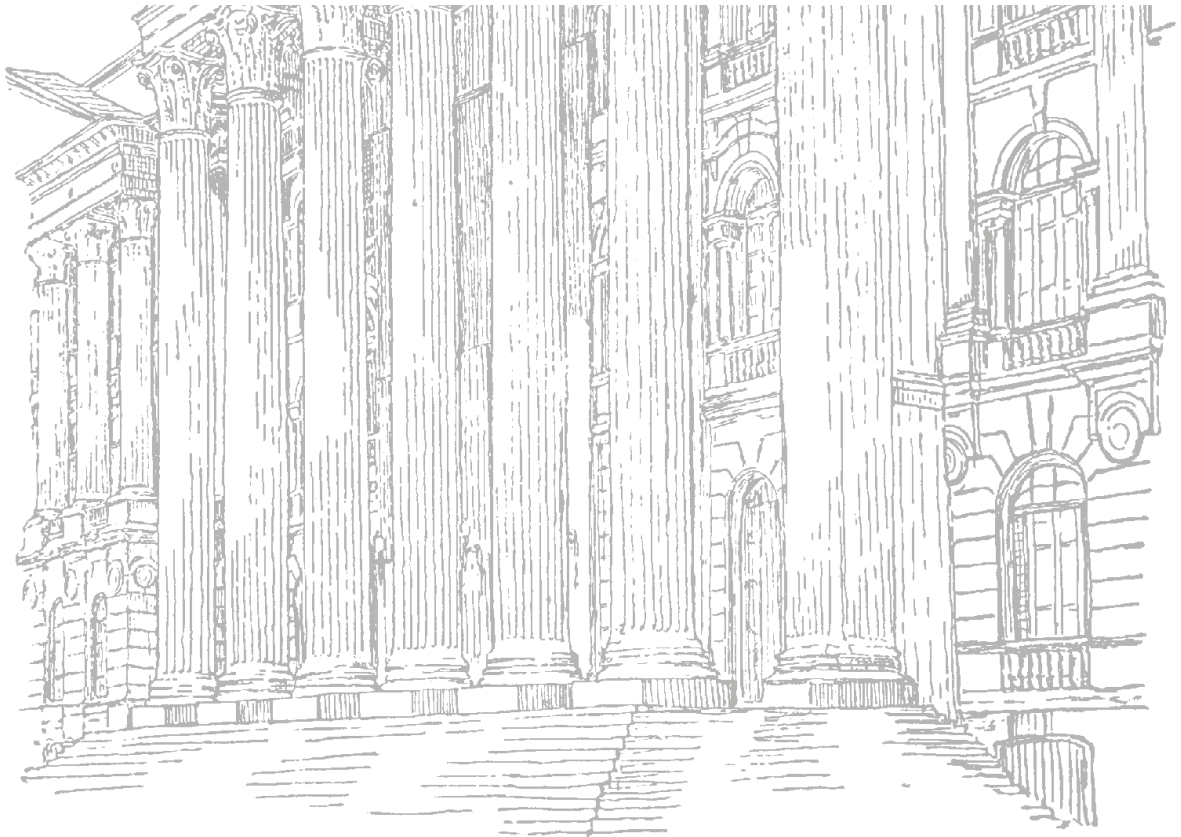
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALANA MARIELLE RODRIGUES GALDINO

ESTADIAMENTO DOS EMBRIÕES E LARVAS E AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DAS LARVAS E PÓS LARVAS DO PEIXE NEOTROPICAL JUNDIÁ *Rhamdia quelen* (SILURIFORMES, HEPTAPTERIDAE) PRODUZIDAS SOB DIFERENTES TEMPERATURAS DE INCUBAÇÃO



CURITIBA

2009

ALANA MARIELLE RODRIGUES GALDINO

ESTADIAMENTO DOS EMBRIÕES E LARVAS E AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DAS LARVAS E PÓS LARVAS DO PEIXE NEOTROPICAL JUNDIÁ *Rhamdia quelen* (SILURIFORMES, HEPTAPTERIDAE) PRODUZIDAS SOB DIFERENTES TEMPERATURAS DE INCUBAÇÃO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Prof[a].Dr[a]. Flavia Sant'Anna Rios

CURITIBA

2009

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná
Instituto de Biologia Molecular do Paraná

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que **Alana Marielle Rodrigues Machado**, no dia 30 de outubro de 2009, defendeu sua Dissertação de Mestrado intitulada: "**Estadiamento e avaliação da qualidade das larvas do peixe neotropical Jundiá *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) produzidas sob diferentes temperaturas de incubação**", com a Banca Examinadora constituída pelos professores: Dra. Carolina Arruda de Oliveira Freire (Universidade Federal do Paraná - UFPR), Dra. Cláudia Feijó Ortolani Machado (Universidade Federal do Paraná - UFPR), e Dra. Flávia Sant' Anna Rios (orientadora e presidente da banca examinadora da Universidade Federal do Paraná), e tendo sido **Aprovada** recebendo o título de Mestre em Biologia Celular e Molecular, área de Concentração em Biologia Celular e Molecular.

Cumprindo todas as exigências estabelecidas nas Normas Internas deste Programa. Esta declaração tem validade por noventa dias (90), a partir da data da mesma.

Curitiba, 30 de outubro 2009.

Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
Biologia Celular e Molecular

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Flavia por me ensinar a medida exata entre o profissionalismo, a educação e o respeito por tudo e todos. A ela que é minha “mãe científica” agradeço o constante apoio e dedicação, além da confiança em mim depositada.

Ao professor Peter Gaberz Kirschnik e ao técnico Jorge Daniel Mikos pelo auxílio e pela utilização das dependências do Laboratório de Pesquisa e Piscicultura (LAPEP - PUCPR) durante as desovas induzidas dos embriões.

À professora Lucélia Donatti (UFPR – Biologia Celular) e a aos técnicos do Centro de Microscopia Eletrônica (UFPR), Luis, Regina e Fernando e do Lactec, Jorge, pelo auxílio no processamento, observação e documentação das amostras de Microscopia Eletrônica de Varredura.

Ao prof. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro pela ajuda com ultramicrotomia das amostras e á prof. Dorly de Freitas Buchi (UFPR – Biologia Celular) por ter gentilmente doado alguns reagentes utilizados nesta dissertação.

Ao Professores Iglenir Cavalli e Enilze Maria Ribeiro por abrirem as portas de seu laboratório e pelo empréstimo dos reagentes para que eu pudesse fazer minhas análises de DNA:RNA:Proteína.

Aos queridíssimos colegas de laboratório Anderson, Camila, Fernanda, Mariana, Mônica, Nádia, Patrícia, Priscila e Nitiananda pelo imenso auxílio durante as coletas dos embriões e larvas e durante as práticas laboratoriais. E especialmente ao Marcelo que foi uma verdadeira ajuda em todas as etapas deste trabalho.

Aos meus irmãos por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos de dificuldades, sem minha família meus sonhos não seriam possíveis.

Ao meu namorado Everton por estar sempre ao meu lado, pelo apoio, força, incentