zona radiata torna os ovos adesivos quando em contato com a água (Guraya, 1996). Em teleósteos, os espermatozoides ligam-se à parede do canal micropilar como primeiro nível de reconhecimento entre os gametas, ocorrendo a adesão e a fusão das membranas dos gametas na base do canal micropilar (Hart, 1990; Yu et al., 2002). Neste reconhecimento, como em outras interações celulares, há mediação de carboidratos presentes em glicoproteínas da zona radiata com receptores complementares pertencentes à família das lectinas na superfície dos espermatozoides (Dell et al., 1999; Mengerink & Vacquier, 2001; Yu et al., 2002).

Os ovos de peixes de água doce, após a desova, podem ser livres ou apresentar vários graus de adesividade, sendo, geralmente, livres em espécies migradoras e adesivos em espécies sedentárias (Sato, 1999). Análises dos padrões de superfície em ovos recém-desovados mostraram projeções da zona radiata, como glóbulos, vilos e filamentos em ovos adesivos, e zona radiata lisa com poros-canais ou rede fibrilar em ovos não adesivos (Rizzo et al., 2002).

Esses estudos mostram que as características do ovo estão relacionadas aos padrões de comportamento reprodutivo das espécies e acompanham a filogenia. Além dos arranjos de superfície, outros critérios também são necessários para caracterização e identificação dos ovos de peixes, tais como distância entre os poros-canais da zona radiata, diâmetro dos poros e morfologia da micrópila (Riehl, 1993; Li et al., 2000).

3.3 Características do sêmen de peixes teleósteos

O volume de sêmen e a concentração espermática encontrada nas diferentes espécies de peixes são bastante variáveis. É importante o conhecimento desses valores para que se possa avaliar a qualidade do sêmen coletado e, com isso, otimizar sua utilização no processo de fertilização artificial (Viveiros, 2005).

O valor biológico não está no volume de sêmen, mas sim na quantidade de células fecundantes que ele possa conter (Fonseca et al., 1992), sendo muito variável entre as diversas espécies e dentro de uma mesma espécie, de acordo com a estação do ano, o clima, o período de repouso sexual, o método de coleta e o tamanho de reprodutores. A frequência de coleta também tem um grande efeito sobre o volume liberado por peixe.

Várias características seminais podem ser utilizadas para a avaliação qualitativa do sêmen. Uma das mais práticas é a mensuração da concentração espermática, que pode ser feita imediatamente após a coleta do sêmen. A concentração ou densidade espermática expressa a quantidade de espermatozoides por volume de sêmen, podendo ser determinada por meio de contagem em câmaras volumétricas, mediante diluição do sêmen.

Os espermatozoides de peixes são imóveis nos testículos e, em muitas espécies, no plasma seminal. Durante a reprodução natural, a motilidade é induzida depois da liberação dos espermatozoides (e desta forma sua

dispersão/diluição) do trato genital do macho dentro do ambiente aquoso em que os espermatozóides encontram os componentes solúveis da água do meio externo, principalmente íons (Cosson, 2004).

Em salmonídeos e ciprinídeos de água doce, a redução da concentração de potássio ou a osmolaridade do ambiente ao redor dos espermatozóides liberados em água doce afeta diretamente o flagelo e regula a iniciação da motilidade espermática (Morisawa et al., 1983). O fluido seminal é rico em muitos nutrientes e íons, alguns dos quais importantes na manutenção da qualidade espermática, quando estocados no estado imóvel no trato genital. Fatores ambientais externos podem afetar a qualidade e a motilidade espermática, durante o processo de ativação. Fatores como o pH ou íons presentes podem polarizar a membrana celular e estimular a motilidade espermática dos peixes (Morisawa et al., 1999). A osmolaridade isotônica ao plasma seminal suprime a motilidade espermática em teleósteos marinhos e de água doce; quando o sêmen é exposto à hipertonidade da água salgada ou hipotonidade da água doce, respectivamente, induz à iniciação da motilidade espermática (Takai & Morisawa, 1995).

A diminuição da capacidade de natação dos espermatozóides é originada, em parte, pela diminuição do estoque de energia que ocorre durante o período de motilidade (Billard, 1990; Cosson et al., 1999). Em espermatozóide de peixes, a fosforilização oxidativa mitocondrial, que é altamente requerida para produzir energia durante a locomoção, é insuficiente para sustentar o armazenamento de ATP endógeno (Cosson et al., 1999).

Os espermatozóides de peixes variam em estrutura (Jamieson, 1991), refletindo sua história evolutiva de mais de 550 milhões de anos (Janvier, 1999).

As características ultra-estruturais de espermatozóides de peixes estão sistematica e filogeneticamente relacionadas (Jamieson, 1991; Mattei, 1991) e,

em espécies da mesma família, as organelas espermáticas mostram o mesmo padrão de distribuição (Baccetti et al., 1984).

Segundo Nagahama (1983), os espermatozóides podem ser morfológicamente subdivididos em cabeça, peça intermediária e cauda. Na maioria dos grupos de peixes falta o acrossoma, que ocorre em todos os outros grupos de vertebrados. A morfologia dos espermatozóides parece refletir no seu modo de fertilização. A carência do acrossoma é compensada pela presença da micrópila, um orifício no córion do ovo para a penetração do espermatozóide (Cosson et al., 1999).

Jamieson (1991) correlacionou a ultra-estrutura dos espermatozóides de peixes, classificando-os em “aquasperm” e “introsperm”, segundo o tipo de fertilização. Os “aquasperm” estão presentes nas espécies com fertilização externa, em que os espermatozóides são liberados no ambiente aquático. Os “introsperm”, por outro lado, estão presentes nas espécies com fertilização interna, nas quais os espermatozóides são liberados dentro do trato genital feminino.

Os espermatozóides do tipo “aquasperm” podem ou não apresentar acrosoma. Dentre os espermatozóides “aquasperm” que não apresentam acrosoma, Jamieson (1991), fez uma subdivisão:

1) espermatozóides do tipo I, os quais possuem núcleo pequeno, ovóide ou esférico; centríolos em ângulos retos situados na fossa nuclear quando esta se encontra presente. A peça intermediária é pequena e forma um colar ao redor da região inicial do flagelo. As mitocôndrias são pouco numerosas e pequenas, situam-se no colar citoplasmático, separadas do início do flagelo por um espaço existente entre as membranas plasmática e flagelar, o canal citoplasmático. O flagelo apresenta o complexo axonemal clássico formado pelas nove pares de microtúbulos periféricos e um par central. A membrana flagelar pode apresentar

ou não, uma, duas ou três projeções laterais ou “fins” semelhante às nadadeiras dos peixes (Jamieson, 1991; Mattei, 1991);

2) nos espermatozoides do tipo II (Jamieson, 1991), o flagelo apresenta-se paralelo à base do núcleo, sem ocorrer rotação do eixo flagelar em relação ao núcleo. Embora a fossa nuclear esteja presente nos espermatozoides, os centríolos se encontram fora dela (Mattei, 1970). A peça intermediária pode ser muito pequena e, neste caso, o canal citoplasmático pode não se formar (Jamieson, 1991).

O conhecimento da ultra-estrutura do espermatozoide é importante para a sistemática e a filogenia, e também tem aplicações práticas relacionadas com a fertilização artificial e a preservação espermática (Billard, 1978; Suquet et al., 1998).

3.4 Eventos da fertilização

O processo de fertilização inicia-se quando o espermatozoide entra em contato com o exterior do ovócito e termina com a fusão dos dois pronúcleos haplóides no citoplasma do ovócito (Mengerink & Vacquier, 2001).

Em peixes teleósteos, o ovócito apresenta uma abertura estreita na zona radiata, a micrópila, por meio da qual o espermatozoide tem acesso à membrana plasmática do ovócito. Essa estrutura não existe nos ovócitos de mamíferos. Regra geral, o espermatozoide que entra na micrópila primeiramente é destinado a se fundir com a membrana plasmática. Aqueles que seguem o espermatozoide fertilizante permanecem dentro do canal micropilar e são expelidos durante a ativação do ovo (Hart, 1990).

Em um estudo realizado com o peixe medaka *Oryzias latipes*, observou-se que o espermatozoide que penetra o ovócito e alcança a camada vitelínica é rapidamente cercado por protusão ooplasmática (o cone de fertilização). Após a fusão à membrana plasmática, o envelope nuclear espermático desaparece,

vesículas aparecem na região apical da cabeça e o envelope nuclear, a cromatina espermática, é reparada pela fusão de vesículas alongadas ou aplainadas (Iwamatsu & Ohta, 1978). O pronúcleo masculino maduro tem um nucléolo grande com um envelope enrugado. Em ovos de peixes, a replicação de DNA, bem como a síntese e a fosforilação de proteínas, especialmente a ciclina B, são requeridas para a formação normal da metáfase dos cromossomos na primeira clivagem, mas não para os eventos da fertilização, desde a completa penetração espermática até a migração nuclear resultando na singamia (Coward et al., 2002).

Existem várias estratégias desenvolvidas pelos peixes para evitar a polispermia, como: (a) diâmetro da abertura interna da micrópila que restringe o número de espermatozóides entrando na micrópila; (b) cone de fertilização que impede que os espermatozóides adicionais se unam à membrana plasmática do ovócito e ou entrem no espaço do perivitelínico; (c) lectinas dos grânulos corticais que imobilizam o excesso de espermatozóides no vestibulo micropilar. O fluido perivitelínico, que contém lectinas dos grânulos corticais como aglutinante espermático, flui para fora, junto com espermatozóides adicionais por meio da abertura micropilar, causada pelo aumento da pressão osmótica; (d) o fluido perivitelínico que contém lectinas do grânulo cortical interage através da micrópila com a parte externa da camada fibrilar para eliminar a orientação espermática e a atração para a micrópila; endurecimento do córion pela alveolina e pela transglutaminase, seguido pela diminuição do diâmetro da micrópila, resultando no fechamento da entrada para os espermatozóides supranumerários (Murata et al., 2003).

3.5 Desenvolvimento inicial em peixes

O termo ontogenia é definido como alterações morfológicas e fisiológicas ocorridas no indivíduo desde a fecundação do ovo até a sua forma

adulta. O termo desenvolvimento é usado, no sentido mais amplo, como “mudanças resultantes da ontogenia e crescimento” (Fuiman, 1994; Fuiman & Higgs, 1997).

Os principais eventos do desenvolvimento inicial dos peixes são: ativação do ovócito (1), eclosão (2), primeira ingestão oral e digestão intestinal (3) e a conclusão da reabsorção do vitelo (4). Entre as fases 1 e 3, o vitelo é a única fonte de energia (período de alimentação com o vitelo - alimentação endógena), entre a fase 3 e 4, tanto o vitelo quanto o alimento exógeno são utilizados (período de alimentação mista) e, depois da fase 4, começa o período de alimentação exógena (Kamler, 2002).

O desenvolvimento embrionário inicia-se após a fertilização dos ovos, com a segregação dos pólos animal e vegetativo e a clivagem do blastodisco (Langeland & Kimmel, 1997), e termina com a eclosão da larva, após o amolecimento do córion por meio da ação de enzimas. O grau de diferenciação da larva recém-eclodida depende da espécie e está relacionada ao tamanho do ovo. O período de incubação depende desses fatores e da temperatura (Nakatani et al., 2001).

O estudo dos primeiros dias de vida dos peixes é muito importante, especialmente em espécies selvagens potencialmente viáveis para a piscicultura (Pinto & Castagnolli, 1984). A descrição dos estádios embrionários de uma espécie pode fornecer inúmeras vantagens, tais como auxiliar o reconhecimento de seus embriões em ambientes naturais, o que permite uma melhor avaliação do local de desova daquela espécie, e a detecção das alterações relacionadas aos fatores físico-químicos da água nas incubadoras, as quais poderão acarretar malformações larvais e baixas produtividades (Alves & Moura, 1992).

O período larval inicia-se após a eclosão e termina com a reabsorção do vitelo e o início da alimentação exógena (Helfman et al., 2000). O grau de diferenciação da larva recém-eclodida varia entre as espécies, dependendo do

tamanho do ovo (Blaxter, 1969). A maioria das larvas de peixes de água doce eclode com boca e mandíbulas ainda não formadas, olhos despigmentados e saco vitelínico grande (Nakatani et al., 2001). Antes da abertura da boca, as larvas nutrem-se do vitelo, que é reabsorvido constantemente através de endocitose via camada sincicial vitelínica (Shahsavarani, et al., 2002). Para evitar aumento da mortalidade larval, a alimentação exógena deve iniciar a partir do momento em que o vitelo foi completamente reabsorvido (Tengjaroenkul et al., 2002).

Durante os períodos embriogênico e larval, os processos dominantes são o crescimento, a diferenciação dos tecidos e as mudanças fisiológicas, enquanto que, em juvenis, é o crescimento, nos adultos, a reprodução e, nos indivíduos senescentes, os processos degenerativos (Fuiman, 1997).

O crescimento é um aspecto muito importante na vida de peixes jovens em relação ao potencial de sobrevivência e seu metabolismo. Altas taxas de crescimento são economicamente importantes em peixes em todos os estágios de vida. A energia metabólica pode ser requerida por via aeróbica e ou anaeróbica. Contudo, o metabolismo em larvas de peixes é aeróbico (Wieser, 1991). A síntese e a deposição de componentes corporais, como proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucleicos, são alguns dos aspectos do metabolismo aeróbico associado ao crescimento. O custo da transformação dessa quantidade de constituintes corporais é de, aproximadamente, 40% da energia contida neles (Rombough, 1994; Pedersen, 1997). Contudo, deve-se ter em mente que a energia metabólica é usada também para outros importantes processos, como atividade física, alimentação, digestão, regulação e transporte de íons.

Três períodos distintos de elevada mortalidade, separados por períodos de baixa mortalidade, são tipicamente observados durante o período de alimentação endógena dos peixes. Dois períodos ocorrem durante a embriogênese; o terceiro ocorre em larvas com saco vitelínico. O primeiro período de elevada mortalidade é logo após a fertilização do ovócito; o segundo

ocorre durante a eclosão (por exemplo, a mortalidade acumulada da fertilização até o final da eclosão). O terceiro período de elevada mortalidade é a mortalidade por inanição, quando as reservas de vitelo são esgotadas e há ausência do alimento externo (Kamler, 2005).

A inanição pode ser um importante agente indireto de mortalidade (Bailey & Houde, 1989) porque o status nutricional pode influenciar diferentes aspectos da sobrevivência larval. Além de causar mudanças na habilidade para se manter em uma profundidade preferida na coluna d'água (Blaxter & Ehrlich, 1974), a inanição leva a uma diminuição na taxa de crescimento (Bisbal e Bengtson, 1995), ao desenvolvimento lento (Høbie et al., 2000) e a mudanças no comportamento, objetivando guardar ou buscar energia (Blaxter & Ehrlich, 1974; Chick & Van den Avyle, 2000).

3.6 Morfometria corporal

A morfometria, de modo geral, pode ser definida como o estudo da forma e tamanho, e de como estas duas variáveis se relacionam. Assim, constitui uma ferramenta para entender a relação destas com diversas outras variáveis, como, por exemplo, a idade, o sexo ou as relações históricas entre os organismos estudados (Moraes, 2003).

Do ponto de vista econômico, o parâmetro mais importante a ser melhorado em um programa de seleção é o crescimento (Huang & Liao, 1990), que tem como um dos componentes o formato do corpo, expresso por medidas ou índices morfométricos (Reist, 1985).

A forma externa do corpo tem grande importância na escolha do processamento realizado pela indústria, influenciando nas operações de decapitação, evisceração e limpeza geral por métodos manuais e mecanizados; no dimensionamento das caixas, câmaras e outros implementos para a armazenagem; na adequação e no rendimento da carne quando pré-processada

na forma de corpo limpo, postas ou filés e na velocidade de resfriamento com gelo e de congelamento, a bordo ou na indústria (Contreras-Guzmán, 1994).

Os peixes que apresentam forma de torpedo possuem alto rendimento devido à massa muscular cilíndrica. Os atuns, bonitos, serras, sardinhas, curimatás e outros fusiformes têm rendimento de filé com pele superior a 54%. Os fusiformes alongados, como a sororoca e a bicudinha, também dão rendimentos elevados; entretanto, peixes comprimidos, como o cangulo, a corvina, o pargo, a ciova e a tilápia, estão entre as espécies de rendimento mais baixo (inferior a 42%) (Contreras-Guzmán, 1994).

É de fundamental importância estudar as características morfométricas de uma determinada espécie e estabelecer relações entre as medidas componentes, mesmo que os resultados obtidos sejam referentes a qualidades anatômicas, caracterização de carcaça e rendimentos. Esse estudo pode propiciar um maior interesse econômico pela espécie, bem como servir de referência para outros estudos.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBRECHT, M. P. **Estrutura trófica da ictiofauna do rio Tocantins na região de influência da usina hidrelétrica Serra da Mesa, Brasil Central.** 2005. 212 p. Tese (Doutorado em Ecologia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- ALVES, M.S.D.; MOURA, A. Estádios de desenvolvimento embrionário de curimatã-pioa *Prochilodus affinis* (Reinhardt, 1874) (Pisces, Prochilodontidae). In: ENCONTRO ANUAL DE AQUICULTURA DE MINAS GERAIS, 10., 1992, Três Marias. **Anais...** Três Marias: CODEVASF, 1992. p. 61-71.
- ARUKWE, A.; GOKSØYR, A. Eggshell and egg yolk proteins in fish: hepatic proteins for the next generation: oogenetic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption. **Comparative Hepatology**, London, v. 2, n. 1, p. 4, Mar. 2003.
- BACCETTI, B. et al. Fish germinal cells : I comparative spermatology of seven cyrinid species. **Gamete Research**, New York, v. 10, n. 4, p. 373-396, Jun. 1984.
- BAILEY, K. M., HOUDE, E. D. Predation on eggs and larvae of marine fishes and the recruitment problem. In: BLAXTER, J. H. S.; SOUTHWARD, A. J. (Ed.). **Advances in Marine Biology**, v. 25. London: Academic Press. 1989. p. 1-83.
- BAZZOLI, N. **Ovogênese em peixes teleósteos neotropicais de água doce.** 1992. 191 p. Tese (Doutorado em Morfologia) - Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- BLAXTER, J. H. S., EHRLICH, K. F. Changes in behaviour during starvation of arenque and plaice larvae. In: Blaxter, J.H.S. (Ed.). **The Early Life History of Fish.** Springer-Verlag, Berlin, 1974. p. 575-588.
- BLAXTER, H. H. S. Development: eggs and larval. In: HOAR W. S.; RANDALL, D. J (Ed.) **Fish Physiology**. San Diego: Academic Press, 1969. p. 178-252.
- BILLARD, R. Artificial insemination in fish. In: LAMMING, G. E. (Org.). **Marshall's physiology of reproduction.** 4. ed. Endinburgh: Churchill Livingstone, 1990. Chap. 9, p. 870-887.

BILLARD, R. Changes in the structure and fertilizing ability of marine and freshwater fish spermatozoa diluted in media of various salinities. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 14, p. 187-198, 1978.

BISBAL, G. A., BENGTON, D. A. Description of the starving condition in summer flounder, *Paralichthys dentatus*, early life stages. **Fisheries Bulletin**, Seattle, v. 93, n. 1, p. 217-230, 1995.

BRIVIO, M. F.; BASSI, R.; COTELLI, F. Identification and characterization of the major components of the *Oncorhynchus mykiss* egg chorion. **Molecular Reproduction Development**, Ohio, v. 28, p. 85-93, Jan. 1991.

BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A.; GHAZZI M. S. **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2007. 195 p.

CHICK, J. H.; AVYLE, M. J. van den. Effects of feeding ration on larval swimming speed and responsiveness to predator attacks: implications for cohort survival. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Toronto, v. 57, n. 1, p. 106-115, Jan. 2000.

COMPANHIA ENERGÉTICA DE MINAS GERAIS, FUNDAÇÃO CENTRO TECNOLÓGICO DE MINAS GERAIS – CEMIG/CETEC. **Guia ilustrado de peixes da bacia do rio Grande**. Belo Horizonte: CEMIG/CETEC, 2000. 144 p.

CONTRERAS-GUZMÁN, E. S. **Bioquímica de pescados e derivados**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 409 p.

COSSON, J. et al. Ionic factors regulating the motility of fish sperm. In: GAGNON, C. (Ed.) **The male gamete: from basic science to clinical applications**. Vienna: Cache River Press, 1999. Chap. 16, p. 162-186.

COSSON, J. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. **Aquaculture International**, Dordrecht, v. 12, n. 1, p. 69-85, Jan. 2004.

COWARD, K. et al. Gamete physiology, fertilization and egg activation in teleost fish. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, London, v.12, n.1, p.33-58, Mar. 2002.

DELL, A. et al. The glycobiology of gametes and fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1473, n. 1, p. 196-205, Dec. 1999.

FONSECA, V. O. et al. **Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1992. 69 p.

FUIMAN, L. A.; HIGGS, D. M. Ontogeny, growth and the recruitment process. In: CHAMBERS, R. C.; TRIPPEL, E. A. (Eds.), **Early Life History and Recruitment in Fish Populations**. London: Chapman & Hall, 1997. p. 225-249.

FUIMAN, L. A. The interplay of ontogeny and scaling in the interactions of fish larvae and their predators. **Journal of Fish Biology**, London, v. 45, p. 55-79, Dec. 1994. Suppl. A.

FUIMAN, L. A. What can flatfish ontogenies tell us about pelagic and benthic lifestyles? **Journal Sea Research**, Canadá, v. 37, n. 3-4, p. 257-267. Nov. 1997.

GRIERSON J. P; NEVILLE A. C. Helicoidal architecture of fish eggshell. **Tissue and Cell**, v.13, n. 4, p. 819-830, Aug. 1981.

GURAYA, S. S. Recent advances in the functional morphology of follicular wall, egg-surface components, and micropyle in the fish ovary. In: MUNSHI, J. S. D.; DUTTA, H. M (Ed.) **Fish morphology: horizon of new research**. USA, Sp Science Publishers, 1996. p. 114-144.

HART, N. H. Fertilization in teleost fish: Mechanisms of sperm-egg interactions. **International Review Cytology**, v.121, p.1-66, 1990.

HELFMAN, G. S.; COLLETTE, B. B.; FACEY, D. E. **The diversity of fishes**. Massachusetts: Blackwell Science, USA, 2000, cap. 9, p. 117-134.

HØBIE, H., FOLKVORD, A., JOHANNESSEN, A., A multivariate analysis of condition of herring larvae from different environmental conditions. **ICES C. M. R**, Bruges, v. 4, p. 1-10, 2000.

HUANG, C. M.; LIAO, I. C. Response to mass selection for growth rate in *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 85, n. 1/4, p. 199-205, Mar. 1990.

IWAMATSU, T.; OHTA, T. Electron microscopic observation on sperm penetration and pronuclear formation in the medaka egg. **Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 205, p.157-180, Aug. 1978.

- JAMIESON, B. G. M. **Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa**. Cambridge: Cambridge University, 1991. 319 p.
- JANVIER, P. Catching the first fish. **Nature**, London, v. 402, n. 6758, p. 21-22, Nov. 1999.
- KAMLER, E. Ontogeny of yolk-feeding fish: an ecological perspective. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 12, n. 1, p. 79-103, Mar. 2002.
- KAMLER, E. Parent-egg-progeny relationships in teleost fishes: an energetics perspective. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, London, v. 15, n. 4, p. 399-421, Nov. 2005.
- LANGELAND, J. A.; KIMMEL, C. B. Fishes In: GILBERT, S. F.; RAUNIO, A. M. (Eds.) **Embryology: construting the organism**. Sunderland: Sinauer Associates, 1997. cap. 19, p. 383-407.
- LI, Y. H.; WU, C. C.; YANG, J. S. Comparative ultrastructural studies of the zona radiata of marine fish eggs in three genera in Perciformes. **Journal of Fish Biology**, London, v. 56, n. 3, p. 615-621, Mar. 2000.
- LIMA, F. C. T. **Revisão taxonômica do gênero *Brycon* Muller & Troschel, 1844, dos rios da América do Sul cisandina (Pisces, Ostariophysi, Characiformes, Characidae)**. 2001. 312 p. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo.
- LIMA, F. C. T.; ALBRECHT, M. P.; PAVANELLI, C. S.; VONO, V. Threatened fishes of the world: *Brycon nattereri* Günther, 1864 (Characidae). **Environmental Biology of Fishes**, Netherlands, v. 1, p. 1-2, Dec. 2007.
- LUZ-AGOSTINHO, K. D. G. BINI, L.M., FUGI, R., AGOSTINHO, A. A., JÚLIO, JR. H. F. Food spectrum and trophic structure of the ichthyofauna of Corumbá reservoir, Paraná river Basin, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, Porto Alegre, v. 4, n. 1, p. 61-68, Mar. 2006.
- MATTEI, X. Spermatozoon ultrastructure and its systematic implications in fishes. **Canadian Journal Zoology**, Toronto, v. 69, n. 12, p. 3038-3055, Dec. 1991.
- MATTEI, X. Spermiogenése compare dès Poisson. In: BACCETTI, B. (Ed.) **Comparative spermatology**. New York: Academic Press, 1970. p. 57-72.

MENGERINK, K. J.; VACQUIER, V. D. Glycobiology of sperm-egg interactions in deuterostomes. **Glycobiology**, London, v.11, n.4, p. 37R-43R, 2001.

MORAES, D. A. **A morfometria geométrica e a “Revolução na Morfometria” localizando e visualizando mudanças na forma dos organismos**. São Paulo: USP/Departamento de Biologia, 2003. (Boletim, Ano III, n. 3).

MORISAWA, M. et al. Initiation of sperm motility in teleosts. **Journal Submicroscope Cytology**, Tokyo, v. 15, n. 1, p. 61-65, Jan. 1983.

MORISAWA, M. et al. Transmembrane signal transduction for the regulation of sperm motility in fishes and ascidians. In: GAGNON, C. (Ed.), **The male gamete: from basic knowledge to clinical applications**. Vienna, USA: Cache River Press, 1999. p. 149-160.

MURATA, K. Blocks to Polyspermy in Fish: A Brief Review. In: SYMPOSIUM ON AQUACULTURE AND PATHOBIOLOGY OF CRUSTACEAN AND OTHER SPECIES, 32., 2003, Santa Barbara. **Anais...** Santa Barbara: UJNR Aquaculture Panel Proceedings, 2003.

NAGAHAMA, Y.; The functional morphology of teleost gonads. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J.; DONALDSON, E. M. (Ed.). **Fish physiology**. New York: Academic Press, 1983. v. 9, p. 233-275.

NAKATANI, K. et al. **Ovos e larvas de peixes de água doce**. Maringá: EDUEM, 2001. 378 p.

OPPEN-BERNTSEN, D. O. **Oogenesis and hatching in teleostean fishes with special reference to eggshell proteins**. 1990. 150 p. Ph.D. Thesis - University of Bergen, Norway.

PEDERSEN, B. H. The cost of growth in young fish larvae, a review of new hypotheses. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 155, n. 1, p. 259-269, Sept. 1997.

PINTO, M.L.G.; CASTAGNOLLI, N. Desenvolvimento inicial do pacu *Colossoma mitrei* (Berg, 1895). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 3., São Carlos, 1983. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 1984. p.523-535.

REIST, J. D. An empirical evaluation of several univariate methods that adjust for size variation in morphometric data. **Canadian Journal of Zoology**, Toronto, v. 63, n. 6, p. 1429-1439, Jun. 1985.

RIEHL, R. Surface morphology and micropyle as a tool for identifying fish eggs by scanning electron microscopy. **Microscopy and Analysis**, p.29-31, may 1993.

RIZZO, E.; GODINHO, H. P. Superfície dos ovos de peixes Characiformes e Siluriformes. In: GODINHO, H. P.; GODINHO, A. L. (Org.). **Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais**. Belo Horizonte: PUC Minas, 2003. p. 115-132.

RIZZO, E. et al. Adhesiveness and surface patterns of eggs in neotropical freshwater teleosts. **Journal of Fish Biology**, London, v. 61, n. 3, p. 615-632, Sept. 2002.

ROMBOUGH, P. J. Energy partitioning during fish development: additive or compensatory allocation of energy to support growth? **Functional Ecology**, v. 8, p. 178-186, 1994.

ROSA, R. S.; LIMA F. C. T. Peixes. In: MACHADO AB, MARTINS C. S.; DRUMMOND, G. M. (eds) Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. Belo Horizonte: Biodiversitas, 2005. p 157.

SATO, Y. **Reprodução de peixes da bacia do rio São Francisco: indução e caracterização de padrões**. 1999. 198 p. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade Federal São Carlos, São Carlos.

SHAHSAVARANI, A. et al. A novel technique for the separation of yolk from the developing embryonic tissue in a teleost fish, *Oncorhynchus mykiss*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 24, n. 4, p. 321-326, Mar. 2002.

SUQUET, M. et al. The aging phenomenon of turbot spermatozoa: effects on morphology, motility and concentration, intracellular ATP content, fertilization, and storage capacities. **Journal of Fish Biology**, London, v. 52, p. 31-41, 1998.

TAKAI, H.; MORISAWA, M. Change in intracellular K⁺ concentration caused by external osmolality change regulate sperm motility of marine and freshwater teleosts. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 108, n. 3, p. 1175-1181, Mar. 1995.

TENGJAROENKUL, B. et al. Ontogenic development of the intestinal enzymes of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 211, p. 241-251, Dec. 2002.

VIEIRA, F.; SANTOS, G. B.; ALVES, C. B. M. A ictiofauna do Parque Nacional da Serra do Cipó (Minas Gerais, Brasil) e áreas adjacentes. **Lundiana**, Belo Horizonte, v. 6, p. 77-87, nov. 2005.

VIVEIROS, A. T. M. Criopreservação de sêmen de peixes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., 2005, Goiânia, GO. **Palestras...** Goiânia: Colegio Brasileiro de Reprodução Animal, 2005.

WIESER, W. Limitations of energy acquisition and energy use in small poikilotherms: evolutionary implications. **Functional Ecology**, London, v. 5, n. 2, p. 234-240, 1991.

WINEMILLER K. O. Patterns of variation in life history among South American fishes in seasonal environments. **Oecologia**, Berlin, v. 81, p. 225-241, Oct. 1989.

YU, S. et al. Binding of rainbow trout sperm to egg is mediated by strong carbohydrate-to carbohydrate interaction between (KDN)GM3 (deaminated neuraminyl ganglioside) and Gg3-like epitope. **Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America**, v. 99, n. 5, p. 2854-2859, 2002.

ZANIBONI-FILHO, E.; REYNALTE-TATAJE, D.; WEINGARTNER, M. Potencialidad del género *Brycon* en la piscicultura brasileña. **Revista Colombiana Ciencias Pecuarias**. Medellín, v. 19, n. 2, p. 233-240, 2006.

CAPÍTULO II

PARÂMETROS REPRODUTIVOS E MORFOLOGIA DOS GAMETAS DE *Brycon nattereri*

1 RESUMO

Maria, A. N. Parâmetros reprodutivos e morfologia dos gametas de *Brycon nattereri*. In _____. **Caracterização ultra-estrutural dos gametas, aspectos da fertilização e desenvolvimento inicial de pirapitinga *Brycon nattereri* (Günther, 1864)**. 2008. 115 p. Tese (Doutorado em Produção Animal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

O trabalho foi realizado na Estação de Piscicultura da Companhia Energética de Minas Gerais (Cemig), em Itutinga, MG, nos meses de maio e agosto de 2006 e 2007. Os objetivos deste trabalho foram obter informações sobre os parâmetros reprodutivos do *B. nattereri* e caracterizar morfologicamente seus gametas, fornecendo, assim, subsídios para o aprimoramento da reprodução em cativeiro. Para caracterizar os ovócitos de *B. nattereri* quanto à sua distribuição de frequência de diâmetros, do estágio de desenvolvimento, da caracterização morfológica e da análise histoquímica de carboidratos, amostras foram retiradas das fêmeas, por meio de biópsia ovariana. Foram selecionados, para a reprodução induzida, fêmeas e machos e, então, submetidos à indução da desova e espermição por hipofiseção. As fêmeas (379 ± 79 g de peso) receberam as doses de 0,4 e 4,0 mg de de extrato bruto de hipófise de carpa/kg de peso corporal com intervalo de 12 horas entre as aplicações e os machos (369 ± 67 g de peso) receberam dose única (4,0 mg/kg de peso corporal), no mesmo momento da aplicação da segunda dose nas fêmeas. A extrusão de ovócitos e a coleta do sêmen foram realizadas por meio de massagens na cavidade celomática, 14 horas após a aplicação da injeção de hipófise, com água à temperatura de $18 \pm 1^\circ\text{C}$. A distribuição da frequência percentual dos diâmetros dos ovócitos intra-ovarianos nos exemplares utilizados neste estudo foi do tipo unimodal, com moda em 2312 μm . A maior parte dos ovócitos canulados estava com vitelogenese completa, com núcleo central ou ligeiramente excêntrico. Foram detectados polissacarídeos neutros na zona

radiata e nos glóbulos de vitelo, polissacarídeos carboxilados nos alvéolos corticais e polissacarídeos neutros e carboxilados nas células foliculares. Mais de 50% das fêmeas respondeu positivamente à hipofiseção e as taxas de eclosão variaram entre 0,6% e 23,6%. Os ovócitos de *B. nattereri* são levemente adesivos de coloração vinho ou marrom, sendo liberados, em média, 8.222 ovócitos na desova. O ovócito apresenta micrópila no pólo animal e padrão de superfície constituído pela zona radiata lisa com poros-canais simples. O sêmen liberado pelos machos apresentou as seguintes características: coloração branca e aspecto leitoso, volume médio de 5,6 mL e concentração espermática de 42×10^9 espermatozoides por mL. Os espermatozoides apresentaram 35,06 μm de comprimento total, cabeça ovóide (comprimento = 2,00 μm e largura = 1,22 μm) sem vesícula acrossomal, peça intermediária curta (comprimento = 2,15 μm) e longo flagelo (comprimento = 30,90 μm) com arranjo axonêmico do tipo 9+2. Estes resultados fornecem subsídios para o desenvolvimento das técnicas de reprodução induzida da espécie.

* Comitê Orientador: Ana Tereza de Mendonça Viveiros - UFLA (Orientadora), José Camisão de Souza - UFLA e Rilke Tadeu Fonseca Freitas - UFLA (co-orientadores)

2 ABSTRACT

Maria, Alexandre Nizio. Reproductive parameters and gametes morphology of *Brycon nattereri*. In **Ultrastructural characterization of gametes, aspect fertilization and initial development of pirapitinga *Brycon nattereri* (Günther, 1864)**. 2008. 115 p. Ph.D. Thesis (Animal Production) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

The work was carried out at the Fisheries of the Companhia Energética de Minas Gerais (Itutinga/MG) in the months of May and August of 2006 and 2007. The aims of this study were to obtain information on the reproductive parameters of *B. Nattereri* and characterize the morphology of their gametes, thus providing subsidies for the improvement of breeding in captivity. To characterize the oocytes of *B. Nattereri* how much distribution of frequency of diameters, the stage of development, morphological characterization and histochemical analysis of carbohydrates, samples were taken of the females through ovarian biopsy. Were selected for reproduction induced females and males and then submitted to induce spawning in spermiation through hypophysation. The females (379 ± 79 g in weight) received the doses of 0.4 and 4.0 mg of crude extract of the carp pituitary/kg body weight with an interval of 12 hours between applications and males (369 ± 67 g weight) received single dose (4.0 mg/kg body weight), at the same time the implementation of the second dose in females. The extrusion of oocytes and collecting the semen was accomplished through massages in the celomatic cavity, 14 hours after application of the injection of pituitary, with the water temperature of $18 \pm 1^\circ\text{C}$. The diameters frequency distribution of the oocytes intra-ovarian in the specimens used in this study was the type unimodal with moda in 2312 μm . Most of the oocytes cannuled were with complete vitellogenesis with middle or slightly eccentric nucleus. Neutral polysaccharides were detected in the zona radiata and yolk globules, carboxilated polysaccharides in cortical alveoli and

neutral and carboxylated polysaccharides in follicular cells. Over 50% of females responded positively to hypophysation and hatching rates ranged between 0.6 and 23.6%. The *B. nattereri* oocytes are weakly adhesive, wine or brown colored, spawning in average 8222 oocytes. The oocyte presents a micropyle in animal pole and a pattern of surface consists of a smooth zona radiata with simple pore-canals. The semen released by males presented the following characteristics: colour white and milky appearance, average volume of 5.6 mL and concentration of 42×10^9 sperm per mL. The spermatozoon presented a total length of 35.06 μm , ovoid-shaped head (length = 2.00 μm and width = 1.22 μm) without vesicle acrossomal, short midpiece (length = 2.15 μm) and long flagellum (length = 30.90 μm) with axonemic arrangement type 9+2. These results provide subsidies for the development of techniques of induced reproduction of the species.

* Comitê Orientador: Ana Tereza de Mendonça Viveiros - UFLA (Orientadora), José Camisão de Souza- UFLA e Rilke Tadeu Fonseca de Freitas – UFLA (co-orientadores)

3 INTRODUÇÃO

O crescente interesse pelos peixes teleósteos, nas últimas décadas, tem fornecido preciosas informações sobre diferentes aspectos da biologia reprodutiva destes animais que, apesar de apresentarem características comuns, mostram grande variabilidade, não permitindo generalizações. O conhecimento dos parâmetros reprodutivos de uma espécie é importante para determinar a época de reprodução e o tipo de desova, bem como verificar as estratégias que a mesma pode utilizar no ambiente em que vive (Vazzoler, 1996).

A maior parte dos peixes do gênero *Brycon* é de piracema (reofílico), com período reprodutivo nos meses chuvosos e com temperaturas mais elevadas. A pirapitinga *Brycon nattereri*, diferentemente das outras espécies desse gênero, se reproduz nos meses mais secos e com temperaturas mais baixas. Apesar de não realizar grandes migrações, a pirapitinga se assemelha aos peixes reofílicos, não se reproduzindo naturalmente em condições de cativeiro, sendo necessária a indução da reprodução por meio da aplicação de hormônios.

Após serem desovados, os ovos dos peixes de água doce podem ser livres ou não-adesivos, como geralmente é observado nas espécies que realizam grandes migrações reprodutivas, e adesivos, em diferentes graus, como é observado nas espécies sedentárias (Sato, 1999). Análises dos padrões de superfície em ovos recém-desovados mostram, em geral, projeções da zona radiata na forma de glóbulos, vilos e filamentos em ovos adesivos, e zona radiata lisa com poros-canais simples ou recoberta por fina rede fibrilar em ovos não-adesivos (Rizzo et al., 2002). Além dos arranjos de superfície, outros critérios também são necessários para caracterização e a identificação dos ovos de peixes ao microscópio eletrônico, tais como: diâmetro do ovo, distância entre os poros-canais da zona radiata, diâmetro dos poros e morfologia da micrópila (Riehl, 1993; Li et al., 2000; Gomes et al., 2007).

Em estudos sobre a biologia dos espermatozoides de peixes teleósteos também é demonstrada ampla variação na morfologia (Jamieson, 1991) e fisiologia (Morisawa et al., 1983). Apesar de uma “simplicidade” em geral evidente, os espermatozoides dos teleósteos exibem ampla escala de características estruturais modificadas, o que impossibilita a descrição de um tipo espermático comum (Mattei, 1970).

O conhecimento da ultra-estrutura do espermatozoide é importante na sistemática e na filogenia, assim como tem aplicações práticas relacionadas à fertilização artificial e à preservação espermática (Billard, 1978; Suquet et al., 1998).

Apesar da existência de estudos sobre as características reprodutivas de alguns *Bryconídeos*, como *B. orbignyanus* (Lamas, 1993), *B. orthotaenia* (Sato et al., 2003ab) e *B. amazonicus* (= *B. cephalus*) (Romagosa et al., 2001; Pardo-Carrasco et al., 2006), não foi encontrado, na literatura, nenhum estudo sobre *B. nattereri*. Essa espécie se encontra ameaçada de extinção e, devido à escassez de informações básicas, não se tem obtido sucesso na reprodução artificial. Com isso, o objetivo deste trabalho foi obter informações sobre os parâmetros reprodutivos da pirapitinga e caracterizar, morfologicamente, seus gametas, fornecendo, assim, subsídios para o aprimoramento da reprodução em cativeiro.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização deste estudo foram examinados 16 machos e 19 fêmeas de pirapitinga, confinados há mais de quatro anos na Estação de Piscicultura da Companhia Energética de Minas Gerais (Itutinga, MG), durante o provável período reprodutivo dessa espécie, entre os meses de maio e agosto de 2006 e 2007.

4.1 Diâmetro, histologia e histoquímica dos ovócitos

A cada semana, foram selecionadas fêmeas para reprodução, por meio de características externas (ventre abaulado, poro genital dilatado e vascularizado) que sugeriam que esses animais estavam responsivos a hipofiseação. Após a seleção, as fêmeas foram avaliadas por meio da biópsia ovariana para a determinação do estágio de desenvolvimento, da caracterização morfológica e da histoquímica de carboidratos dos ovócitos. Para isso, foram coletadas duas amostras de ovócitos (contendo 20 a 30 ovócitos cada amostra) por fêmea ($n = 19$) com auxílio de um cateter uretral plástico número 8 introduzido na abertura urogenital. Uma das amostras foi fixada em solução de Gilson (50 mL de álcool 60%; 440 mL de água destilada; 7 mL de ácido nítrico; 10g de cloreto mercúrico; 9 mL de ácido acético glacial - Simpson, 1951), por 30 minutos. Após esse período, os ovócitos foram medidos sob microscópio estereoscópico, com auxílio de ocular micrométrica e as frequências percentuais dos diâmetros dos ovócitos foram calculadas por classe de 100 μm . A outra amostra de ovócitos foi fixada em líquido de Bouin por 12 horas e, então, submetida às técnicas histológicas de rotina: inclusão em parafina e glicol-metacrilato, cortes de 3 a 5 μm de espessura e coloração com hematoxilina-eosina (HE). Para a detecção de carboidratos (polissacarídeos neutros e carboxilados) nas estruturas externas e internas dos ovócitos foram utilizadas técnicas histoquímicas

clássicas, periodic acid Schiff (PAS) e alcian blue (AB) com pH 2,5 (Pearse, 1985), no Departamento de Morfologia do ICB/UFMG.

4.2 Reprodução induzida e avaliação dos parâmetros reprodutivos

Os machos ($n = 16$) e as fêmeas ($n = 19$) utilizados na reprodução foram transferidos do tanque de terra para um aquário, 48 horas antes da indução hormonal. A temperatura média da água no aquário foi de $18 \pm 1^\circ\text{C}$ e o teor de oxigênio variou entre 7 e 8 mg/L.

Para a indução da reprodução de machos e fêmeas, foi utilizado, neste estudo, extrato de hipófise de carpa (EBHC), nas dosagens normalmente utilizadas em outra espécie do gênero *Brycon*, cultivada no mesmo laboratório de reprodução (Maria et al., 2006ab). Cada fêmea recebeu duas injeções intramusculares de EBHC, nas doses de 0,4 e 4,0 mg/kg de peso corporal, com intervalo de 12 horas entre aplicações. A extrusão dos ovócitos foi realizada entre 14 e 18 horas após a última aplicação hormonal, por meio de massagens na cavidade celomática das fêmeas. De cada fêmea que respondeu ao tratamento com EBHC foram avaliados os seguintes parâmetros: peso corporal (g), comprimento padrão (cm), comprimento total (cm), peso da desova (g), índice de desova (%) (peso da desova \times 100/peso corporal da fêmea), número de ovócitos extruídos/g de desova, número total de ovócitos extruídos na desova, número de ovócito/g de peso corporal e horas-grau até a extrusão. Após a extrusão, uma amostra de ovócitos foi coletada e fixada em solução de Gilson por 30 minutos, para avaliação da distribuição de frequência dos diâmetros dos ovócitos após a indução (de acordo com metodologia descrita no item 4.1, para os ovócitos coletados por meio de canulação antes da indução). O grau de adesividade dos ovócitos foi determinado segundo critérios adotados por Rizzo et al. (2002), com a seguinte classificação: adesivos, levemente adesivos e não adesivos.

Os machos foram avaliados como sexualmente maduros por meio da liberação de sêmen pela papila urogenital após uma leve compressão na cavidade celomática. Cada macho recebeu uma dose intramuscular de 4,0 mg de EBHC/kg do peso corporal no mesmo momento da aplicação da segunda dose nas fêmeas. O sêmen foi coletado no momento da desova, em tubos de ensaio de 5 mL. Nos machos, foram avaliados os seguintes parâmetros: peso corporal (g), comprimento padrão (cm), comprimento total (cm), volume espermático (mL), motilidade espermática subjetiva (%), duração da motilidade (em segundos) e concentração espermática (espermatozoides/mL). A motilidade foi avaliada em microscópio óptico após gotejamento de 1 μ L de sêmen sobre uma lâmina focalizada em 100 X. No momento da ativação espermática com água destilada (100 μ L), o cronômetro foi acionado para registrar a duração da motilidade do espermatozoide até atingir a taxa de 10%. A concentração espermática foi avaliada em câmara de Neubauer após a diluição do sêmen de cada macho ($n = 10$) em formol citrato (2,9 g citrato de sódio; 4 mL formaldeído 35%; água destilada q.s.p. 100 mL), na proporção de 1:1000 (sêmen:formol citrato).

4.3 Microscopia eletrônica e morfometria dos gametas

Uma amostra de ovócitos recém-extraídos ($n = 10$ fêmeas) e uma alíquota de sêmen ($n = 6$ machos) dos animais utilizados na reprodução induzida foram fixadas em solução de Karnovsky (glutaraldeído 2,5%; paraformaldeído 2,0% em tampão cacodilato de sódio 0,05M, pH 7,2; cloreto de cálcio 0,001M) e utilizadas para a caracterização ultra-estrutural dos gametas. As análises foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-Estrutural da UFLA. As amostras fixadas permaneceram por 24 horas, a 4°C, sendo pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1%, por 4 horas, à temperatura ambiente e desidratadas por meio de uma série crescente de acetona (25%, 50%, 75%, 90% e 100%). Para microscopia eletrônica de varredura, as amostras de ovócitos e

sêmen foram desidratadas por meio do aparelho de ponto crítico CPD 030, cobertas com ouro sob vácuo em evaporador SCD 050 e examinadas em um microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40 XVP ESC, equipado com câmera fotográfica digital. Para microscopia eletrônica de transmissão, amostras contendo espermatozóides foram incluídas em resina Spurr. Secções ultrafinas foram cortadas usando um ultramicrotomo Leica, contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo e observadas em um microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109, operado a 80kV.

As imagens digitais dos ovócitos recém-desovados e dos espermatozóides, obtidos por meio da microscopia eletrônica, foram usadas para análises morfométricas das estruturas. O diâmetro da micrópila ($n = 18$), a espessura da zona radiata ($n = 21$), o número de orifícios por μm^2 ($n = 30$) e as estruturas dos espermatozóides ($n = 70$) foram medidos por meio do software Leo-SRV32 versão para Windows.

5 RESULTADOS

5.1 Diâmetro, histologia e histoquímica dos ovócitos

A distribuição da frequência percentual dos diâmetros dos ovócitos intra-ovarianos nos exemplares utilizados neste estudo foi do tipo unimodal. O diâmetro dos ovócitos variou de 1.000 a 2.563 μm , com moda em 2.312 μm (Figura 1).

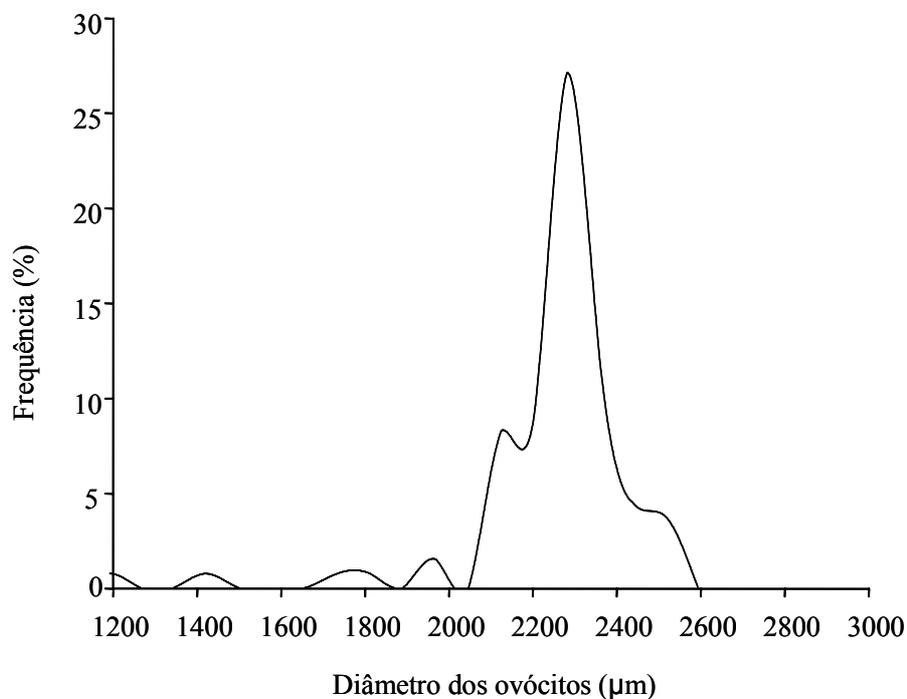


FIGURA 1. Distribuição de frequência porcentual dos diâmetros dos ovócitos intra-ovarianos de *Brycon nattereri* retirados através da canulação entre os meses de maio e agosto.

A maior parte dos ovócitos das fêmeas estudadas estava com vitelogênese completa (Figura 2), apresentando a caracterização morfológica que se segue: foliculo ovariano constituído por: 1) ovócito vitelogênico com glóbulos de vitelo ocupando a maior parte do ooplasma, alvéolos corticais de tamanhos variados em camadas e núcleo central ou ligeiramente excêntrico com vários nucléolos periféricos; 2) zona radiata com camada interna espessa e externa delgada; 3) camada de células foliculares pavimentosas apoiadas em membrana basal e 4) teca de natureza conjuntiva.

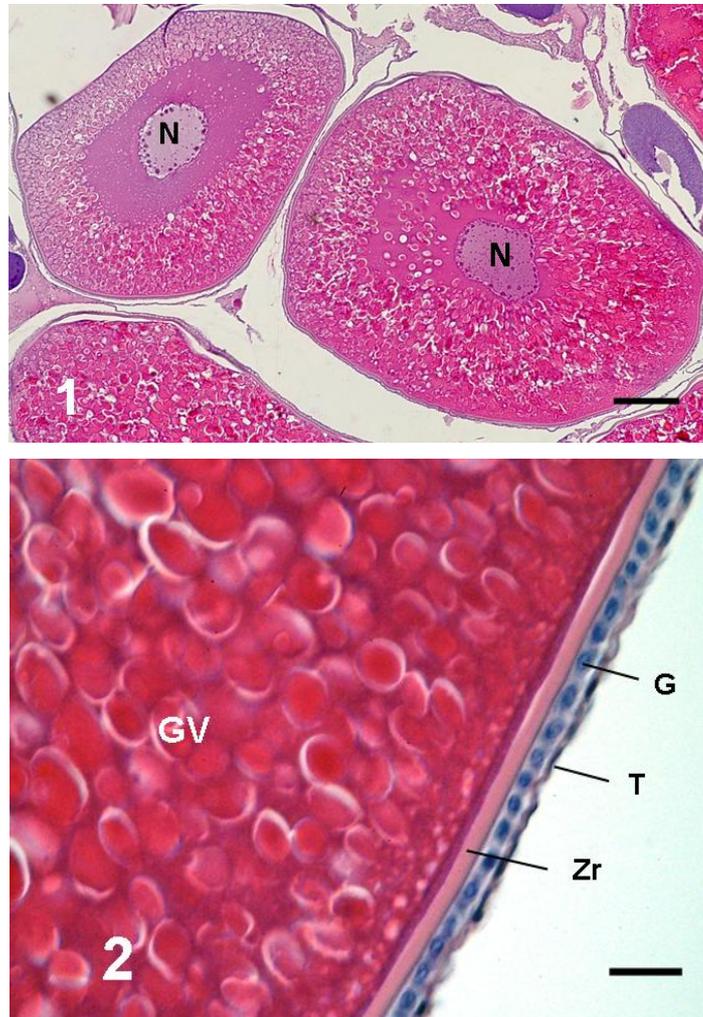


FIGURA 2. Secção histológica dos ovócitos de pirapitinga *Brycon nattereri* corados com hematoxilina-eosina: (1) ovócito vitelogênico com núcleo (N) central; Barra de escala: 310 µm; (2) envoltório (Zr: zona radiata; G: células da granulosa; T: células da teca; GV: glóbulos de vitelo); Barra de escala: 30 µm.

TABELA 1. Reatividade das estruturas ovocitárias à histoquímica de carboidratos em pirapitinga *Brycon nattereri*.

	PAS (Periodic Acid Schiff)	AB (Alcian Blue)
Células foliculares	++	+
Zona radiata	+	-
Alvéolos corticais	-	+
Glóbulos de vitelo	+	-

+: reação positiva; ++: reação fortemente positiva; -: reação negativa

Por meio da histoquímica de carboidratos, foi detectada a presença de polissacarídeos neutros nos glóbulos de vitelo e zona radiata (reação PAS positiva e AB negativa) e polissacarídeos neutros e carboxilados nas células foliculares (reação PAS positiva e AB positiva). Os alvéolos corticais, por outro lado, apresentaram apenas polissacarídeos carboxilados (Tabela 1) (Figura 3).

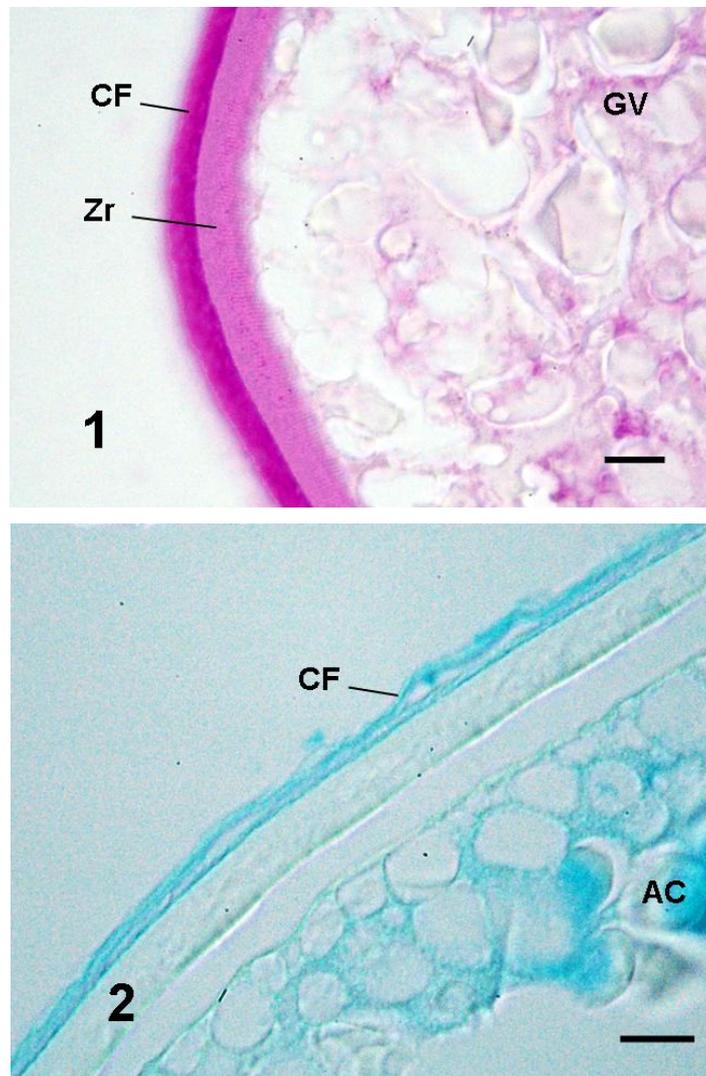


FIGURA 3. Histoquímica de carboidratos em ovócitos de pirapitinga *Brycon nattereri*: (1) reação PAS positiva (Zr, zona radiata; CF, células foliculares; GV, glóbulo de vitelo); Barra de escala: 10 µm; (2) reação AB positiva (AC, alvéolos corticais); Barra de escala: 10 µm.

5.2 Reprodução induzida e avaliação dos parâmetros reprodutivos

As fêmeas de *B. nattereri* analisadas apresentaram comprimento total variando entre 27,9 e 35,6 cm e peso total entre 300 e 500 g (Tabela 2). A extrusão dos ovócitos ocorreu após 292 ± 39 horas-grau a partir da aplicação da segunda dose de EBHC e a massa de ovócitos correspondeu a, aproximadamente, 10% do peso vivo da fêmea (índice de desova). Dentre as 19 fêmeas utilizadas neste estudo, 10 responderam positivamente à hipofiseação, com liberação de ovos férteis que apresentaram taxas de eclosão entre 0,6% e 23,6%. Os ovócitos apresentaram-se aderidos uns aos outros, mas, sob ligeira agitação, tornaram-se livres, sendo classificados como levemente adesivos. Sua coloração variou de vinho a marrom, sendo liberados, em média, 8.222 ovócitos, com diâmetro variando de 1.344 a 2.781 μm , com moda em 2.375 μm .

TABELA 2. Parâmetros analisados (média \pm DP) de fêmeas de *Brycon nattereri*, submetidas a hipofiseação.

Parâmetro	Média \pm DP	CV	Amplitude
Peso corporal (g)	379 \pm 79	21	300-500
Comprimento padrão (cm)	28,7 \pm 1,8	6	25,0-31,6
Comprimento total (cm)	32,1 \pm 2,1	7	27,9-35,6
Peso da desova (g)	36,2 \pm 12,7	35	16,0-67,8
Índice de desova (%)*	10 \pm 3	27	6-14
Número de ovócitos/g desova	241 \pm 61	25	154-354
Número total de ovócitos na desova	8222 \pm 2012	24	5008-12001
Número de ovócitos/g peso corporal	23 \pm 7	30	13-36

DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação.

*Índice de desova = peso da desova x 100/peso corporal da fêmea

Todos os machos estudados entre os meses de maio e agosto (outono-inverno) estavam aptos à reprodução, liberando sêmen após uma leve

compressão na parede celômica. De maneira geral, os machos apresentaram ventre fino e seu comprimento e peso foram bem semelhantes ao das fêmeas (Tabela 3). O sêmen apresentou coloração branca e aspecto leitoso, com elevada concentração espermática, em média, 42×10^9 espermatozoides/mL.

TABELA 3. Parâmetros analisados (média±DP) de machos de pirapitinga *Brycon nattereri* submetidos a hipofiseção.

Parâmetro	<i>n</i>	Média ± DP	CV	Amplitude
Peso corporal total (g)	16	369 ± 67	18	262-470
Comprimento padrão (cm)	8	26,5 ± 1,5	6	23,5-28,6
Comprimento total (cm)	8	31,0 ± 1,5	5	27,5-32,0
Volume de sêmen (mL)	12	5,6 ± 1,1	20	4,3-8,4
Concentração espermática ($\times 10^9$ /mL)	10	42,1 ± 11,5	27	28,1-68,3
Motilidade espermática (%)	16	98 ± 5	5	80-100
Duração da motilidade (s)	7	92 ± 41	45	55-156

DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação; *n* = número de machos avaliados

5.3 Ultraestrutura e morfometria dos gametas

Os ovócitos de pirapitinga não apresentaram capa gelatinosa envolvente. O aparelho micropilar situado no pólo animal apresenta forma de funil e é constituído por um canal que cruza a zona radiata (canal micropilar) e uma depressão circular na superfície ovocitária (vestíbulo) (Figura 4.1). Uma camada de pregas interna formando sulcos no vestíbulo micropilar pode ser observada. A abertura externa do vestíbulo micropilar apresentou formato oblongo, com diâmetro maior de 20,41 μ m e menor de 18,66 μ m (Tabela 4).

A superfície externa da zona radiata mostrou-se lisa (Figura 4.2), com poros finos. A zona radiata apresentou canais entre a superfície externa e a superfície interna (Figura 4.3). A superfície interna da zona radiata mostrou

distribuição uniforme dos poros-canais, com diâmetros superiores em relação à superfície externa (Figura 4.4). O número de orifícios apresentados na superfície interna da zona radiata foi, em média, de 8 poros/ μm^2 .

TABELA 4. Morfometria da superfície de ovócitos recém-extraídos de pirapitinga *Brycon nattereri*.

	Média \pm DP
Zona radiata	
Espessura (μm)	7,72 \pm 0,31
Número de orifícios/ μm^2 *	8 \pm 1
Diâmetro da micrópila (μm)**	
Maior	20,41 \pm 2,13
Menor	18,66 \pm 1,40

* orifícios da superfície interna da zona radiata

** abertura externa da micrópila

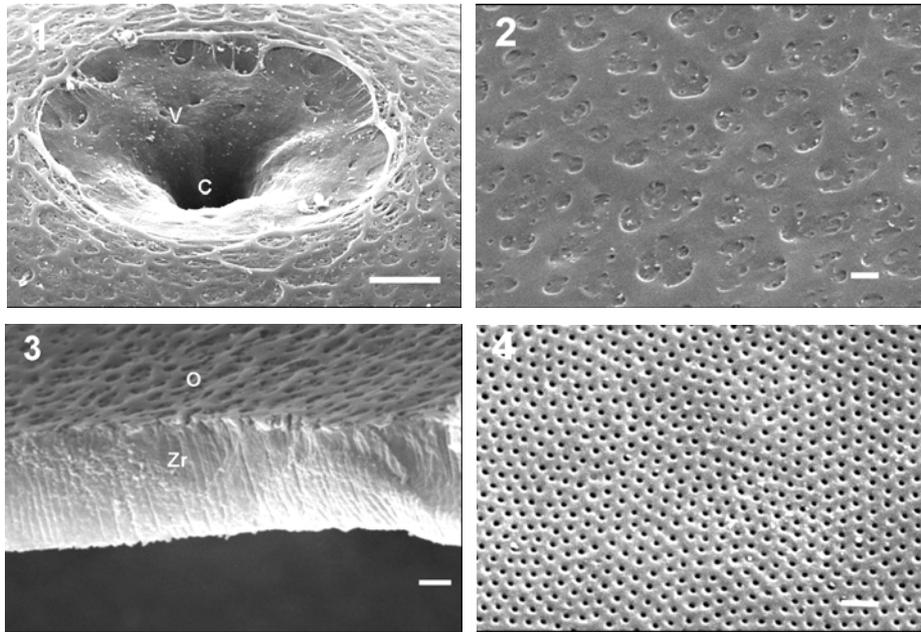


FIGURA 4. Eletromicrografias 1 a 4. Superfície dos ovócitos de *Brycon nattereri* analisados por meio de microscopia eletrônica de varredura; (1) superfície da região micropilar dos ovócitos de pirapitinga, consistindo de um canal micropilar (c) e vestibulo (v); (2) superfície externa dos ovócitos, mostrando os arranjos dos poros-canais; (3) zona radiata fraturada (Zr), mostrando canais da camada externa da zona radiata se abrindo na superfície do ovócito (o); (4) distribuição uniforme dos poros-canais na superfície interna da zona radiata. Barra de escala = 20 μ m; 2 μ m; 2 μ m e 2 μ m, respectivamente, em 1-4.

O espermatozóide de *B. nattereri* apresentou cabeça ovóide, peça intermediária e flagelo (Figura 5). Os valores médios observados em cada parâmetro estrutural dos espermatozóides encontram-se na Tabela 5.

A cabeça do espermatozóide (Figura 5.1 C) é pequena e ovóide, cercada por uma estreita faixa citoplasmática sem organelas, enquanto o acrossoma é ausente. O núcleo apresenta formato de U e, no seu interior, a cromatina é

condensada em filamentos que se arranjam na forma de grumos justapostos, entremeados por poucas áreas elétron-lúcidas (Figura 5.2). A fossa nuclear é profunda, alojando o complexo centriolar e o segmento inicial do flagelo. Como o flagelo se insere perpendicularmente ao núcleo, o espermatozóide apresenta forma simétrica. A peça intermediária é curta, podendo ser observadas mitocôndrias (Figura 5.3). No final da peça intermediária existe um prolongamento da membrana citoplasmática, formando uma bainha composta por três anéis membranosos concêntricos (Figura 5.4). O flagelo possui 30,9 μm de comprimento e tem um eixo perpendicular e medial à base do núcleo, e exhibe o axonema clássico (nove pares de microtúbulos periféricos e uma par central) (Figura 5.4).

TABELA 5. Média e desvio padrão dos diferentes parâmetros estruturais dos espermatozoides de pirapitinga *Brycon nattereri*.

Parâmetro	Dimensão (μm)
Largura da cabeça	1,22 \pm 0,09
Comprimento da cabeça	2,00 \pm 0,15
Comprimento da peça intermediária	2,15 \pm 0,38
Comprimento do flagelo	30,90 \pm 2,32
Comprimento total do espermatozóide*	35,06 \pm 2,28

*O comprimento total do espermatozóide compreende: cabeça, peça intermediária e flagelo

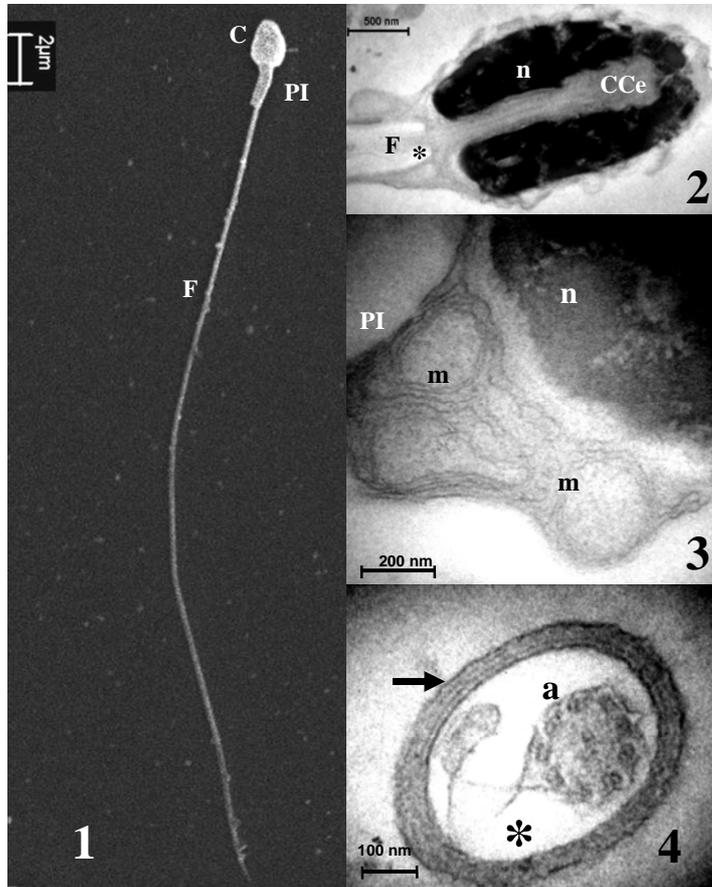


FIGURA 5. Espermatozóide de *Brycon nattereri*: (1) micrografia eletrônica de varredura mostrando a cabeça (C), peça intermediária (PI) e flagelo (F); (2-4) Micrografia eletrônica de transmissão: (2) corte longitudinal da cabeça do espermatozóide, mostrando o núcleo (n) e o complexo centriolar (CCe); (3) corte longitudinal da peça intermediária, mostrando mitocôndria (m); (4) corte transversal de parte do flagelo, mostrando axonema (a), canal citoplasmático (asterisco) e anéis membranosos concêntricos (seta).

6 DISCUSSÃO

6.1 Diâmetro, histologia e histoquímica dos ovócitos

Um dos métodos mais conhecidos para avaliar *in vivo* o estado de maturidade ovariana, com alto grau de precisão e com alto grau de repetibilidade, é por meio da biópsia dos ovócitos intra-ovarianos. Esse método tem sido validado tanto em espécies com desenvolvimento sincrônico quanto assincrônico (Shehadeh et al., 1973, Markmann & Doroshov, 1983; Alvarez-Lajonchère et al., 1983, 2001; Rodriguez & Garzo, 1986; Ferraz et al., 2004). No Brasil, essa técnica tem sido utilizada no estudo da morfologia dos ovócitos (Leonardo et al., 2004) e na caracterização do estágio de desenvolvimento gonadal de fêmeas aptas à reprodução, inclusive de *Bryconídeos* (Romagosa et al., 2001; Andrade-Talmelli et al., 2002; Narahara et al., 2002). No presente estudo, a biópsia intra-ovariana por meio da canulação mostrou-se uma técnica eficiente na avaliação *in vivo* do estágio de maturação do ovócito.

A distribuição dos diâmetros dos ovócitos de *B. nattereri* do tipo unimodal indica que a maioria dos ovócitos se apresentava em uma mesma fase de desenvolvimento. Da mesma forma, essa distribuição modal foi registrada em *Brycon insignis* (Andrade-Talmelli et al., 2002) e em *Brycon opalinus* (Narahara et al., 2002), com modas de 1.250 e 1.900 μm , respectivamente, inferiores aos 2.312 μm observados neste estudo.

O estudo histológico dos ovócitos intra-ovarianos de *B. nattereri* indicou que as fêmeas utilizadas neste trabalho estavam em estágio de maturação avançado, em que foram observados grande número de ovócitos com vitelogênese completa e núcleos na posição central ou ligeiramente excêntrica. Segundo Freire-Brasil et al. (2003), os ovócitos em final de maturação apresentam o núcleo situado na periferia da célula, enquanto que os ovócitos imaturos ou em maturação apresentam núcleo central. Esses resultados permitem

supor que, durante o processo de maturação gonadal, ocorre desenvolvimento ovocitário do tipo sincrônico em grupos (Wallace & Selman, 1981; Vlaming, 1983), possibilitando utilizar o padrão de distribuição de frequência porcentual dos diâmetros dos ovócitos como indicadores do grau de desenvolvimento dos ovários (West, 1990).

O padrão morfológico dos ovócitos de *B. nattereri* observado neste estudo foi similar àquele descrito para outras espécies de Characiformes, como *Prochilodus lineatus* (Kunkel & Flores, 1994; Freire-Brasil et al., 2003), *Astyanax bimaculatus* (Lopes, et al., 1987), *Piaractus mesopotamicus* (Lima et al., 1991; Romagosa et al., 1993) e *Colossoma macropomum* (Nakaghi, 1996).

Os resultados histoquímicos dos ovócitos, neste estudo, revelaram a presença de polissacarídeos neutros na zona radiata e glóbulos de vitelo. Essa mesma natureza química foi relatada em ovócitos não-adesivos de outros Characiformes (Bazzoli & Rizzo, 1990; Rizzo et al., 1998), enquanto que, em ovócitos adesivos, são comumente detectados polissacarídeos carboxilados, como observado em *Serrasalmus brandtii* (Rizzo & Bazzoli, 1991), *Romanichthys valsanicola* (Riehl & Patzner, 1998) e em Erythrinidae (Scarpelli, 2005; Gomes et al., 2007). Os polissacarídeos da superfície dos ovócitos de teleósteos são, normalmente, secretados pelas células foliculares durante a maturação do ovócito (Guraya, 1996).

Os alvéolos corticais dos ovócitos de *B. nattereri* apresentaram polissacarídeos carboxilados, semelhantemente ao observado em outras espécies das famílias Characidae (*B. orthotaenia* e *S. brasiliensis*) (Honorato-Sampaio, 2006) e Erythrinidae (Gomes et al., 2007). Outras famílias de Characiformes, como Anostomidae, Curimatidae e Prochilodontidae, contêm apenas glicoproteínas neutras nos seus alvéolos corticais (Bazzoli & Godinho, 1994). Além das variações espécie-específicas no conteúdo de carboidratos dos alvéolos corticais, também podem ser observadas variações na composição das

vesículas corticais durante o desenvolvimento ovocitário (Ohta et al., 1990). Os polissacarídeos carboxilados presentes nos alvéolos corticais são liberados no espaço perivitelínico durante a reação cortical, interagindo com a zona radiata, evitando a polispermia (Tyler & Sumpter, 1996).

6.2 Reprodução induzida e parâmetros reprodutivos

O conhecimento de parâmetros reprodutivos em ambientes naturais e cativos é importante porque fornece subsídios básicos para os procedimentos de cultivo e de reprodução induzida (Rizzo et al., 1997).

As amplitudes observadas nos parâmetros peso corporal e comprimento total das fêmeas de *B. nattereri* aptas à reprodução foram semelhantes à variação observada em outros briconídeos, como *B. opalinus* (Narahara et al., 2002), *B. insignis* (Andrade-Talmelli et al., 2002) e *B. orthotaenia* (Sato et al., 2003b). No entanto, características como adesividade e tamanho dos ovócitos são diferentes quando comparadas às dessas espécies. Algumas observações realizadas no hábitat da pirapitinga revelaram que os reprodutores colocam suas desovas em locais com pouca luminosidade, embaixo de pedras e nas margens, abandonando-a em seguida.

Os ovos apresentam coloração escura e ficam aderidos em substratos, como raízes e cobertos por folhas mortas (dados não publicados). Estas características de adesividade e de coloração dos ovos foram constatadas neste estudo, durante a realização da reprodução artificial. Os ovócitos recém-liberados de *B. nattereri* são levemente adesivos com diâmetro (2.375 μm) superior ao de outros briconíneos, que apresentam ovócitos não-adesivos, como *B. opalinus* (1900 μm) (Narahara et al., 2002), *B. insignis* (1250 μm) (Andrade-Talmelli et al., 2002), *B. orthotaenia* (1479 μm) (Sato et al., 2003b) e *B. orbignyanus* (1090 μm) (Zaniboni-Filho et al., 2006). Sato et al. (2003b), estudando 23 espécies de peixes do rio São Francisco, constataram que o

diâmetro dos ovócitos recém-liberados de espécies que apresentavam ovócitos adesivos era maior do que aqueles peixes que apresentavam ovócitos não-adesivos.

A avaliação da fertilidade inicial representa um subsídio na estimativa de estoques pesqueiros e produção de alevinos na piscicultura. A fertilidade inicial em *B. nattereri*, avaliada pelo número total de ovócitos postos por fêmea na desova e a fertilidade inicial relativa, avaliada pelo número de ovócitos por grama de peso corporal, podem ser consideradas baixas (8.222 ovócitos/desova e 23 ovócitos/g de peso) em relação aos outros briconíneos, como *B. insignis* (24.690 ovócitos/desova e 60 ovócitos/g de peso) (Andrade-Talmelli et al., 2002), *B. siebenthalae* (161.000 ovócitos/desova e 103 ovócitos/g de peso) (Pardo-Carrasco et al., 2002) e *B. orthotaenia* (275.400 ovócitos/desova e 105 ovócitos/g de peso) (Sato et al., 2003a), todas obtidas em condições de reprodução artificial. Os ovócitos de pirapitinga, no entanto, apresentam maior tamanho, corroborando com a idéia de que a fecundidade é inversamente proporcional ao tamanho dos ovos produzidos.

A partir da hipofisacção dos machos na dosagem de 4 mg/kg de peso, observou-se que o sêmen de pirapitinga apresentou-se branco leitoso com elevada concentração espermática. Em um outro estudo com *B. nattereri*, utilizou-se uma dosagem de hipófise de 5 mg/kg de peso e observaram um volume de sêmen maior e uma concentração espermática menor daquela observada neste estudo (Oliveira et al., 2007). O tratamento hormonal facilita a coleta porque induz hidratação testicular, causando aumento do volume de sêmen e, paralelamente, redução na concentração espermática (Viveiros et al., 2002).

6.3 Ultra-estrutura dos gametas

Os ovócitos levemente adesivos de *B. nattereri* apresentam padrão único de superfície, constituídos por zona radiata lisa com poros-canais simples. Uma zona radiata lisa constitui um aparelho menos complexo de ligação do ovo, que não garante forte adesividade (Riehl & Patzner, 1998). Padrões semelhantes foram observados em ovócitos livres de *B. orbignyana* e *B. lundii* (Rizzo et al., 2002) e também em ovócitos levemente adesivos de outras espécies de Characiformes, como *Astyanax bimaculatus lacustris*, *Curimatella lepidura* e *Triporthus guentheri* (Rizzo & Godinho, 2003).

Os ovócitos não adesivos ou pouco adesivos nos Characiformes formam um grande grupo, sendo o padrão de superfície dos ovócitos o mesmo dentro do gênero (Rizzo et al., 2002). O aspecto ultra-estrutural da micrópila é importante para a identificação de ovócitos (Riehl, 1993; Li et al., 2000). A micrópila da espécie em estudo revelou forma de funil, apresentando pregas no vestibulo micropilar, que podem ser uma estratégia para facilitar a fertilização nestas espécies. Esse mesmo padrão foi observado em outras espécies dos gêneros *Brycon* e *Salminus* (Rizzo & Godinho, 2001). Os arranjos estruturais de superfície são uma importante característica, em função das interações entre ovo e meio e podem ser utilizados como um instrumento para a compreensão dos eventos que ocorrem na fertilização (Rizzo & Godinho, 2001).

Os espermatozoides de *B. nattereri* são do tipo primitivo. A estrutura, a organização celular e o tipo de fertilização determinam a classificação dos espermatozoides. Assim, espermatozoides de cabeça esférica sem acrossoma, com peça intermediária contendo poucas mitocôndrias e cauda longa com flagelo de organização (9 + 2), são do tipo primitivo, característico de peixes de fecundação externa (Grier, 1981; Mattei, 1988), enquanto espermatozoides com cabeça alongada e peça intermediária bem desenvolvida são característicos de espécies de fecundação interna (Grier, 1981; Jamieson, 1991). O formato ovóide

da cabeça do espermatozóide de pirapitinga *B. nattereri* diferiu do formato arredondado observado em outras espécies de *Brycon* (Romagosa et al., 1999; Zaiden, 2000; Ninhaus-Silveira et al., 2006; Veríssimo-Silveira et al., 2006).

A cabeça dos espermatozóides de pirapitinga não apresenta acrossoma, o que é característica de espermatozóides de peixes, justificada pela presença da micrópila no ovócito, que auxilia o processo de fertilização.

Com base neste estudo, pode-se concluir que o *B. nattereri* apresenta desenvolvimento ovocitário tipo sincrônico em grupos, apresentando ovócitos maduros entre os meses de maio e agosto. Os ovócitos e os espermatozóides apresentaram padrões morfológicos característicos ao observado em outras espécies de *Brycon*, exceto no formato ovóide da cabeça do espermatozóide.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ-LAJONCHÈRE, L. et al. Método de muestreo in vivo de ovocitos intraovarios en las lisas *Mugil liza* y *M. curema* (Pisces, Mugilidae) y en el patao *Eugerres brasiliensis* (Pisces, Gerreidae). **Revista Latinoamericana de Acuicultura**, v. 18, p. 27-38, 1983.
- ALVAREZ-LAJONCHÈRE, L. et al. Validation of an ovarian biopsy method in a sea bass, *Centropomus medius* Günther. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 32, p. 379-384, 2001.
- ANDRADE-TALMELLI, E. F. et al. Reprodução Induzida da piabanha, *Brycon insignis* (Steindachner, 1876) (Characiformes, Bryconinae), mantida em confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 31, p. 803-811, 2002.
- BAZZOLI, N.; GODINHO, H. P. Cortical alveoli in oocytes of freshwater neotropical teleost fish. **Bollettino di Zoology**, v. 61, p. 301-308, 1994.
- BAZZOLI, N.; RIZZO, E. A comparative cytological and cytochemical study of the oogenesis in ten teleost fish species. **European Archives of Biology**, v. 101, p. 399-410, 1990.
- BILLARD, R. Changes in the structure and fertilizing ability of marine and freshwater fish spermatozoa diluted in media of various salinities. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 14, p. 187-198, 1978.
- FERRAZ, E. M. et al. Validation of an Ovarian Biopsy Method for Monitoring Oocyte Development in the Fat Snook, *Centropomus parallelus* Poey, 1860 in Captivity. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 47, n. 4, p. 643-648, Aug. 2004.
- FREIRE-BRASIL, D. et al. Análise morfológica da maturação final do ovócito em curimatá (*Prochilodus lineatus*, Valenciennes, 1836). In: CONGRESSO IBEROAMERICANO VIRTUAL DE ACUICULTURA, 2., 2003, Zaragoza. **Anais...** Zaragoza: CIVA, 2003. Disponível em: <<http://www.civa2003.org>>. Acesso em: 20 nov. 2007.

GOMES, B. V. C.; SCARPELLI, R. S.; ARANTES, F. P.; SATO, Y.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E. Comparative oocyte morphology and early development in three species of trahiras from the São Francisco River basin, Brazil. **Journal of Fish Biology**, London, v. 70, n. 5, p.1412-1429, May 2007.

GRIER, H. J. Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. **American Zoologist**, Washington, v. 21, p. 345-357, 1981.

GURAYA, S. S. Recent advances in the functional morphology of follicular wall, egg-surface components, and micropyle in the fish ovary. In: MUNSHI, J. S. D.; DUTTA, H. M (Ed.) **Fish morphology: horizon of new research**. USA, Sp Science Publishers, 1996. p. 114-144.

HONORATO-SAMPAIO, K. **Superfície ovocitária e desenvolvimento inicial de quatro espécies de peixes de interesse comercial da bacia do rio São Francisco**. 2006. 53 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

JAMIESON, B. G. M. **Fish evolution and systematics**: evidence from spermatozoa. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. 319 p.

KUNKEL L. H.; FLORES, S. A. Reproducción de *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881) Osteichthyes, Prochilodontidae: Histología y escala de maduración de ovarios. **Boletim Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 21, p. 83-94, 1994.

LAMAS, I. R. **Análise de características reprodutivas de peixes brasileiros de água doce, com ênfase no local de desova**. 1993. 72 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia, Conservação e Manejo de Vida Silvestre) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

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

LI, Y. H.; WU, C. C.; YANG, J. S. Comparative ultrastructural studies of the zona radiata of marine fish eggs in three genera in Perciformes. **Journal of Fish Biology**, London, v. 56, p. 615-621, 2000.

LIMA, R. V. A.; BERNARDINO, G.; VAL-SELLA, M. V.; FAVA-DE-MORAES, F.; SCHEMY, R. A.; BORELLA, M. I. Tecido germinativo ovariano e ciclo reprodutivo de pacus (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) mantidos em cativeiro. **Boletim Técnico do CEPTA**, Pirassununga, v. 4, p.1-46, 1991

LOPES, R. A. et al. On the reproduction of Brazilian fishes. XIII. Scanning electron microscopic study of the rhythm of development in oocyte of the lambari (*Astyanax bimaculatus*) Reinhardt, 1874 (Pisces, Characidae). **Revista Brasileira de Ciências Morfológicas**, São Paulo, v. 4, p. 99-105, 1987.

MARIA, A.N.; VIVEIROS, A. T. M.; FREITAS, R. T. F.; OLIVEIRA, A. V. Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 260, n. 1-4, p. 298-306, Sept. 2006a.

MARIA, A. N.; VIVEIROS, A. T. M.; ORFÃO, L. H.; OLIVEIRA, A. V.; MORAES, G. F. Effects of cooling and freezing on sperm motility of the endangered fish piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Characiformes, Characidae). **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 3, p. 55-60, 2006b.

MARKMANN, C.; DOROSHOV, S. I. Ovarian catheterization of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 35, p. 163-169, 1983.

MATTEI, X. Spermio genése compare dès Poisson. In: BACCETTI, B. (Ed.) **Comparative spermatology**. New York: Academic Press, p.57-72, 1970.

MATTEI, X. The flagella apparatus of spermatozoa in fish. Ultrastructure and evolution. **Biology of the Cell**, França, v. 63, p. 151-158, 1988.

MORISAWA, M.; SUZUKI, K.; SHIMIZU, H.; MORISAWA, S.; YASUDA, K. Effects of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. **Journal of Experimental Biology**, Washington, v. 107, p. 95-103, 1983.

NAKAGHI, L. S. O. **Estudos estruturais e ultraestruturais das gônadas do peixe híbrido tambacu**. 1996. 108 p. Tese (Doutorado Biologia Celular e Tecidual) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo.

NARAHARA, M. Y. et al. Reprodução induzida da pirapitinga-do-sul, *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819), mantida em condições de confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 31, n. 3, p. 1070-1075, 2002.

NINHAUS-SILVEIRA, A. et al. Seminal analysis, cryogenic preservation, and fertility in matrinxã fish, *Brycon cephalus* (Günther, 1869). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 49, n. 4, p. 651-659, July 2006.

OHTA, T. et al. Cortical alveolus breakdown in the eggs of the freshwater teleost *Rhodeus ocellatus ocellatus*. **The Anatomical Records**, New York, v. 227, p. 486-496, 1990.

OLIVEIRA, A. V.; VIVEIROS, A. T. M.; MARIA, A. N.; FREITAS, R. T. F.; ISAÚ, Z. A. Sucesso do resfriamento e congelamento de sêmen de pirapitinga *Brycon nattereri*. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 26, p. 1509-1515, 2007.

PARDO-CARRASCO, S. C. et al. Inducción a la maduración final y ovulación del yamú *Brycon amazonicus* con EPC y mGnRH-a. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, Medellín, v.19, p.160-166, jun. 2006.

PARDO-CARRASCO, S. C. et al. Inducción de la ovulación y del desove del yamú, *Brycon siebenthalae*, con implantes de mGnRH-a. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 28, p. 19-24, 2002.

PEARSE, A. G. E. **Histochemistry**: theoretical and applied. Churchill Livingstone, London, 1985. 1055 p.

RIEHL, R. Surface morphology and micropyle as a tool for identifying fish eggs by scanning electron microscopy. **Microscopy and Analysis**, v. 5, p. 29-31, May 1993.

RIEHL, R.; PATZNER, R. A. The modes of egg attachment in teleosts fishes. **Italian Journal Zoology**, Modena, v. 65, p. 415-420, 1998.

RIZZO, E.; BAZZOLI, N. The zona pellucida of the Brazilian white piranha, *Serrasalmus brandtii* Reinhardt, 1874 (Pisces, Characidae): a cytological and cytochemical study. **Functional and Developmental Morphology**, v.1, p.21-24, 1991.

RIZZO, E. et al. Adhesiveness and surface patterns of eggs in neotropical freshwater teleosts. **Journal of Fish Biology**, London, v. 61, n. 3, p. 615-632, 2002.

RIZZO, E. et al. Final oocyte maturation and fertilization in pacu *Piaractus mesopotamicus* (Pisces: Characidae) and curimatá *Prochilodus scrofa* (Pisces: Prochilodontidae) submitted to hypophysation. **Brazilian Journal Morphological Sciences**, v.14, p.13-18, 1997.

RIZZO, E. et al. Oocyte surface in four teleost fish species postspawning and fertilization. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 41, p. 37-48, 1998.

RIZZO, E., GODINHO, H. P. Egg surface of freshwater migratory fishes. **Acta Microscopica**, Supplement B, p.321-322, 2001.

RIZZO, E.; GODINHO, H. P. Superfície de ovos de peixes Characiformes e Siluriformes, p. 115-132. In: GODINHO, H. P.; GODINHO, A. L. (Org.). **Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais**. Belo Horizonte: PUC Minas, 2003. p. 115-132. (468 p.)

RODRÍGUEZ, M.; GARZO, G. Biopsia ovárica por canulación, método eficiente para evaluar la madurez de las hembras de *Cyprinus carpio*. **Revista Latinoamericana de Acuicultura**, México, v. 38, p. 83-90, 1986.

ROMAGOSA, E. et al. Mudanças morfológicas dos ovários de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), em condições de confinamento. **Boletim Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 20, p. 67-80, 1993.

ROMAGOSA, E. et al. Ultrastructure of the germ cells in the testis of matrinxã, *Brycon orbignyanus* (Teleostei, Characidae). **Tissue and Cell**, v.31, p.540-544, 1999.

ROMAGOSA, E. NARAHARA M. Y.; FENERICH-VERANI, N. Seleção e caracterização de fêmeas de matrinxã, *Brycon cephalus*, induzidas a reprodução. **Boletim Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 27, p. 139-147, 2001.

SATO, Y.; FENERICH-VERANI, N., GODINHO, H. P. Reprodução induzida de peixes da bacia do São Francisco, p. 275-289. In: GODINHO H. P.; GODINHO, A. L. (Org.). **Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais**. Belo Horizonte: PUC Minas, 2003a. p. 275-289.

SATO, Y.; FENERICH-VERANI, N.; NUÑER, A. P. O.; GODINHO, H. P.; VERANI, J. R. Padrões reprodutivos de peixes da bacia do São Francisco, p. 229-274. In: GODINHO H. P.; GODINHO, A. L. (Org.). **Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais**. Belo Horizonte: PUC Minas, 2003b. p. 229-274.

SATO, Y. **Reprodução de peixes da bacia do rio São Francisco: indução e caracterização de padrões**. 1999. 198 p. Tese (Doutorado Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade Federal São Carlos, São Carlos.

SCARPELLI, R. S. **Expressão de resíduos de açúcares e adesividade de ovos de três espécies de peixes da família Erythrinidae**. 2005. 29 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

SHEHADEH, Z. H.; KUO, C. M.; MILISEN, K. K. Validation of an in vivo method for monitoring ovarian development in the grey mullet (*Mugil cephalus* L.). **Journal of Fish Biology**, London, v. 5, p. 489-496, 1973.

SIMPSON, A. C. The fecundity of the plaice. **Fishery Investigation**, v.5, n.17, p.1-27, 1951.

SUQUET, M. et al. The ageing phenomenon of turbot spermatozoa: effects on morphology, motility and concentration, intracellular ATP content, fertilization, and storage capacities. **Journal Fish Biology**, London, v. 52, p. 31- 41, 1998.

TYLER, C. R.; SUMPTER, J. P. Oocyte growth and development in teleosts. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, London, v. 6, p. 287-318, 1996.

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

VERÍSSIMO-SILVEIRA, R. et al. Spermiogenesis and spermatozoa ultrastructure in *Salminus* and *Brycon*, two primitive genera in Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes). **Acta Zoologica**, v. 87, p. 305-313, 2006.

VIVEIROS A. T. M; FESSEHAYE Y; ter VELD, M.; SCHULZ R. W.; KOMEN, J. Hand-stripping of semen and semen quality after maturational hormone treatments, in African catfish *Clarias gariepinus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 213, p. 373-386, 2002.

VLAMMING, V. L. Oocyte development patterns and hormonal involvements among teleosts, p.176-199. In: RANKIN, J. C.; PITCHER, T. J.; DUGGON, R. T. (Ed.). **Control process in fish physiology**. London: Croom Helm, 1983. 248p.

WALLACE, R.A.; SELMAN, K. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. **American Zoologist**, v. 21, p. 325-343, 1981.

WEST, G. Methods of assessing ovarian development in fishes: a review. **Australian Journal of Marine and Freshwater Research**, v. 41, p. 199-222, 1990.

ZAIDEN, S. F. **Morfologia gonadal e metabolismo energético da Piraputanga *Brycon hilarii* (Cuvier e Valenciennes, 1849) (Pisces, Characidae), em cativeiro, durante o ciclo reprodutivo anual**. 2000. 152p. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

ZANIBONI-FILHO, E.; REYNALTE-TATAJE, D.; WEINGARTNER, M. Potencialidad del género *Brycon* en la piscicultura brasileña. **Revista Colombiana Ciencias Pecuarias**. Medellín, v. 19, n. 2, p. 233-240, 2006.

CAPÍTULO III

ASPECTOS ULTRA-ESTRUTURAIS DA SUPERFÍCIE DOS OVOS ASSOCIADOS AO BLOQUEIO À POLISPERMIA EM *Brycon nattereri*

1 RESUMO

Maria, A. N. Aspectos ultra-estruturais da superfície dos ovos associados ao bloqueio à polispermia em *Brycon nattereri*. In _____. **Caracterização ultra-estrutural dos gametas, aspectos da fertilização e desenvolvimento inicial de pirapitinga *Brycon nattereri* (Günther, 1864)**. 2008. 115 p. Tese (Doutorado em Produção Animal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

A pirapitinga *Brycon nattereri* (Günther, 1864) é uma das espécies brasileiras ameaçadas de extinção. A reprodução em cativeiro não ocorre naturalmente, podendo ser induzida com hormônios, como o extrato de hipófise, mas a taxa de fertilização ainda é baixa. O objetivo deste estudo foi analisar os eventos ocorridos durante os primeiros 10 minutos da fertilização dos ovócitos de pirapitinga *Brycon nattereri*, por meio da microscopia eletrônica de varredura, com ênfase na observação dos eventos responsáveis pela prevenção à polispermia e seu momento de ocorrência. A fertilização artificial foi realizada pelo método seco, misturando-se, primeiramente, os ovócitos e o sêmen (tempo = 0). Em seguida, foi adicionada água aos recipientes contendo os ovócitos e sêmen. Foram coletadas amostras com, aproximadamente, 30 ovócitos cada uma, nos seguintes tempos: 0, 10, 20 e 30 segundos, e a cada minuto, até 10 minutos após a adição de água. Todos os ovos foram fixados em solução de Karnovsky e preparados para análise sob microscópio eletrônico de varredura. Nos primeiros 20 segundos após a adição de água, foram observados vários espermatozóides na abertura da micrópila e mais de um no canal micropilar. Houve ligeira elevação da zona radiata em volta da micrópila, grande deformação da parede do canal micropilar e caudas de espermatozóides supranumerários impedidos de penetrar pelo canal entre 1 e 2 minutos após a adição da água. Esses espermatozóides supranumerários foram expelidos da micrópila pela exsudação do conteúdo dos alvéolos corticais com o

estreitamento do canal micropilar. Após a remoção da zona radiata, foi observada uma projeção a partir do citoplasma do ovo direcionada para o interior do canal micropilar denominada cone de fertilização. Entre 1 e 4 minutos após a adição de água, o evento que foi observado com maior frequência foi a presença de espermatozóides supranumerários aglutinados na micrópila. Entre 4 e 5 minutos, foram observados espermatozóides aglutinados no espaço perivitelínico. Com a hidratação dos ovos, foi observado, entre 5 e 10 minutos, o distanciamento da zona radiata em relação à membrana plasmática, aumentando, conseqüentemente, o espaço perivitelínico. Baseado neste estudo, concluiu-se que, em *B. nattereri*, existem vários fatores responsáveis pela prevenção à polispermia entre eles: formato de funil apresentado pela micrópila, restringindo o número de espermatozóides a passar de uma só vez pela micrópila; a formação de um cone de fertilização que rejeita os espermatozóides supranumerários e encaminha-os para fora do canal micropilar e a aglutinação dos espermatozóides supranumerários no canal micropilar e no espaço perivitelínico por meio da liberação do material dos alvéolos corticais.

* Comitê Orientador: Ana Tereza de Mendonça Viveiros - UFLA (Orientadora), José Camisão de Souza - UFLA e Rilke Tadeu Fonseca de Freitas - UFLA (co-orientadores)

2 ABSTRACT

Maria, Alexandre Nizio. Ultrastructural features of the eggs surface associated with the block polyspermy in *Brycon nattereri*. In _____ **Ultrastructural characterization of gametes, aspect fertilization and initial development of pirapitinga *Brycon nattereri* (Günther, 1864)**. 2008. 115 p. Ph.D. Thesis (Animal Production) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

The pirapitinga *Brycon nattereri* (Günther, 1864) is one of the Brazilian species threatened of extinction. Reproduction in captivity does not occur naturally and can be induced with hormones, such as pituitary extract, but the rate of fertilization is still low. The aim of this study was to analyze the events occurring during the first 10 minutes of the oocytes fertilization from pirapitinga *Brycon nattereri*, by scanning electron microscopy, with emphasis on observation of events responsible for the prevention polyspermy and its time of occurrence. The artificial fertilization was carried out by the dry method, mixing up the first oocytes and sperm (time = 0). Then, water was added on the containers containing the oocytes and sperm. Samples were collected with approximately 30 oocytes each, in the following times: 0, 10, 20 and 30 seconds, and every minute up to 10 minutes after addition of water. All the eggs were fixed in Karnovsky solution and prepared for analysis under the scanning electron microscope. In the first 20 seconds after the addition of water were found several sperm at the opening of the micropyle and more than one in the canal micropilar. There was a slight elevation of the zona radiata around the micropyle, large deformation of the wall micropylar canal and flagellum supernumerary spermatozoa prevented from entering in canal between 1 and 2 minutes after the addition of water. These supernumerary spermatozoa were expelled of micropyle by the exudate of the cortical alveoli content with the narrowing of the micropylar canal. After removal of the zona radiata was observed a projection from the cytoplasm of the egg directed into the canal

micropylar called fertilization cone. Between 1 and 4 minutes after the addition of water, the event that was observed more frequently was the presence of supernumerary sperm agglutinated in the micropyle. Between 4 and 5 minutes were observed agglutinated spermatozoa in perivitelline space. With the hydration of eggs, was observed after 5 minutes the distancing of the zona radiata in relation to plasma membrane, increasing thus the perivitelline space. Based on this study concluded that in *B. Nattereri* there are several factors responsible for the prevention polyspermy including: funnel-shaped presented by the micropyle, restricting the number of sperm to move at once by the micropyle, the formation of a fertilization cone, which rejects the supernumerary spermatozoa and guides to out of the canal micropylar, the supernumerary spermatozoa agglutination in canal micropylar and perivitelline space through release contents of the cortical alveoli.

* Comitê Orientador: Ana Tereza de Mendonça Viveiros - UFLA (Orientadora), José Camisão de Souza- UFLA e Rilke Tadeu Fonseca de Freitas – UFLA (co-orientadores)

3 INTRODUÇÃO

A pirapitinga *Brycon nattereri* (Günther, 1864) é uma das espécies brasileiras de peixes de água doce ameaçadas de extinção. O desmatamento, a poluição da água e o represamento dos rios são algumas das razões pelas quais o número de exemplares dessa espécie tem diminuído acentuadamente em diversas regiões (Lima et al., 2007). Como em quase todas as espécies de peixes mantidas em cativeiro, a reprodução pode ser induzida por meio de hormônios, como o extrato de hipófise, porém, a taxa de fertilização observada para essa espécie ainda é baixa. O conhecimento dos mecanismos e eventos que ocorrem durante a fertilização pode contribuir na otimização do manejo reprodutivo e no aumento da eficiência das técnicas de reprodução artificial.

O ovócito de teleósteos apresenta um canal estreito, denominado micrópila, por meio do qual o espermatozóide tem acesso à superfície da membrana plasmática do ovócito (Iwamatsu, 2000). Regra geral, o espermatozóide que entra na micrópila, primeiramente, é destinado a fundir-se com a membrana plasmática. Aqueles que o seguem permanecem dentro do canal micropilar e são expelidos durante a ativação do ovo, evitando, assim, a polispermia (Hart, 1990).

Estudos dos eventos ocorridos durante a fertilização têm sido relatados na literatura com variadas abordagens, em geral relacionados à prevenção da polispermia (Freire-Brasil et al., 2002). A morfometria da micrópila e do espermatozóide (Kobayashi & Yamamoto, 1981; 1993; Ganeco e Nakaghi, 2003), o processo de orientação do espermatozóide através da micrópila (Amanze e Iyengar, 1990; Ishijima et al., 1993; Iwamatsu et al., 1993), a fusão dos gametas com descrição de um local especializado de entrada do espermatozóide (Ohta, 1985; 1991), a penetração do espermatozóide e a formação do cone de fertilização ou de uma massa dilatada (Kudo, 1980; Ohta &

Nashirozawa, 1996; Linhart e Kudo, 1997) e os rearranjos na superfície do ovócito, conhecidos coletivamente como reação cortical (Ohta et al., 1990; Renard et al., 1990) são alguns dos enfoques dados pelos pesquisadores, no mundo, ao estudo da fertilização em peixes.

O monitoramento de eventos morfológicos em ovócitos e ou ovos de peixes por meio da microscopia eletrônica de varredura permite visualizar estruturas em imagens tridimensionais e, dessa forma, compreender os momentos da fertilização em condições controladas. A utilização dessa ferramenta no estudo da fertilização contribui para o aumento da eficiência na propagação das espécies. Assim, este estudo foi realizado com o objetivo de analisar os eventos ocorridos durante os primeiros 10 minutos da fertilização dos ovócitos de pirapitinga *Brycon nattereri* por meio da microscopia eletrônica de varredura, com ênfase na observação dos eventos responsáveis pela prevenção à polispermia e seu momento de ocorrência.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido durante o período reprodutivo, entre os meses de maio a julho de 2006. Foram utilizados três machos e três fêmeas de pirapitinga, *Brycon nattereri*, mantidos em cativeiro na Estação de Piscicultura da Companhia Energética de Minas Gerais (Cemig), em Itutinga, MG, há mais de quatro anos.

Os machos selecionados apresentavam papila urogenital hiperêmica e liberavam sêmen sob leve massagem abdominal; as fêmeas possuíam ventre abaulado e macio. Os reprodutores foram pesados, transferidos do tanque de terra para um aquário com água à temperatura de $18\pm 1^{\circ}\text{C}$ e submetidos a tratamento com extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC) para induzir a espermição e a desova. As fêmeas (366 ± 115 g de peso) receberam via

intramuscular as doses de 0,4 e 4 mg de EBHC/kg de peso corporal com intervalo de 12 horas entre as aplicações. Os machos (350 ± 50 g de peso) receberam dose única de 4 mg de EBHC/kg de peso corporal, no mesmo momento da aplicação da segunda dose nas fêmeas. Após 14 horas da última aplicação, os ovócitos e o sêmen de cada animal foram coletados separadamente. Cada macho foi utilizado para fertilizar os ovócitos de uma fêmea e a fertilização artificial foi realizada pelo método seco, misturando-se primeiramente os ovócitos e o sêmen (tempo = 0). Em seguida, foi adicionada água nos recipientes contendo ovócitos e sêmen. Foram coletadas amostras de cada fêmea com, aproximadamente, 30 ovócitos cada uma, nos seguintes tempos: 0, 10, 20 e 30 segundos, e a cada minuto até 10 minutos após a adição de água.

Todas as amostras coletadas foram fixadas em solução de Karnovsky (glutaraldeído 2,5%; paraformaldeído 2,0% em tampão cacodilato de sódio 0,05M, pH 7,2 e cloreto de cálcio 0,001M), por 48 horas, a 4°C. Após esse período, alguns ovos foram cortados transversalmente com uma lâmina para avaliar as estruturas internas, enquanto os outros ovos foram mantidos íntegros para avaliação das estruturas externas do ovo. Todos os ovos, cortados e íntegros, foram pós-fixados em tetróxido de ósmio, por 4 horas, à temperatura ambiente, lavados em tampão cacodilato 0,1M (pH 7,4), desidratados por meio de uma série crescente de acetona (25%, 50%, 75%, 90% e 100%), secos com CO₂ líquido no aparelho de ponto crítico CPD 030, cobertos com ouro sob vácuo por meio de um evaporador de ouro SCD 050 e examinados em um microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40 XVP ESC, equipado com câmera digital. As análises foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-Estrutural da UFLA.

5 RESULTADOS

Todos os reprodutores responderam à indução hormonal. Os machos produziram um volume seminal médio de $5,2\pm 0,4$ ml, contendo $45,1\times 10^9\pm 3,4\times 10^9$ espermatozóides por ml. As fêmeas liberaram, em média, 42 ± 12 gramas de ovócitos por desova. Uma taxa de eclosão dos ovos de $15\pm 5\%$ foi observada após 50-54 horas da fertilização (1.034 horas-grau).

No momento da mistura dos ovócitos com o sêmen (tempo = 0), os ovócitos de *B. nattereri* apresentaram as seguintes estruturas da camada mais externa para a mais interna: (a) zona radiata com poros-canais, (b) micrópila situada na região do pólo animal, caracterizando-se como uma depressão na zona radiata; (c) membrana plasmática apresentando filamentos finos e longos (microvilosidades) que formam densa cobertura na membrana plasmática (Figura 1); (d) alvéolos corticais alinhados em camadas, localizados no citoplasma cortical, imediatamente abaixo da membrana plasmática e (e) mais internamente, grânulos de vitelo ocupando a maior parte do ovócito. Foram observados sinais de ruptura dos alvéolos corticais, mesmo antes da penetração do espermatozóide fertilizante (tempo = 0), evidenciado pela presença de orifícios na superfície da membrana plasmática e impressões deixadas pelos alvéolos corticais na superfície do ovócito, com poucas microvilosidades em relação às áreas circunvizinhas (Figura 2).

Foi observada assincronia nos eventos morfológicos de prevenção à polispermia, em que, num mesmo tempo de observação, diferentes eventos estavam presentes em diferentes ovos.

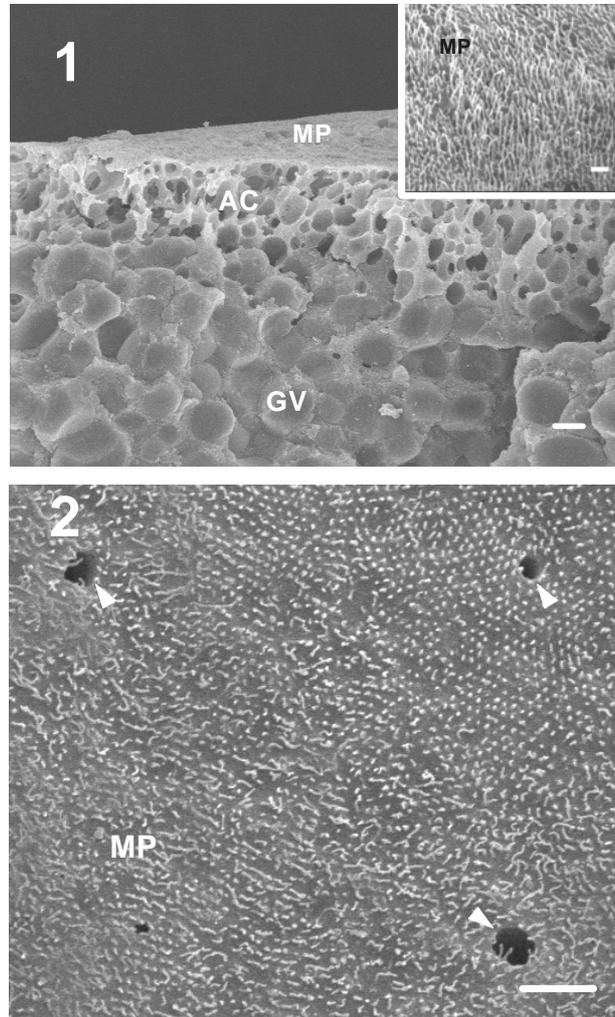
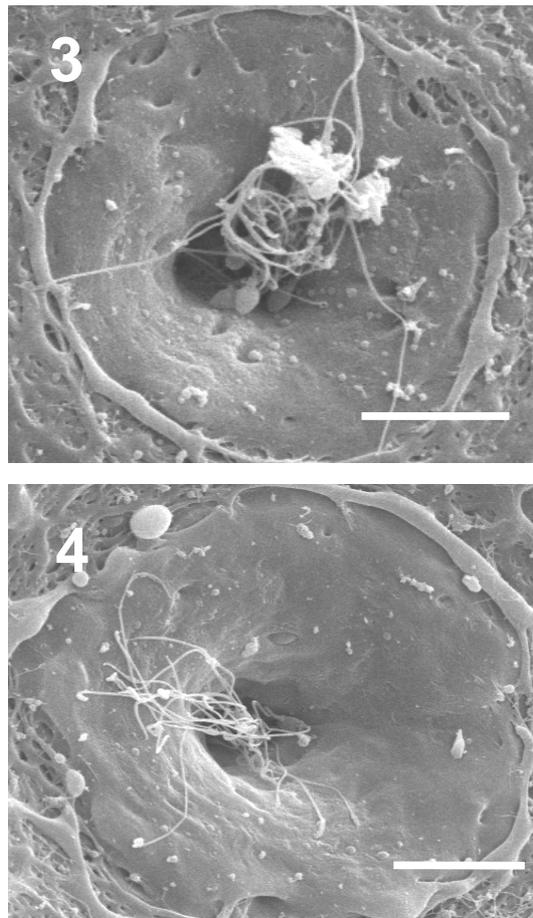


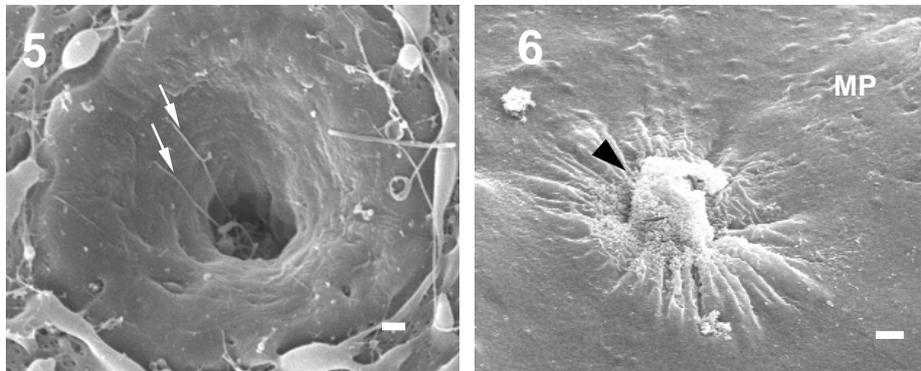
FIGURA 1-2. Eletromicrografia do ovócito após a remoção da zona radiata, no momento da mistura do sêmen com ovócito (tempo=0). (1) Corte transversal do ovócito, mostrando a membrana plasmática (MP), alvéolos corticais (AC) e glóbulos de vitelo (GV). Inserção: microvilosidades da membrana plasmática formando uma densa camada. (2) Superfície externa da membrana plasmática do ovócito evidenciando os orifícios deixados pelos alvéolos corticais (cabeça da seta), após a fusão da membrana plasmática com a membrana dos alvéolos corticais. Barras = 2 μ m, 2 μ m e 10 μ m, respectivamente.

Entre 10 e 20 segundos após a adição de água, foram observados vários espermatozóides na abertura da micrópila e mais do que um na base do vestíbulo (Figuras 3 e 4). Vinte segundos após a a adição de água foi observado no canal micropilar um enrugamento da parede (Figura 4).



FIGURAS 3-4. Região micropilar evidenciando a entrada dos espermatozóides na micrópila (3) Dez segundos após a adição de água: vários espermatozóides alcançam a micrópila ao mesmo tempo, entrando em contato com a parede do canal micropilar. (4) Vinte segundos após a adição de água: enrugamento da parede do canal micropilar indicando o início do seu fechamento (Zr = zona radiata). Barras: 10µm.

Foram observados, 1 minuto após a adição de água, uma ligeira elevação da zona radiata na região micropilar e caudas de espermatozóides supranumerários impedidos de penetrar pelo canal (Figura 5). Nesse mesmo momento, após a remoção da zona radiata, foi observada uma projeção a partir do citoplasma do ovo, direcionada para o interior do canal micropilar denominada cone de fertilização (Figura 6).



FIGURAS 5-6. (5) Um minuto após a adição de água: obstrução do canal micropilar pelo cone de fertilização, impedindo a entrada de espermatozóides supranumerários (seta). (6) Cone de fertilização (cabeça de seta), observado um minuto após a adição de água, na membrana plasmática (MP) de um ovo, após a remoção da zona radiata. Barras = 2 μm e 3 μm , respectivamente.

Dois minutos após a adição de água, foi observado o estreitamento do canal micropilar pela exsudação do conteúdo dos alvéolos corticais (Figura 7).

Entre 1 e 4 minutos após a adição de água, o evento que foi observado com grande frequência foi a presença de espermatozóides aglutinados no vestibulo micropilar (Figura 8).

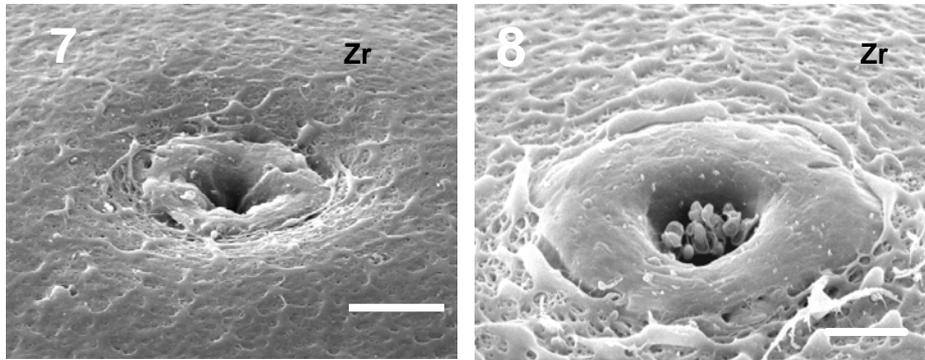
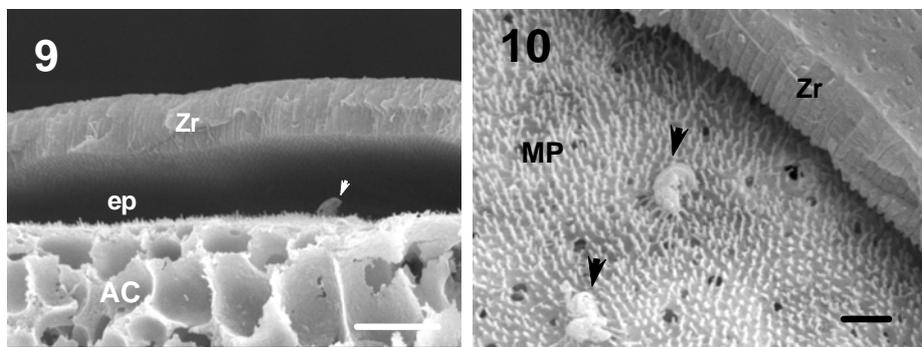


FIGURA 7-8. (7) Dois minutos após a adição de água: estreitamento do canal micropilar. (8) Quatro minutos após a adição de água: espermatozoides supranumerários aglutinados no vestibulo micropilar. (Zr = zona radiata). Barras = 10 μ m.

Entre 4 e 5 minutos após a adição de água, foram observados espermatozoides aglutinados no espaço perivitelínico (Figuras 9 e 10).



FIGURAS 9-10. Quatro minutos após a adição de água: Ovos cortados transversalmente, mostrando espermatozoides supranumerários aglutinados (seta) no espaço perivitelínico, sobre a membrana plasmática (Zr: zona radiata; ep: espaço perivitelínico; AC: alvéolos corticais e MP: membrana plasmática). Barras = 10 μ m e 3 μ m, respectivamente.

Com a hidratação dos ovos, houve um distanciamento da zona radiata em relação à membrana plasmática, aumentando, conseqüentemente, o espaço perivitelínico, o que foi observado entre 5 e 10 minutos após a adição de água.

6 DISCUSSÃO

A análise dos ovos por meio de microscopia eletrônica de varredura foi eficiente na caracterização dos eventos iniciais da fertilização.

Existem alguns mecanismos que são responsáveis pela prevenção à polispermia, como: barreira mecânica efetuada pelo diâmetro da abertura interna do canal micropilar (Freire-Brasil et al., 2002), modificações no sítio de entrada dos espermatozoides, secreção de substâncias que modificam o comportamento do espermatozoide, inibição da movimentação dos espermatozoides pelo fluido do espaço perivitelínico e obstrução do canal micropilar (Hart, 1990).

Em *B. nattereri*, o primeiro nível de prevenção à polispermia foi o formato de funil apresentado pela micrópila, restringindo, assim, o número de espermatozoides a passar de uma só vez pela micrópila. Esse mesmo mecanismo de prevenção à polispermia em peixes já foi relatado por outros autores (Freire-Brasil et al., 2002; Murata et al., 2003). A micrópila desempenha importante função no reconhecimento do gameta durante a fertilização. Sua morfologia é espécie-específica (Ginsburg, 1968; Kobayashi & Yamamoto, 1981), no entanto, na maioria dos teleósteos, a micrópila apresenta forma de funil (Iwamatsu, 2000), como foi observado no *B. natterei*. As microvilosidades, observadas na membrana plasmática dos ovócitos extruídos de *B. natterei*, também foram observadas em ovócitos vitelogênicos intra-ovarianos de outras espécies brasileiras como *Pimelodus maculatus* (Oliveira-Junior, 2002) e *Prochilodus lineatus* (Freire-Brasil et al., 2003), atravessando os poros canais da zona radiata.

Neste estudo, as primeiras observações da presença de espermatozóides na entrada da micrópila foram realizadas entre 10 e 20 segundos após a adição da água, semelhantemente ao observado em outros briconíneos como *B. orbignyana* (Ganeco, 2003) e *Brycon* sp. (Neumann et al., 2007). Dos espermatozóides que chegaram à micrópila, vários penetraram no seu canal, reforçando a necessidade do desenvolvimento de estratégias para evitar a polispermia. Um dos fatores que podem explicar a chegada rápida e em grande quantidade de espermatozóides ao canal micropilar é a elevada concentração espermática utilizada na fertilização ($4,2 \times 10^8$ espermatozóides/mL). Em um estudo realizado com *O. latipes*, foi revelado que o tempo médio de entrada do espermatozóide dentro da micrópila aumenta quando a concentração espermática é baixa (Iwamatsu et al., 1991). Segundo esses autores, os ovos expostos à alta concentração espermática (2×10^8 espermatozóides/mL) permitiram a entrada de vários espermatozóides na micrópila em apenas 6 segundos, alinhando-se ao longo do canal micropilar.

O início da reação cortical em *B. nattereri* foi semelhante ao observado em outras espécies de peixes. Em *P. lineatus* (Freire-Brasil et al., 2003), a reação cortical foi iniciada momentos antes da ovulação e, em *O. latipes* (Dettlaff, 1988), após a ruptura da vesícula germinativa, provavelmente na metáfase I. Os alvéolos corticais dos ovos de *B. nattereri* rompidos antes da penetração do espermatozóide fertilizante sugerem que, nesse período, o conteúdo dos alvéolos já estava sendo depositado entre a zona radiata e a membrana plasmática, formando o espaço perivitelínico.

A entrada dos espermatozóides fertilizante e supranumerários acontecem rapidamente e isso exige que o ovócito possua uma condição mínima inicial para evitar a polispermia. A reação cortical circunda quase todo o ovo, à exceção da região próxima à micrópila, local onde fica o sítio de entrada do espermatozóide, visando retardar o início da formação do espaço perivitelínico e, assim,

favorecer a entrada e a incorporação do espermatozóide fertilizante (Ohta, 1985; Hart, 1990; Freire-Brasil et al., 2002). Alguns autores afirmam que a reação cortical é primeira resposta visível do ovócito à fusão com o espermatozóide (Selman, 1989; Hart, 1990), enquanto outros acreditam que esta reação começa quando o ovócito entra em contato com a água, independentemente de ter ocorrido fertilização (Kudo, 1982; Billard, 1988; Renard et al., 1990).

Os ovos de *B. natterrei* apresentaram uma diminuição no diâmetro do canal micropilar por meio do aumento da rugosidade da parede do canal micropilar, causando sua deformação 20 segundos após a adição de água. Segundo Kobayashi e Yamamoto (1993), o aumento na rugosidade do canal micropilar é induzido por ações sinérgicas de dois fatores: pressão de turgor perivitelínico e material perivitelínico.

Os ovos de *B. natterrei* respondem à penetração do espermatozóide fertilizante com a formação de um cone de fertilização no local de entrada do espermatozóide na superfície do ovo. No entanto, estudos mais específicos sobre a formação do cone durante a fertilização em *B. nattereri*, são necessários. A presença do cone foi observada em poucos ovos, possivelmente por danos mecânicos causados no momento da remoção da zona radiata. Segundo Murata et al. (2003), o cone de fertilização é um crescimento exagerado e ou pequena projeção a partir do citoplasma do ovo para dentro do canal micropilar, impedindo que os espermatozóides supranumerários penetrem no citoplasma.

Em *B. natterrei*, o estreitamento da micrópila, obstruindo a entrada de espermatozóides supranumerários, foi realizado por meio da deposição de uma massa viscosa no vestíbulo micropilar originado pelo exsudado liberado pelos alvéolos corticais. A obstrução do canal micropilar pode ser realizada pela expansão do cone de fertilização e/ou pela deposição de substância coloidal no vestíbulo micropilar. Em *B. orbignyana* (Ganeco, 2003) e *P. lineatus* (Freire-Brasil et al., 2002), a obstrução da micrópila foi realizada pela expansão do cone

de fertilização, apresentando-se na parte externa do canal micropilar sob forma esférica. Em *Fundulus heteroclitus*, a obstrução da micrópila após a fertilização ocorreu por meio de uma massa viscosa exsudada pelo ovo (Brummett & Dumont, 1979). Já em *Oreochromis niloticus* e *O. aureus*, a obstrução da micrópila foi realizada por uma massa amorfa (Bern & Avtaliom, 1990). Iwamatsu (2000) relatou que esta estrutura é formada por fluido perivitelínico expelido através do canal micropilar, formando uma bolha.

Apesar da presença de todos os mecanismos de prevenção à polispermia, vários espermatozóides estavam presentes no canal micropilar e no espaço perivitelínico dos ovos de *B. nattereri*. Em *Salmo trutta* (Ginsburg, 1961), *C. carpio* (Kudo, 1980) e em *P. lineatus* (Freire-Brasil, 2002), a passagem de mais de um espermatozóide pelo canal micropilar, com aglutinação no espaço perivitelínico dos espermatozóides supranumerários, também foi observada. Estudos revelaram que a remoção do fluido perivitelínico resulta na polispermia devido à não aglutinação dos espermatozóides supranumerários (Ginsburg, 1961). Os alvéolos corticais liberam vários componentes no espaço perivitelínico (Kalthoff, 2000), principalmente lectinas (Krajhanzl, 1990). Lectinas são proteínas ou glicoproteínas naturais (Nosek et al., 1984; Kilpatrick, 2002) e apresentam sítios de ligações com açúcares específicos de polissacarídeos ou com glicoproteínas e glicolipídios (Lis & Sharon, 1998; Rhodes & Milton, 1998).

Com base neste estudo concluiu-se que, em *B. nattereri*, existem vários fatores responsáveis pela prevenção à polispermia, entre eles: a barreira efetuada pelo diâmetro interno do canal micropilar; a formação de um cone de fertilização que rejeita os espermatozóides supranumerários e encaminha-os para fora do canal micropilar e a aglutinação dos espermatozóides supranumerários no canal micropilar e no espaço perivitelínico por meio da liberação do material dos alvéolos corticais.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMANZE, D.; IYENGAR, A. The micropyle: a sperm guidance system in teleost fertilization. **Development**, v. 109, n. 2, p. 495-500, Jun. 1990.
- BERN, O; AVTALION, R. R. Some morphological aspects of fertilization in tilápias. **Journal of Fish Biology**, London, v. 36, n. 3, p. 375-381, Mar.1990.
- BILLARD R. Artificial insemination and gamete management in fish. **Marine Behavior & Physiology**, v.14, p. 3-21, 1988.
- BRUMMETT, A. R.; DUMONT, J. N. Initial stages of sperm penetration into the egg of *Fundulus heteroclitus*. **The Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 210, p. 417-434, 1979.
- DETTLAFF, T. A. Changes in oocyte structure and properties during maturation period in teleost. In: DETTLAFF, T. A., VASSETZKY, S. G. (Eds.). **Oocyte Growth and Maturation** (Trad. Billett F.) Consultants Bureau, New York 1988. 423 p.
- FREIRE-BRASIL, D. et al. Análise morfológica da maturação final do ovócito em curimatá (*Prochilodus lineatus*, Valenciennes, 1836). In: CONGRESSO IBEROAMERICANO VIRTUAL DE ACUICULTURA, 2., 2003, Zaragoza. **Anais...** Zaragoza: CIVA, 2003. Disponível em: <<http://www.civa2003.org>>. Acesso em: 20 nov. 2007.
- FREIRE-BRASIL, D. et al. Estudo morfológico dos primeiros momentos da fertilização em curimatá *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836). In: CONGRESSO IBEROAMERICANO VIRTUAL DE ACUICULTURA, 2., 2002, Zaragoza. **Anais...** Zaragoza: CIVA, 2003. Disponível em: <<http://www.civa2002.org>>. Acesso em: 20 nov. 2007.
- GANECO, L. N. **Análise dos ovos de Piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849), durante a fertilização e o desenvolvimento embrionário, sob condições de reprodução induzida.** 2003. 66p. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.
- GANECO, L. N.; NAKAGHI, L. S. O. Morfologia da micrópila e da superfície dos ovócitos de piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Osteichthyes, Characidae), sob microscopia eletrônica de varredura. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 25, n. 1, p. 227-231. 2003.

GINSBURG, A. S. The block to polyspermy in sturgeon and trout with special reference to the role of cortical granules (alveoli). **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, v. 9, p.173–190, 1961.

GINSBURG, A. S. **Fertilization in Fishes and the Problem of Polyspermy**. Moscow:Nauka (in Russian). GRAHAM, L. K., HAMILTON, E. J., RUSSELL, T. R.; HICKS, C. E. The culture of paddlefish: a review of methods. American Fisheries Society, Special Publication, v. 7, p. 74-78, 1968.

HART, N. H.; YU, S. F. Cortical granule exocytosis and cell surface reorganization in eggs of *Brachydanio*. **The Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 213, p. 137-59, 1980.

ISHIJIMA S.; HAMAGUCHI, Y.; IWAMATSU, T. Sperm behavior in the micropyle of the medaka egg. **Zoological Science**, v. 10, p. 179-82, 1993.

IWAMATSU, T. Fertilization in fish. In: TARIN, J. J.; CANO, A. (Eds.). **Fertilization in protozoa and metazoan animals**. Berlin: Springer-Verlag, 2000. p. 89-145.

IWAMATSU, T.; ISHIJIMA, S.; NAKASHIMA, S. Movement of spermatozoa and changes in micropyles during fertilization in medaka eggs. **The Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 266, p. 57-64, 1993.

IWAMATSU, T.; ONITAKE, K.; YOSHIMOTO, Y.; HIRAMOTO, Y. Time Sequence of Early Events in Fertilization in the Medaka Egg. **Development Growth and Differentiation**, v. 33, n. 5, p. 479-490, 1991.

KALTHOFF, K. **Analysis of Biological Development**, second ed. New York: McGraw-Hill, p. 91-94, 2000.

KILPATRICK, D. C. Animal lectin: a historical introduction and overview. **Biochemistry Biophysical Acta**, v. 1572, p. 187-197, 2002.

KOBAYASHI, W.; YAMAMOTO, T.S. Fine structure of the micropylar apparatus of the chum salmon egg, with a discussion of the mechanism for blocking polyspermy. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 217, p. 265-75, 1981.

KOBAYASHI W, YAMAMOTO TS. Factors inducing closure of the micropylar canal in the chum salmon egg. **Journal of Fish Biology**, London, v. 42, p. 385-94, 1993.

KRAJHANZL, K. Egg lectins of invertebrates and lower vertebrates: properties and biological function. **Advances in Lectin Research**, v. 3, p. 83-131, 1990.

KUDO, S. Ultrastructure and ultracytochemistry of fertilization envelope formation in the carp egg. **Development Growth and Differentiation**, v. 24, p. 237-339, 1982.

KUDO, S. Sperm penetration and the formation of a fertilization cone in the common carp egg. **Development Growth and Differentiation**, v. 22, p. 403-14, 1980.

LIMA, F. C. T.; ALBRECHT, M. P.; PAVANELLI, C. S.; VONO, V. Threatened fishes of the world: *Brycon nattereri* Günther, 1864 (Characidae). **Environmental Biology of Fishes**, Netherlands, v.1, p.1-2, Dec. 2007.

LINHART, O; KUDO, S. Surface ultrastructure of paddlefish eggs before and after fertilization. **Journal of Fish Biology**, London, v. 51, p. 573-82, 1997.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 2, p. 637-674, 1998.

MURATA, K. Blocks to Polyspermy in Fish: A Brief Review. In: SYMPOSIUM ON AQUACULTURE AND PATHOBIOLOGY OF CRUSTACEAN AND OTHER SPECIES, 32., 2003, Santa Barbara. **Anais...** Santa Barbara: UJNR Aquaculture Panel Proceedings, 2003.

NEUMAN, E.; MENDES, J. M. R.; NAKAGHI, L. S. O. Momentos da fertilização induzida em jatuarana *Brycon* sp. (teleostei, characidae) em microscopia eletrônica de varredura. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PRODUÇÃO DE PEIXES NATIVOS, 1., 2007, Dourados. **Anais...** Dourados: EMBRAPA, 2007.

NOSEK, J.; KRAJHANZL, A.; KOCOUREK, J. Binding of the cortical granule lectin to the jelly envelope in mature perch ova. **Histochemical Journal**, v. 16, p. 429-431, 1984.

OHTA, T. Electron microscopic observations on sperm entry into eggs of the bitterling during cross-fertilization. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 233, p. 291-300, 1985.

OHTA T. Initial stages of sperm-egg fusion in the freshwater teleost, *Rodheus ocellatus ocellatus*. **The Anatomical Record**, v. 229, p. 195-202, 1991.

OHTA T, IWAMATSU T, TANAKA M, YOSHIMOTO Y. Cortical alveolus breakdown in the eggs of the freshwater teleost *Rhoddeus ocellatus ocellatus*. **The Anatomical Record**, v.227, p.486-96, 1990.

OHTA T, NASHIROZAWA C. Sperm penetration and transformation of sperm entry site in eggs of the freshwater teleost *Rhoddeus ocellatus ocellatus*. **Journal of Morphology**, v. 229, p. 191-200, 1996.

OLIVEIRA JUNIOR, L. R. **Análise comparativa da reprodução do mandi-Amarelo, *Pimelodus maculatus* Lacèpède, 1803 (Pisces, Pimelodidae), em dois trechos do rio São Francisco, MG.** 2002. 43p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

RENARD, P. et al. Biochemical and morphological changes in the chorion of the carp (*Cyprinus carpio*) oocyte, following the cortical reaction. **Journal Applied Ichthyology**, v.6, p.81-90, 1990.

RHODES, J. M; MILTON, J. D. **Lectin methods and protocols**. New Jersey: Humana Press, 1998, 616 p.

SELMAN K, WALLACE RA. Cellular aspects of oocyte growth in teleosts. **Zoological Science**, v.6, p.211-231, 1989.

CAPÍTULO IV

DESENVOLVIMENTO INICIAL E CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS DE *Brycon nattereri*

1 RESUMO

Maria, A. N. Desenvolvimento inicial e características morfométricas de *Brycon nattereri*. In _____ **Caracterização ultra-estrutural dos gametas, aspectos da fertilização e desenvolvimento inicial de pirapitinga *Brycon nattereri* (Günther, 1864)**. 2008. 115 p. Tese (Doutorado em Produção Animal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de estudar o desenvolvimento embrionário e o crescimento inicial das larvas, além de avaliar as características morfométricas corporais e o estágio de desenvolvimento gonadal de juvenis de *B. nattereri*, após 14 meses de criação em cativeiro. Os embriões, as larvas e os juvenis foram obtidos por meio de reprodução induzida, a partir de exemplares adultos mantidos em confinamento há mais de quatro anos. A duração da embriogênese foi de 50-54 horas, na temperatura de 19°C. As larvas recém-eclodidas são pouco desenvolvidas, totalmente despigmentadas, desprovidas de boca e capacidade natatória, apresentando 6,32 mm de comprimento total e saco vitelínico com volume de 3,64 mm³. A abertura da boca ocorreu entre o 3º e o 4º dia após a eclosão e a reabsorção total do saco vitelínico após 10 dias da eclosão, coincidindo com o início da alimentação exógena. Entre a eclosão e o 10º dia após a eclosão, houve uma redução na taxa de crescimento das larvas. Após esse período (10º ao 15º dia), houve um aumento na taxa de crescimento, coincidindo com o início da alimentação exógena. A reabsorção do vitelo foi lenta nos três primeiros dias, aumentando acentuadamente após esse período, sendo concluída no 11º dia. Durante os 15 dias de avaliação das larvas, não foi observado canibalismo. Os juvenis de *B. nattereri* apresentam-se mais arredondados na região próxima a cabeça, tornando-se mais comprimidos lateralmente na parte posterior do corpo. O comprimento padrão e a altura do corpo medida à frente da inserção do 1º raio da nadadeira dorsal foram as medidas que apresentaram maior coeficiente de correlação com o peso corporal, sendo boa alternativa para

avaliar o peso em condições de campo quando balanças de precisão não estão disponíveis. A proporção sexual observada foi de 1:1. A maioria dos machos com 14 meses de idade apresentou testículos em maturação. As fêmeas, por outro lado, apresentavam óvários imaturos. O *B. nattereri* apresentou desenvolvimento inicial prolongado, comparado a outros Characídeos. O formato do corpo dos juvenis se assemelha a outras espécies do gênero *Brycon* de grande importância econômica, sendo esta uma característica relacionada com o rendimento no processamento.

* Comitê Orientador: Ana Tereza de Mendonça Viveiros - UFLA (Orientadora), José Camisão de Souza - UFLA e Rilke Tadeu Fonseca de Freitas - UFLA (co-orientadores)

2 ABSTRACT

Maria, Alexandre Nizio. Initial development and morphometrics characteristics of *Brycon nattereri*. In _____ **Ultrastructural characterization of gametes, aspect fertilization and initial development of pirapitinga *Brycon nattereri* (Günther, 1864)**. 2008. 115 p. Ph.D. Thesis (Animal Production) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

This paper examines the initial embryonic development and growth of larvae, in addition to evaluating the characteristics body morphometrics and stage gonadal development of *B. Nattereri* juveniles after 14 months of creation in captivity. The embryos, larvae and juveniles were obtained by means of reproduction induced, from adult specimens kept in confinement for more than four years. The duration of embryogenesis was 50-54 hours in the temperature of 19°C. The larvae newly hatched are poorly developed, fully depigmented, devoid of mouth and swimming ability, presenting 6.32 mm in total length and yolk-sac with volume of 3.64 mm³. The opening of the mouth occurred between the 3 th and 4 th day after the hatching and the total reabsorption of yolk after 10 days of the hatching coinciding with the start of exogenous feeding. Among the hatching and the 10 th day after the hatching there has been a reduction in the rate of growth of the larvae. After that period (10 th at 15 th) there was an increase in growth rate, coinciding with the start of the feeding exogenous. The reabsorption of the yolk was slow in the first three days, increasing abruptly after that period, and completed in the 11 th day. During the 15 days of evaluation of larvae was not observed cannibalism. The juveniles *B. Nattereri* presents itself more rounded in the region near the head becoming more laterally compressed in the back of the body. The measures, standard length and height of the body ahead of insertion of the 1 st radius of the dorsal fin were those who had higher coefficient of correlation with body weight, and good alternative to assess the weight at field conditions when balance of accuracy are not available.

The sexual ratio observed was 1:1. Most of the males at 14 months of age presented testes in maturation. Females, on the other hand, present immature ovaries. The *B. Nattereri* presented initial development prolonged when compared to other Characid. The format of the body of juveniles is similar to other species of the genus *Brycon* of great economic importance, and this is a characteristic related to the processing yield.

* Comitê Orientador: Ana Tereza de Mendonça Viveiros - UFLA (Orientadora), José Camisão de Souza- UFLA e Rilke Tadeu Fonseca de Freitas – UFLA (co-orientadores)

3 INTRODUÇÃO

O gênero *Brycon* está bem difundido na América do Sul e Central, com representantes nas principais bacias hidrográficas brasileiras. Este gênero se destaca dentro da ordem dos Characiformes pela presença de algumas espécies com elevado potencial zootécnico como a matrinxã (*B. amazonicus*), a piracanjuba (*B. orbignyanus*), a piabanha (*B. insignis*) e a piraputanga (*B. hilarii*) (Lima, 2003). Quanto a pirapitinga (*B. nattereri*), assim como muitas espécies nativas, não se têm muitas informações científicas a respeito de suas características reprodutivas e de desenvolvimento.

A pirapitinga, quando adulta, atinge de 40 a 50 cm de comprimento total (CEMIG/CETEC, 2000). Estudos e tentativas de reprodução em cativeiro têm relatado que a maturação de suas gônadas ocorre entre os meses de maio e agosto (Capítulo II desta tese). Essa espécie vem sofrendo grande ameaça em seu ambiente natural devido a fatores como o desmatamento, a poluição e o represamento das águas (Lima et al., 2007). Esses fatores levaram a pirapitinga a entrar na lista nacional das espécies ameaçadas de extinção.

O desenvolvimento da piscicultura com espécies nativas é de grande interesse para a conservação da biodiversidade e para o desenvolvimento da piscicultura nacional. Do ponto de vista comercial, a pirapitinga se apresenta bastante promissora, visto que, além de apresentar características favoráveis ao cultivo e à pesca esportiva, também permitirá a produção de peixes nos meses de temperaturas baixas, diferente dos peixes de piracema. Assim, a produção comercial ocuparia as instalações e o pessoal da piscicultura que normalmente estariam ociosos ou apenas em atividade de manutenção durante os meses mais frios.

O conhecimento do desenvolvimento embrionário e larval dessa espécie é importante não apenas em estudos taxonômicos mas tem aplicação prática na

aqüicultura, especialmente na determinação do momento da reabsorção do saco vitelínico e da abertura da boca, indicadores da necessidade de alimentação exógena. Algumas espécies de peixes brasileiros têm sido objeto de estudo em embriogênese e desenvolvimento larval (Andrade-Talmelli et al., 2001; Romagosa et al., 2001; Borçato et al., 2004; Reynalte-Tataje et al., 2004; Clavijo-Ayala et al., 2006). Esses estudos são uma ferramenta fundamental nos sistemas de produção de juvenis para cultivo, pois fornecem informações definitivas nos processos de incubação, larvicultura e produção de juvenis.

Existem alguns estudos que são importantes para o conhecimento do potencial de uma espécie para criação comercial. Entre eles, está o estudo da forma do corpo dos animais a partir das medidas morfométricas, obtidas em diferentes regiões do corpo, as quais influenciam diretamente o rendimento do filé (Bosworth et al., 1998; Cibert, 1999). A caracterização da carcaça por meio das medidas morfométricas pode ser um procedimento muito importante para se estimar os pesos e os rendimentos corporais de diferentes partes do corpo, sem a necessidade de abater o peixe. Alterações nos valores ou a proporcionalidade entre as medidas morfométricas podem, indiretamente, influenciar as características de carcaça. Tais medidas poderão ser utilizadas como critério de seleção ou, mesmo, para a avaliação e o acompanhamento do crescimento dos peixes nas diferentes fases do ciclo de vida (Diodatti, 2006).

O estudo das relações entre o peso do animal e o formato do corpo, além de proporcionar um maior interesse econômico pela espécie, incentivando sua criação comercial e preservação, gera informações essenciais na determinação do peso ideal de abate, na caracterização do produto final, no estabelecimento de medidas necessárias para a classificação de carcaça e na determinação de critérios para a seleção em programas de melhoramento genético (Freato, 2005).

Este trabalho foi realizado com o objetivo de estudar o desenvolvimento embrionário e o crescimento inicial das larvas, além de avaliar as características

morfométricas corporais e o estágio de desenvolvimento gonadal de juvenis da pirapitinga *Brycon nattereri*, após 14 meses de criação em cativeiro.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Reprodução induzida

Os experimentos foram conduzidos na Estação de Piscicultura da Companhia Energética de Minas Gerais (Cemig), em Itutinga, durante o período reprodutivo, nos meses de junho e julho de 2006. Foram estudados embriões, larvas e alevinos de pirapitinga *Brycon nattereri*, obtidos por meio de reprodução induzida, a partir de exemplares adultos mantidos em confinamento há mais de quatro anos.

Os reprodutores foram capturados com rede de arrasto, em tanque de terra, sendo selecionadas as fêmeas que apresentavam abdômen arredondado e papila urogenital avermelhada e os machos que liberavam sêmen sob leve pressão da papila urogenital. Os machos ($n = 16$) e as fêmeas ($n = 19$) selecionados foram transferidos do tanque de terra para um aquário, 48 horas antes da indução hormonal. A temperatura média da água do aquário foi de $18 \pm 1^\circ\text{C}$ e o teor de oxigênio variou entre 7 e 8 mg/L.

Para a reprodução induzida, cada fêmea recebeu duas injeções intramusculares de extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC), na doses de 0,4 mg/kg e 4,0 mg/kg de peso corporal, com intervalo de 12 horas entre as aplicações. Nos machos, a dosagem utilizada foi de 4 mg de EBHC/kg de peso corporal, aplicada no mesmo momento da segunda dose nas fêmeas.

A coleta do sêmen e dos ovócitos ocorreu após um período de 292 ± 39 horas-grau (entre 14 e 18 horas). O sêmen foi coletado em tubos de ensaio de vidro e os ovócitos em béqueres secos, para posterior fertilização. Após a coleta dos gametas, houve a mistura do sêmen com os ovócitos e, em seguida, foi

adicionada água para efetuar a fertilização. Os ovos recém-fertilizados foram transferidos para incubadoras do tipo funil, com capacidade de 200 litros, sendo a vazão da água controlada e a temperatura de $19\pm 0,6^{\circ}\text{C}$.

4.2 Estudo do desenvolvimento embrionário e larval

Para o acompanhamento das diferentes fases do desenvolvimento embrionário, 40-50 embriões foram coletados em intervalos de 15 minutos, nas primeiras 3 horas e depois a cada 3 horas até o momento da eclosão. Após a coleta, os embriões foram imediatamente fixados em formaldeído a 4%, tamponado com carbonato de cálcio. Para análise “in toto”, foram separados 20 embriões pré-fixados por estágio, dos quais foi retirado o córion com o auxílio de pinça de relojoeiro e agulha. Estes embriões foram corados com hematoxilina-eosina e analisados.

Após a eclosão, as larvas foram transferidas para caixas plásticas com formato retangular com capacidade para 30 litros de água. Todas as caixas possuíam fornecimento e fluxo de água com renovação constante, à temperatura de $18\pm 1^{\circ}\text{C}$. Para o acompanhamento do desenvolvimento, foram coletadas cinco larvas desde a eclosão (dia 0) até o 15º dia de vida. As larvas foram alimentadas com artêmia salina recémeclodida, após a observação da abertura da boca e a ingestão dos náuplios de artêmia. As larvas e o saco vitelínico (comprimento e altura) foram medidos por meio de microscópio estereoscópio (Zeiss Stereo Discovery v8), com auxílio de uma ocular dotada de uma régua micrométrica. O volume do saco vitelino das larvas ($n=5$ larvas) foi determinado diariamente, de acordo com a equação proposta por Blaxter e Hempel (1963): $VSV = (\pi / 6) L * H^2$, em que: VSV = volume do saco vitelino (mm^3); $\pi = 3.1415$; L = comprimento do saco vitelino (mm) e H = altura do saco vitelino (mm).

Para avaliação da taxa de crescimento específico (TCE), cinco larvas foram medidas nos dias 0, 3, 6, 10, 13 e 15 após a eclosão e a taxa determinada

através da seguinte relação: $TCE = (\ln(L_t) - \ln(L_0))/t \times 100$, onde: L_t é o comprimento final médio (mm), L_0 é o comprimento inicial médio e t é o período de crescimento (dias) (Puvanendran & Brown, 1999).

4.3 Análise morfométrica

Todas as larvas obtidas na reprodução induzida foram transferidas para tanques de terra adubados após 20 dias de criação em laboratório. Os peixes foram alimentados com ração comercial, com quantidade de proteína bruta (PB) específica para a fase de crescimento durante o ano (farelada com 36% PB para alevinos e extrusada com 32% para crescimento).

Os peixes ($n=66$) foram avaliados, com 14 meses de idade, no mês de agosto de 2007, sendo tomadas as seguintes medidas métricas (cm) (Figura 1):

- comprimento da cabeça (CC), compreendido entre a extremidade anterior da cabeça e o bordo caudal do opérculo;
- comprimento padrão (CP), compreendido entre a extremidade anterior da cabeça e o menor perímetro do pedúnculo (inserção da nadadeira caudal);
- alturas do corpo medidas à frente do 1º raio das nadadeiras peitoral (AC1), dorsal (AC2) e na menor circunferência do pedúnculo (AC3);
- larguras do corpo tomadas na região do 1º raio das nadadeiras peitoral (LC1), dorsal (LC2) e na menor circunferência do pedúnculo (LC3).

O comprimento padrão (CP) foi medido por meio de um ictiômetro e as demais medidas foram realizadas com auxílio de paquímetro digital graduado em milímetros (mm). Os pesos foram medidos com auxílio de uma balança digital com capacidade máxima de 500 gramas e 0,1 grama de precisão.

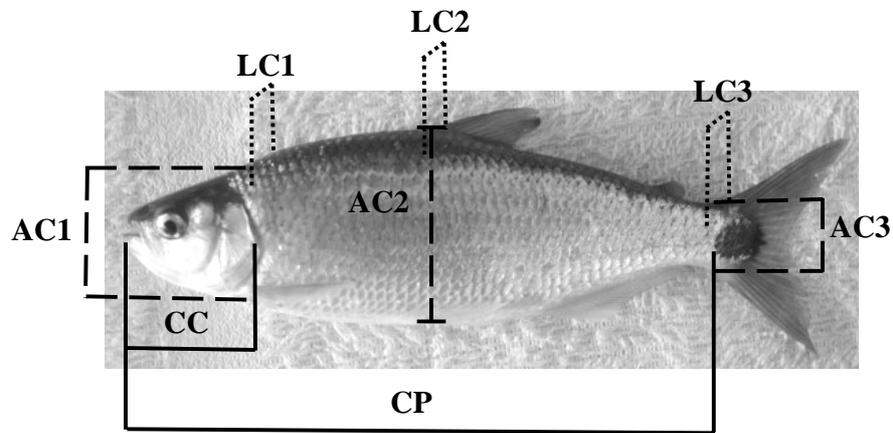


FIGURA 1. Medidas morfológicas dos peixes (*Brycon nattereri*)

Para a comparação entre as medidas morfológicas tomadas em diferentes pontos do corpo das pirapitinga, foram determinadas as seguintes regiões:

- região 1: região compreendida na circunferência onde ocorre a inserção do primeiro raio da nadadeira peitoral (cranial);
- região 2: região compreendida abaixo da inserção do primeiro raio da nadadeira dorsal (medial);
- região 3: região compreendida na menor circunferência do pedúnculo caudal (caudal).

Como complemento, foram calculadas as seguintes razões morfológicas:

- CC / CP = comprimento da cabeça/comprimento padrão;
- AC_i / CP = altura do corpo na região i /comprimento padrão;
- LC_i / CP = largura do corpo na região i /comprimento padrão;
- AC_i / LC_i = altura do corpo/largura do corpo na região i ;

4.4 Avaliação do estágio de desenvolvimento gonadal e proporção sexual

Os exemplares ($n = 22$) utilizados nessa avaliação foram anestesiados com benzocaína (etil-aminobenzoato; 60 mg/litro de água) e, posteriormente, sacrificados por meio de uma secção na medula espinhal. As gônadas retiradas foram fixadas em Bouin por 12 horas, incluídas em parafina, seccionadas de 3-5 μm e coradas com hematoxilina-eosina. As lâminas foram observadas em microscópio de luz (Nikon Eclipse 2000) e as estruturas registradas por meio de uma câmara Nikon E50.

4.5 Análise estatística

Para elucidar a estrutura de relações entre as variáveis estudadas, foram calculadas as correlações de Pearson entre medidas morfométricas e razões morfométricas. As medidas de altura (A) e largura (L) e as razões morfométricas entre estas (A:L) nas diferentes regiões corporais foram submetidas à análise de variância utilizando-se o procedimento ANOVAG, do pacote computacional SAEG. O modelo estatístico incluía como fonte de variação a região do corpo e, como co-variável, o peso do peixe no momento da avaliação. As médias foram comparadas pelo teste SNK, a 5% de probabilidade.

Para avaliar a importância das variáveis estudadas, adotou-se um modelo de regressão linear múltipla. Para a escolha do modelo, optou-se pelo procedimento de seleção de equações ajustadas denominado “backward”, selecionando-se as variáveis morfométricas que melhor descrevem os pesos. Foi utilizado, para isso, o procedimento REGRELIN, do pacote computacional SAEG, adotando como 95% a probabilidade de as variáveis deixarem o modelo.

5 RESULTADOS

5.1 Embriogênese

O período do desenvolvimento embrionário do *B. nattereri*, desde o momento da fertilização até a eclosão das larvas, foi de 50-54 horas, a 19°C, correspondendo a 1.034 horas-grau. Após a fecundação, os seguintes estágios do desenvolvimento embrionário foram estabelecidos: zigoto, clivagem, gástrula, segmentação, larval e eclosão (Tabela 1). Observou-se que há heterogeneidade no desenvolvimento dos embriões, ou seja, em um mesmo momento, foram encontrados embriões em diferentes fases da embriogênese.

Após 1,75 hora da fertilização, foi observada a migração citoplasmática com a individualização do pólo animal e formação do zigoto sobre o vitelo. A seguir, iniciou-se o estágio de clivagem, ocorrendo uma sucessão de divisões mitóticas sem o aumento de conteúdo citoplasmático e finalizando com o início do movimento de epibolia. O estágio de gástrula é demarcado pelo início do movimento de epibolia, evento no qual ocorre a migração dos blastômeros no sentido oposto ao pólo animal, para que, ao final deste movimento, haja o completo envolvimento do vitelo pelo blastoderme. O movimento de epibolia recoberto aproximadamente 50% do vitelo foi observado a partir de 21 horas após a fertilização. Após duas horas, os embriões apresentavam 90% do vitelo recoberto. O final do movimento morfogenético de epibolia ocorre com o fechamento do blastóporo, às 26 horas de embriogênese e marca o final do estágio de gastrulação. O estágio de segmentação (29 horas) foi caracterizado pelo início da formação de órgãos como vesícula óptica, notocorda, somitos, intestino posterior, prosencéfalo, mesencéfalo e telencéfalo, com conseqüente crescimento e alongamento do embrião. Neste estágio, o embrião ainda apresenta cauda presa.

O estágio larval (41 horas) é caracterizado por cauda livre, presença da vesícula óptica e ótica, e aumento do número de pares de somitos com o embrião já apresentando a forma da larva ao eclodir. A notocorda se estende desde a região cefálica até a cauda. Outra característica deste estágio foi a ocorrência de movimentos espasmódicos feitos pelos embriões, que foram aumentando com o decorrer do desenvolvimento embrionário. No período da eclosão, as larvas já demonstravam movimentos bem vigorosos de natação, importantes para o rompimento do córion. A eclosão das larvas se iniciou 50 horas após a fertilização e, 4 horas depois, foi possível observar 100% das larvas eclodidas.

TABELA 1. Desenvolvimento embrionário de *Brycon nattereri*

Hora	Estágio	Observações
0-1,75	Zigoto	Formação do zigoto, pólo animal sem segmentação
15	Clivagem	Formação da mórula
21	Gástrula	50% de epibolia
23	Gástrula	90% de epibolia
26	Gástrula	Fechamento do blastóporo
29	Segmentação	Formação dos somitos, da notocorda da vesícula óptica, tubo neural, cauda presa
41	Larval	Cauda livre, presença da vesícula óptica, aumento do número de pares de somitos
47	Larval	Presença da vesícula óptica e ótica, embrião já apresentando a forma de larva ao eclodir, ocorrência de movimentos espasmódicos feitos pelos embriões
50-54	Eclosão	Eclosão

5.2 Desenvolvimento larval

As larvas recém-eclodidas (dia 0) apresentaram-se totalmente despigmentadas, desprovidas de boca, de acuidade visual e de capacidade natatória, com $6,32 \pm 0,69$ mm de comprimento total. O saco vitelínico apresentou formato elipsóide, com volume de $3,64 \pm 0,39$ mm³ e a região do ânus definida, porém, fechada.

No 3º dia já foi possível observar algumas larvas iniciando a abertura da boca, a pigmentação dos olhos e do corpo e um esboço dos rastros branquiais. Nesse período, o comprimento era de $8,76 \pm 0,23$ mm e apresentavam grande quantidade de vitelo (2,94 mm³) (Tabela 2). No 4º dia, esses eventos puderam ser visualizados com maior frequência entre as larvas. Nos primeiros quatro dias após a eclosão, todas as larvas se encontravam no fundo das caixas de cultivo e em decúbito lateral, ficando agrupadas nas suas extremidades. Os prováveis motivos desse comportamento seriam o peso do saco vitelínico e a presença de apenas um esboço da bexiga gasosa e nadadeira peitoral, impedindo-as de se equilibrarem e se movimentarem na coluna d'água. No 5º dia, os arcos branquiais estavam mais desenvolvidos.

A absorção total do saco vitelínico ocorreu somente após 10 dias da eclosão, tendo, no 11º dia, já sido observado o primeiro conteúdo intestinal das larvas. A bexiga gasosa nesse período estava completamente inflada e pigmentada.

No final do período de avaliação (15º dia), as larvas apresentaram comprimento de $12,18 \pm 0,59$ mm. Não foi observado canibalismo entre as larvas durante os 15 dias de avaliação.

TABELA 2. Comprimento e volume do saco vitelínico (média \pm desvio padrão) das larvas de pirapitinga *B. nattereri* entre a eclosão (dia 0) e o 15º dia de vida.

Dias após a eclosão	Comprimento das larvas (mm)	Volume do saco vitelínico (mm ³)
0	6,32 \pm 0,69	3,64 \pm 0,39
3	8,76 \pm 0,23	2,77 \pm 0,32
6	9,67 \pm 0,28	1,49 \pm 0,28
10	10,23 \pm 0,82	0,38 \pm 0,29
13	11,21 \pm 0,10	0
15	12,18 \pm 0,59	0

5.3 Crescimento larval e absorção do vitelo

Foi observada nesse estudo uma diminuição na taxa de crescimento, no período compreendido entre a eclosão (dia 0) e o 10º dia de vida (Figura 2a). As taxas reduziram de 10,80 a 1,42% entre os períodos 0-3 e 6-10 dias, respectivamente. Esse período compreende o tempo gasto pela larva para absorver totalmente seu vitelo. Após esse período houve um aumento na taxa de crescimento, chegando a 4,16% no último intervalo avaliado (13-15 dias).

A reabsorção diária do vitelo pelas larvas pode ser observada na figura 2b. A reabsorção foi mais lenta nos três primeiros dias. Esse período compreende o tempo gasto pela larva para formar e iniciar a abertura da boca e pigmentação dos olhos. Após esse período a reabsorção aumentou acentuadamente, sendo concluída no 11º dia. Nesse período as larvas apresentavam natação do tipo intermitente, consistindo de curtos períodos de atividade seguido de longos períodos de recuperação.

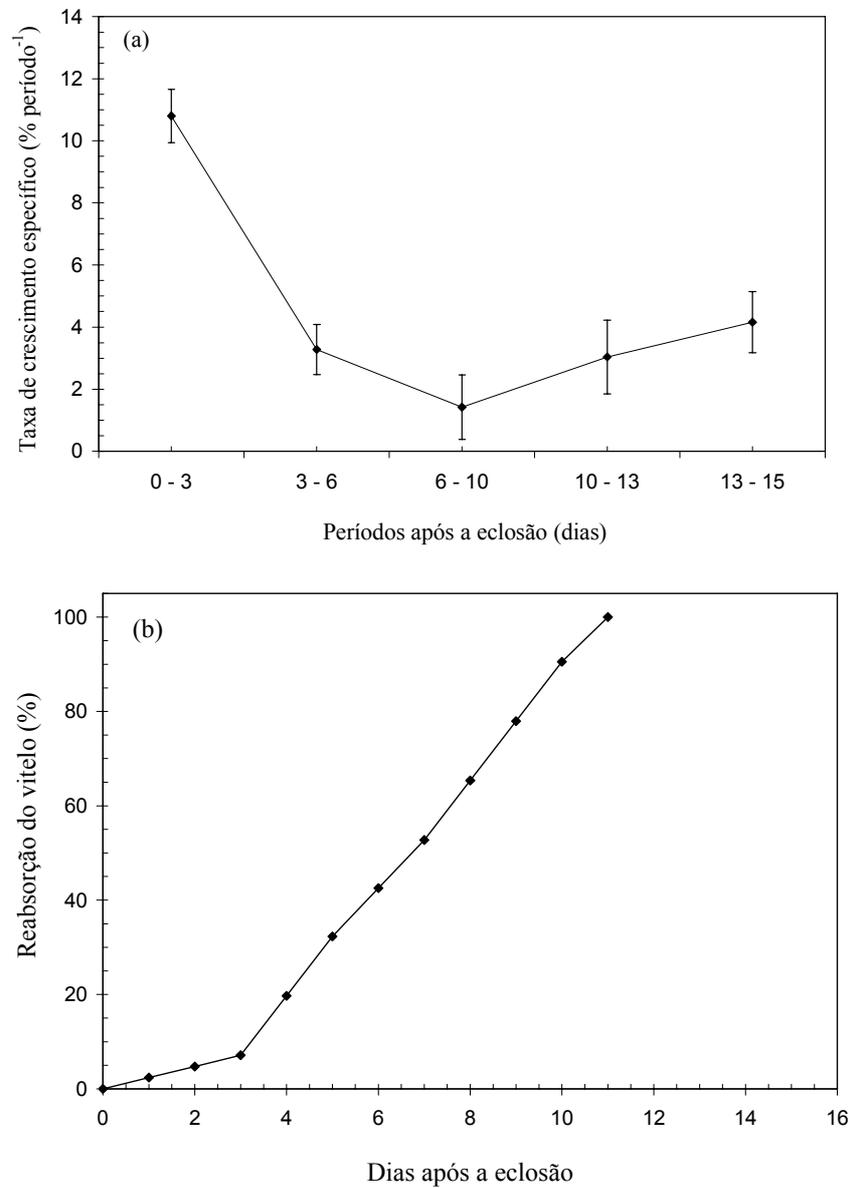


FIGURA 2. Gráfico mostrando: (a) taxa de crescimento específico (média \pm desvio padrão) das larvas durante cinco diferentes períodos (em dias) após a eclosão; (b) Reabsorção diária do vitelo, desde a eclosão (dia 0) até o 11º dia de vida das larvas de pirapitinga *Brycon nattereri*.

5.4 Análise morfométrica

O *B. nattereri* apresentou, aos 14 meses de idade, peso médio de 144 ± 19 g e comprimento padrão de $179,9 \pm 8,9$ mm.

Os valores médios (mm) das medidas morfométricas altura e largura corporal mostraram-se estatisticamente diferentes em relação à região onde foram mensuradas ($P < 0,05$). O histograma ilustrando a variação das médias das larguras e das alturas mensuradas nas diferentes regiões dos peixes pode ser visualizado na Figura 3. Para todas essas medidas, o maior valor médio encontrado foi na região 2 (medial). As medidas de altura e largura decresceram significativamente ($P < 0,05$) nas regiões 2, 1 e 3, respectivamente. Portanto, em todas essas medidas, houve aumento da região 1 (cranial) para a região 2 (medial), com posterior decréscimo (caudal).

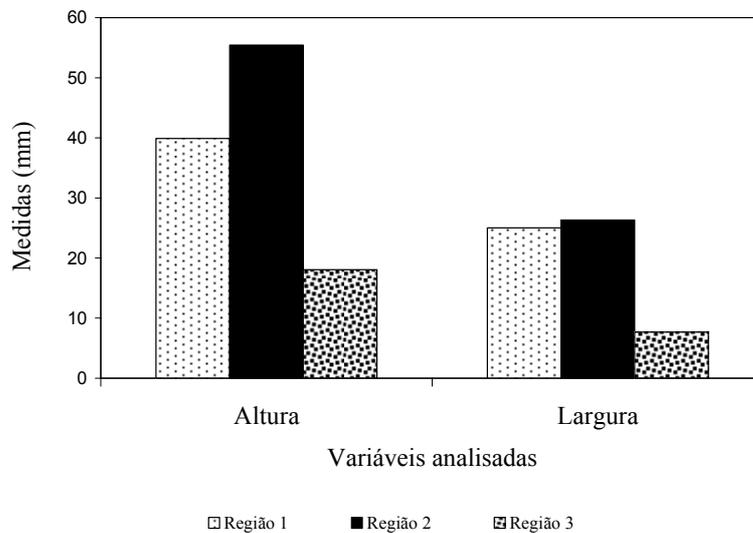


FIGURA 3. Histograma mostrando as medidas morfométricas largura e altura corporal média do *Brycon nattereri*, aos 14 meses de idade, em cada região avaliada (região 1: cranial; região 2: medial e região 3: caudal).

O histograma com as médias das razões morfométricas largura/comprimento padrão (LC:CP), altura/comprimento padrão (AC:CP), largura/comprimento da cabeça (LC:CC), altura/comprimento da cabeça (AC:CC) e altura/largura (AC:LC), para cada região do corpo avaliada, pode ser visualizado na Figura 4. As médias apresentaram diferenças significativas ($P < 0,05$) entre as regiões. A razão A:L aumentou significativamente ($P < 0,05$) da região 1 (cranial) para a região 3 (caudal), enquanto que as razões LC:CP, AC:CP, LC:CC e AC:CC decresceram significativamente ($P < 0,05$) na seqüência 2 (medial), 1 (cranial) e 3 (caudal).

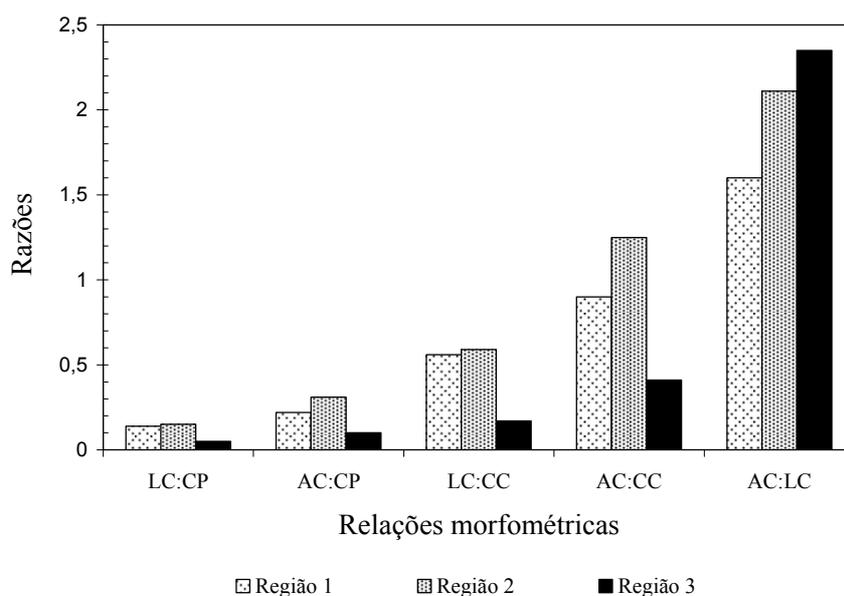


FIGURA 4. Histograma mostrando as médias das razões LC:CP (largura:comprimento padrão), AC:CP (altura:comprimento padrão), LC:CC (largura:comprimento da cabeça), AC:CC (altura:comprimento da cabeça) e AC:LC (altura:largura) do *Brycon nattereri*, aos 14 meses de idade, em cada região avaliada (região 1: cranial; região 2: medial e região 3: caudal).

As médias, os desvios padrões e os coeficientes de variação das razões morfométricas são apresentados na Tabela 3. As proporções médias das variáveis CC, AC1, AC2, AC3, LC1, LC2, LC3, em relação ao comprimento padrão, foram, respectivamente, 24,6%, 22,2%, 30,9%, 10,1%, 13,9%, 14,6% e 4,3%. Os coeficientes de variação foram baixos para todas as variáveis, indicando boa precisão experimental.

TABELA 3. Médias, desvios padrões (D.P.) e coeficientes de variação (CV) das razões morfométricas da pirapitinga (*Brycon nattereri*).

Variáveis (mm)	Média	CV (%)
CC/CP	0,246±0,011	4,6
AC1/CP	0,222±0,012	5,3
AC2/CP	0,309±0,014	4,6
AC3/CP	0,101±0,006	6,2
LC1/CP	0,139±0,008	5,9
LC2/CP	0,146±0,008	5,6
LC3/CP	0,043±0,004	8,2
AC1/CC	0,905±0,064	7,1
AC2/CC	1,256±0,066	5,3
AC3/CC	0,409±0,026	6,4
LC1/CC	0,566±0,038	6,7
LC2/CC	0,596±0,038	6,3
LC3/CC	0,174±0,013	7,4

CP, CC, AC1, AC2, AC3, LC1, LC2 e LC3 são, respectivamente, comprimento padrão; comprimento da cabeça; alturas tomadas na inserção das nadadeiras peitoral (região 1: cranial) e dorsal (região 2: medial), e na menor circunferência do pedúnculo (região 3: caudal); larguras tomadas na inserção das nadadeiras peitoral (região 1: cranial) e dorsal (região 2: medial) e na menor circunferência do pedúnculo (região 3: caudal).

Os coeficientes de correlação entre as medidas morfométricas e peso encontram-se na Tabela 4. O peso apresentou coeficiente de correlação significativo ($P < 0,05$) em todas as medidas avaliadas, no entanto, os maiores valores foram para CP e AC2. As medidas morfométricas que apresentaram maior coeficiente de correlação (acima de 0,50) com o comprimento padrão foram CC, LC2 e AC2, mostrando que a região 2 está mais correlacionada com CP. As larguras apresentaram coeficientes de correlação significativos ($P < 0,05$) principalmente com AC2, indicando que a altura na região medial está mais correlacionada com a largura do peixe. Entre as medidas morfométricas, a maior correlação encontrada foram nas larguras da região anterior da pirapitinga (LC1 e LC2; 0,70).

TABELA 4. Coeficientes de correlação de Pearson entre as medidas morfométricas e peso da pirapitinga (*Brycon nattereri*).

	Peso	CP	CC	AC1	AC2	AC3	LC1	LC2
CP	0,89*							
CC	0,48*	0,61*						
AC1	0,66*	0,47*	0,09					
AC2	0,75*	0,55*	0,37*	0,60*				
AC3	0,27*	0,34*	0,29*	0,11	0,48*			
LC1	0,64*	0,47*	0,32*	0,49*	0,56*	0,18		
LC2	0,64*	0,50*	0,36*	0,39*	0,45*	0,13	0,70*	
LC3	0,36*	0,29*	0,42*	0,02	0,36*	0,17	0,35*	0,23*

CP, CC, AC1, AC2, AC3, LC1, LC2 e LC3 são, respectivamente, comprimento padrão; comprimento da cabeça; alturas tomadas na inserção das nadadeiras peitoral (região 1: cranial) e dorsal (região 2: medial), e na menor circunferência do pedúnculo (região 3: caudal); larguras tomadas na inserção das nadadeiras peitoral (região 1: cranial) e dorsal (região 2: medial) e na menor circunferência do pedúnculo (região 3: caudal).

* significativo, a 5%, pelo teste t.

A partir da análise de regressão observou-se que as medidas que melhor descrevem o peso da pirapitinga foram CP e AC2, confirmando os resultados observados pela análise de correlação.

A equação ajustada a partir das variáveis morfométricas foi a seguinte:

$$\text{Peso} = -290,1 + 1,46 \text{ CP} + 3,11 \text{ AC2} \quad (R^2 = 0,88).$$

O coeficiente de determinação foi alto, demonstrando bom ajuste da equação, que explicou 88% da variação ocorrida nas medidas morfométricas em função do peso médio dos peixes.

A participação de cada variável no modelo foi demonstrada pelo coeficiente de determinação parcial. Observou-se que a variável morfométrica AC2 contribuiu com 9% da variabilidade ocorrida no peso e a variável CP com 79%.

5.5 Avaliação do estágio de desenvolvimento gonadal e proporção sexual

As avaliações histológicas das gônadas coletadas revelaram que, dos 22 peixes amostrados, 11 eram machos e 11 fêmeas, apresentando, portanto, proporção sexual de 1:1. As fêmeas foram significativamente ($P < 0,05$) maiores que os machos, apresentando médias de $18,0 \pm 0,6$ cm e $17,8 \pm 0,6$ cm de comprimento padrão, respectivamente. As fêmeas apresentaram peso corporal médio de 145 ± 17 g e os machos de 146 ± 18 g.

Com base nas características macro e microscópica das gônadas, os seguintes estágios de maturação foram determinados: 1 = repouso, 2 = maturação inicial, 3 = maturação intermediário, 4 = maturação avançado e 5 = parcialmente espermiado. Aos 14 meses de idade, durante a primeira estação reprodutiva, as fêmeas estavam imaturas, apresentando ovários em repouso (Figura 5a) com lamelas ovulíferas contendo ovócitos perinucleolares inicial e

avanzado (Figura 5b). Os ovários apresentavam-se como filetes translúcidos, sem vascularização aparente, de tamanho reduzido e localizados lateralmente à bexiga natatória.

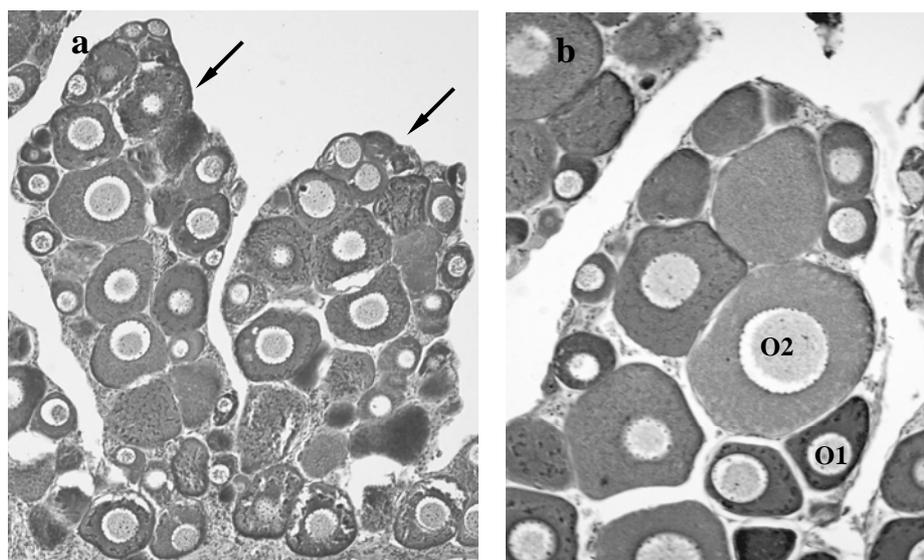


FIGURA 5. a) Ovário em repouso de *B. nattereri* mostrando suas lamelas ovulíferas (seta); b) ovário contendo ovócitos perinucleolar inicial (O1) e ovócitos perinucleolar avançado (O2).

Foram observadas, entre os onze machos avaliados, diferenças no estágio de maturação testicular. Os testículos de dois machos encontravam-se no estágio de repouso, um no estágio maturação inicial (Figura 6a), quatro no estágio de maturação intermediária (Figura 6b), um no estágio de maturação avançada (Figura 6c) e três no estágio parcialmente espermiado (Figura 6d). O menor macho em maturação mediu 17,25 cm de comprimento padrão, com peso de 127 g.

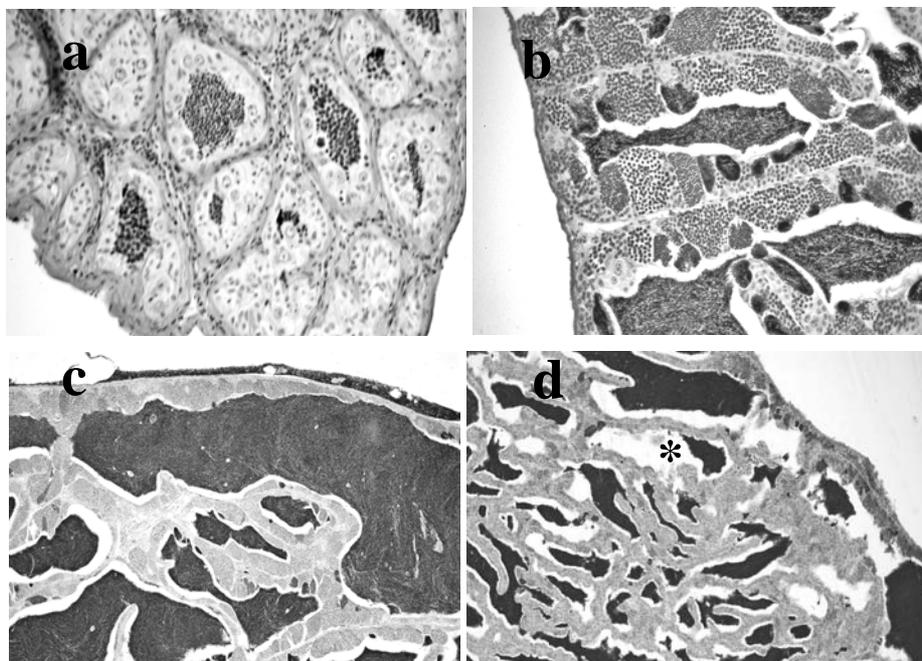


FIGURA 6. Testículos de *B. nattereri* em diferentes estágios de maturação: a) estágio 2 = maturação inicial; b) estágio 3 = maturação intermediária; c) estágio 4 = maturação avançada; d) estágio 5 = testículo parcialmente espermiado; lúmen dos túbulos seminíferos (asterisco) parcialmente esvaziados.

6 DISCUSSÃO

Os eventos morfológicos registrados durante a embriogênese da pirapitinga *B. nattereri* seguiram padrões semelhantes aos relatados em outras espécies de peixes neotropicais de água doce (Nakatani et al., 2001; Borçato et al., 2004; Honorato-Sampaio, 2006; Ninhaus-Silveira et al., 2006; Gomes et al., 2007). No presente estudo, o fechamento do blastóporo ocorreu em torno de 26 horas e a eclosão teve início 50 horas após a fertilização, quando incubados a $19^{\circ}\text{C}\pm 0,6^{\circ}\text{C}$.

A embriogênese pode ser considerada longa em relação a outras espécies do gênero *Brycon*, assim como *B. cf erythropterus*, *B. orbignyanus*, *B. insignis*, *B. siebenthalae* e *B. orthotaenia*, cujo fechamento do blastóporo ocorre de 6 a 8 horas e o desenvolvimento embrionário é concluído entre 12,5 e 18 horas após a fertilização, incubados à temperatura de 23° a 28°C (Eckmann, 1984; Nakatani et al., 2001; Andrade-Talmelli et al., 2001; Clavijo-Ayala et al., 2004; Honorato-Sampaio, 2006).

A maturação gonadal da pirapitinga ocorre no outono-inverno (maio-agosto; Capítulo II desta tese), período caracterizado pela diminuição na ocorrência de chuvas e por temperaturas mais baixas, diferentemente do observado nas outras espécies de *Brycon* citadas, que se reproduzem na primavera-verão (outubro a janeiro). A temperatura é o principal fator que controla a taxa de desenvolvimento dos peixes (Kamler, 1992). Sua ação no período embrionário está ligada à variação na taxa de embriogênese e às variações (assincronia e malformações) no desenvolvimento dos embriões (Morrison et al., 2001). O desenvolvimento e o crescimento são interrompidos abaixo de um limite mínimo de temperatura, enquanto que uma mortalidade massal ocorre em temperaturas acima do limite máximo (Kamler, 1992).

Em estudo realizado com *Prochilodus lineatus*, observou-se que a duração do desenvolvimento embrionário na temperatura de incubação 24°C foi 1,6 vez mais lenta que sob 28°C (Ninhaus-Silveira et al., 2006). Os animais ectotérmicos apresentam desenvolvimento mais acelerado em temperaturas mais elevadas, devido a alterações que a temperatura induz nas atividades enzimáticas durante organogênese (Ojanguren e Braña, 2003). Além desse fator, outro que influencia o tempo de incubação é o tamanho do ovócito que, em *B. nattereri*, é maior do que em outras espécies desse gênero (Capítulo II desta tese). Segundo Kamler (2002), o tamanho do ovócito é um dos fatores responsáveis pelo prolongamento do tempo de fases ontogenéticas específicas.

As taxas de eclosão observadas neste estudo variaram de 0,6% a 23,6%. Embora este valor seja baixo, em se tratando de uma espécie pouco domesticada e sem nenhum estudo científico sobre sua reprodução induzida, este resultado pode ser considerado satisfatório.

Alguns resultados semelhantes já foram obtidos em outra espécie desse gênero (*B. orbignyanus*), nos quais as taxas de eclosão variaram de 10,5% (Zaniboni-Filho e Barbosa, 1996) a 30% (Belmont, 1994). Por outro lado, em *B. opalinus* e *B. insignis*, esses valores foram superiores (40% e 41,8%, respectivamente) aos obtidos no presente estudo. Um dos motivos para a baixa taxa de eclosão observada nesse estudo pode ter sido o tipo de incubadora utilizada. As incubadoras do tipo funil (formato vertical) são indicadas para espécies que apresentam ovos livres e larvas com movimento vertical na coluna d'água (Sato et al., 2003). Essas características não foram observadas na pirapitinga, que apresentou ovos levemente adesivos (Capítulo II desta tese) e as larvas, após a eclosão, não se movimentavam verticalmente na coluna d'água. Para essas espécies, normalmente, são utilizadas incubadoras do tipo peneira (formato horizontal) (Sato et al., 2003).

O conhecimento das fases de desenvolvimento e crescimento larval de peixes é importante, principalmente na determinação do momento da reabsorção do saco vitelínico e da abertura da boca, indicadores da necessidade de alimentação exógena. O comprimento total das larvas de *B. nattereri* após a eclosão (6,32 mm) é superior ao observado nas outras espécies desse mesmo gênero, como *B. orbignyanus* (4,46 mm) (Reynalte-Tataje et al., 2004) e *B. insignis* (5 a 6 mm) (Andrade-Talmelli et al., 2001). O volume do saco vitelínico é de 6 a 10 vezes maior do que outras espécies tropicais, como *B. orbignyanus* (0,62 mm³) (Reynalte-Tataje et al., 2004) e *Piaractus mesopotamicus* (0,38 mm³) (Clavijo-Ayala et al., 2006). Neste estudo, constatou-se grande taxa de crescimento das larvas nos três primeiros dias de vida; depois disso, o

crescimento diminuiu acentuadamente, até o 10º dia após a eclosão. Esse período coincide com o tempo gasto pela larva para a completa absorção do vitelo.

Segundo Kamler (1992), a diminuição no crescimento das larvas vitelínicas revela déficit energético e absorção de tecidos. Em estudo realizado com cinco espécies de peixes de água doce, foi constatado que a energia contida no vitelo é utilizada, principalmente, para crescimento dos tecidos. Menos energia é despendida no metabolismo e ainda menos com a excreção de materiais residuais. Inicialmente, os custos metabólicos acumulados aumentam lentamente com a idade das larvas vitelínicas. Com o passar do tempo, esse aumento torna-se rápido, mas a absorção de tecido resultante da deficiência de vitelo reduz novamente o processo metabólico (Jaworski e Kamler, 2002). Após a absorção do vitelo pelas larvas de *B. nattereri*, houve retomada no crescimento corporal, devido ao início da alimentação exógena, observada no dia seguinte à absorção do vitelo (11º dia).

A partir da análise morfométrica de *B. nattereri* com 14 meses de idade, foi observado que a razão entre a altura e a largura do corpo aumentou da região cranial para caudal e as demais razões aumentaram da região cranial para medial e, posteriormente, diminuíram na região caudal. Portanto, os peixes mostraram-se mais arredondados na região cranial e foram se tornando mais comprimidos lateralmente na sua parte posterior. Esse formato, provavelmente, apresenta relação com a abertura da cavidade celomática, que é maior na porção anterior dos peixes, onde se encontra a maior parte das vísceras. Segundo Boscolo et al. (2001), as relações largura/comprimento e largura/altura representam a conformação do filé, indicando que os peixes são mais robustos quando elas são elevadas.

O *B. nattereri* apresentou razões AC2/LC2 (2,11), AC2/CP (0,309), LC2/CP (0,142) e CC/CP (0,246) muito próximas às encontradas para o *B.*

cephalus (Vilas Boas, 2001) e *B. orbignyana* (Freato, 2005), comprovando a semelhança no formato do corpo dessas duas espécies do gênero *Brycon*. Porém, a razão altura e largura na região medial (AC2/LC2), para o *B. nattereri* foi menor do que a observada para o *B. cephalus* (2,36) e *B. orbignyana* (2,40), sugerindo que o *B. nattereri* é uma espécie um pouco mais compacta do que as outras espécies desse gênero.

O *B. nattereri*, quando comparado a uma espécie achatada dorso-ventralmente (formato fusiforme deprimido), como o *Pseudoplatystoma coruscans* (Miranda e Ribeiro, 1997), apresenta maior relação entre a altura e a largura medial (0,79; AC2/LC2) e entre a altura medial e comprimento padrão (0,17; AC2/CP), além de menor relação entre a largura medial e o comprimento padrão (0,21; LC2/CP). O *B. nattereri* apresenta menor proporção de cabeça do que espécies como *Pseudoplatystoma coruscans* (0,36) (Miranda e Ribeiro, 1997) e *Oreochromis niloticus* (0,30) (Boscolo et al., 2001). Eyo (1993), em um estudo com dez espécies de peixes, relatou que peixes com cabeça grande em relação ao corpo apresentam menor rendimento na filetagem, comparados aos de cabeça pequena, confirmando que o rendimento é um reflexo da estrutura anatômica.

Em *B. nattereri*, as medidas corporais CP e AC2 foram aquelas que apresentaram maior coeficiente de correlação com o peso corporal, sendo uma boa alternativa para avaliar o peso em condições de campo quando balanças de precisão não estão disponíveis. Em *B. orbignyana*, Freato (2005) verificou que essas mesmas medidas CP e AC2 são responsáveis por mais de 80% da variação observada nos pesos de carcaça e de filé sem pele, podendo ser utilizadas como critério de avaliação de carcaça e de seleção, em programas de melhoramento genético.

Os testículos dos machos de *B. nattereri* em cativeiro encontravam-se em maturação no primeiro ano de vida, quando o menor exemplar observado

apresentava 17,25 cm de comprimento padrão. Por outro lado, os óvários das fêmeas ainda estavam imaturos. Um estudo realizado por Lima et al. (2007) com essa mesma espécie relatou que a idade à primeira maturação observada em animais capturados na bacia hidrográfica do alto Paraná foi de 15,8 e 18,5 cm de comprimento padrão, para machos e fêmeas, respectivamente. No entanto, na bacia do alto Tocantins, esses valores foram bem menores (9,8 e 11,4 cm, respectivamente). A proporção sexual observada neste estudo foi clássica, 50% de machos e 50% de fêmeas. A proporção sexual pode fornecer subsídios importantes para o conhecimento da relação entre os indivíduos e o ambiente, bem como da situação populacional em uma dada espécie (Nikolsky, 1969).

O *B. nattereri* apresentou desenvolvimento inicial prolongado, quando comparado a outros Characideos. O formato do corpo dos juvenis se assemelha ao de outros peixes do gênero *Brycon* de grande importância econômica, sendo esta uma característica relacionada com o rendimento no processamento.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE-TALMELLI, E. et al. Embryonic and larval development of the “piabanha”, *Brycon insignis*, Steindachner, 1876 (Pisces, Characidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 21-28, 2001.

BELMONT, R. A. F. Considerações sobre a propagação artificial da piracanjuba, (*Brycon orbignyianus*). In: SEMINÁRIO SOBRE CRIAÇÃO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Brycon*, 1., 1994, Pirassununga. **Anais...** São Paulo: 1994. p.17-18.

BLAXTER, J. H. S; HEMPEL, G. The influence of egg size on herring larvae (*Cuplea harengus* L). **ICES Journal of Marine Science**, Oxford, v. 28, p. 211-240, 1963.

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

BOSCOLO, W. R. et al. Desempenho e características de carcaça de machos revertidos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagem Tailandesa e Comum, nas fases inicial e de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n. 5, p. 1391-1396, Sept./Oct. 2001.

BOSWORTH, B. G.; LIBEY, G. S.; NOTTER, D. R. Relationships amongs body weight, body shape, visceral components and fillet traits in palmetto bass (stripped bass female *Morone axatilis* white bass male *M. chrysops*) and paradise bass (stripped bass female *M. axatilis* yellow bass male *M. mississippiensis*). **Journal World Aquaculture Society**, Baton Rouge, v.29, n.1, p.40-50, Mar. 1998.

COMPANHIA ENERGÉTICA DE MINAS GERAIS, FUNDAÇÃO CENTRO TECNOLÓGICO DE MINAS GERAIS. CEMIG/CETEC. **Guia ilustrado de peixes da bacia do rio Grande**. Belo Horizonte: CEMIG/CETEC, 2000. 144 p.

CIBERT, C. et al. Morphological screening of carp *Cyprinus carpio*: relationship between morphology and fillet Yield. **Aquatic Living Resource**, Paris, v. 12, n. 1, p. 1-10, Jan. 1999.

CLAVIJO-AYALA J. A.; ARIAS-CASTELLANOS, J. A. Avances en el estudio de la embriología del yamú, *Brycon siebenthalae* (Pisces: Characidae). **Dahlia Revista de la Asociación Colombiana de Ictiólogos**, Colômbia, v. 7, p. 37-48, 2004.

CLAVIJO-AYALA, J. A.; VETORELLI, M. P.; PORTELLA, M. C. Desenvolvimento inicial e caracteres de identificação de larvas vitelinas de Pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). In: CONGRESSO IBEROAMERICANO VIRTUAL DE ACUICULTURA, 4., 2006, Zaragoza. **Anais...**. Zaragoza: editora, 2006. Disponível em: <<http://www.civa2006.org>>. Acesso em: 10 nov. 2007, p.819-828, 2006.

DIODATTI, F. C. **Medidas morfométricas no peso e rendimento de componentes corporais de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2006. 54p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

ECKMANN, R. Induced reproduction in *Brycon* cf. *erythropterus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 8, p. 379-382, 1984.

EYO, A. A. Carcass composition and filleting yield of ten fish species from Kainji Lake. Proceedings of the FAO Expert consultation on fish technology in Africa. **FAO Fishers Rport**, Rome, n. 467, p. 173-175, 1993.

FREATO, T. A. **Morfometria, rendimento no processamento e inter-relações na avaliação de carcaça de Piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (VALENCIENNES, 1849)**. 2005. 90p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

GOMES, B. V. C. et al. Comparative oocyte morphology and early development in three species of trahiras from the São Francisco River basin, Brazil. **Journal of Fish Biology**, London, v. 70, p. 1412-1429, 2007.

HONORATO-SAMPAIO, K. **Superfície ovocitária e desenvolvimento inicial de quatro espécies de peixes de interesse comercial da bacia do rio São Francisco**. 2006. 53 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

JAWORSKI, A.; KAMLER, E. Development of a bioenergetics model for fish embryos and larvae during the yolk feeding period. **Journal of Fish Biology**, London, v. 60, p. 785-809, 2002.

KAMLER, E. **Early Life History of Fish: An Energetics Approach**. London: Chapman & Hall, 1992. 267 p.

KAMLER, E. Ontogeny of yolk-feeding fish: an ecological perspective. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, London, v. 12, p. 79-103, Mar. 2002.

LIMA, F. C. T. Subfamily Bryconinae (Characins, tetras). In: REIS, R. E., KULLANDER, S. O., FERRARIS, C. J. (Eds.). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPURS, 2003. p.174-181.

LIMA, F. C. T. et al. Threatened fishes of the world: *Brycon nattereri* Günther, 1864 (Characidae). **Environmental Biology of Fishes**, Netherlands, v.1, p.1-2, Dec. 2007.

MIRANDA, M. O. T.; RIBEIRO, L. P. **Características zootécnicas do surubim (*Pseudoplatystoma coruscans*)**. In: MIRANDA, M. O. T (Org.). **Surubim**. Belo Horizonte: IBAMA, 1997. p. 43-56 (Coleção Meio-Ambiente, Série Estudos Pesca, 19).

MORRISON, C. M.; MIYAKE, T.; WRIGHT JR.; J. R.; Histological study of development of the embryo and early larva of *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae). **Journal of Morphology**, California, v. 247, p. 172-196, 2001.

NAKATANI, K. et al. **Ovos e larvas de peixes de água doce**. Maringá: EDUEM, 2001. 378p.

NIKOLSKY, G. V. **Theory of fish population dynamics**. Edinburgh, Oliver e Boyd, 323p, 1969.

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

OJANGUREN, A. F.; BRAÑA, F. Thermal dependence of embryonic growth and development in brown trout. **Journal of Fish Biology**, London, v. 62, p. 580-590, 2003.

PUVANENDRAN, V. BROWN, J. A. Foraging, growth and survival of Atlantic cod larvae reared in different prey concentrations. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 175, p. 77-92, 1999.

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

REYNALTE-TATAJE, D.; LUZ, R. K.; MEURER, S.; ZANIBONI-FILHO, E.; NUÑER, A. P. O. Influência do fotoperíodo no crescimento e sobrevivência de pós-larvas de piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849) (Osteichthyes, Characidae). **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 24, n. 2, p. 439-443. 2002.

SATO, Y.; FENERICH-VERANI, N., GODINHO, H. P. Reprodução induzida de peixes da bacia do São Francisco. In: GODINHO, H. P.; A. L. GODINHO, A. L. (Org.). **Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais**. Belo Horizonte: PUC Minas, 2003a. p. 275-289.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA. **SAEG**: Sistemas de análises estatísticas e genéticas. versão 5.0. Viçosa, MG, 1992. 59p. Manual do usuário.

VILAS BOAS, G.C. **Morfometria, rendimento do processamento e composição química do filé de matrinchã *Brycon cephalus* (GUNTHER, 1869)**. 2001. 59p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Univesidade Federal de Lavras, Lavras.

ZANIBONI-FILHO, E.; BARBOSA, N. D. C. Priming hormone administration to induce spawning of Brazilian migratory fish. **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 56, n. 4, p. 655-659, 1996.

CAPÍTULO V

CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho são apresentadas informações inéditas sobre os parâmetros reprodutivos, o desenvolvimento embrionário e o crescimento de larvas e juvenis de *Brycon nattereri*. Essa espécie é uma alternativa para aqüicultura, apresentado potencial de comercialização.

O *B. nattereri* pode ser reproduzido em condições artificiais, porém, mais pesquisas são necessárias nas áreas de ciclo reprodutivo, gametogênese e indução de desova, propiciando maior eficiência na produção de alevinos.

Os ovócitos e os espermatozóides apresentaram padrões morfológicos característicos ao observado em outras espécies de *Brycon*, exceto no formato ovóide da cabeça do espermatozóide. Durante a fertilização, foram observados todos os eventos característicos, da prevenção à polispermia.

Nessa espécie, há produção pequena de ovócitos por desova, porém, com maior quantidade de vitelo, proporcionando maior tempo de incubação e fase larval. O maior tempo de período endotrófico pode ser considerado positivo ao seu cultivo, uma vez que permite melhor adequação das instalações, em função da disponibilidade de animais. O tamanho inicial das larvas é maior em comparação ao observado em outras espécies de peixes reofílicos brasileiros. A abertura da boca nas larvas ocorreu entre o 3º e o 4º dia após a eclosão e a reabsorção total do saco vitelínico após 10 dias, coincidindo com o início da alimentação exógena.

O formato do corpo dos juvenis é semelhante ao de outros peixes do gênero *Brycon*, de grande importância econômica. A análise das medidas morfométricas corporais mostrou que o *B. nattereri* é mais arredondado na região próxima à cabeça e vai se tornando mais comprimido lateralmente na parte posterior do seu corpo. A proporção sexual foi de 50% de machos e 50%

de fêmeas. A maioria dos machos apresenta testículos em maturação, na primeira estação reprodutiva. Por outro lado, as fêmeas são imaturas.

Estes resultados contribuem para o conhecimento das características reprodutivas e de desenvolvimento, fornecendo informações fundamentais para o processo de produção desta espécie.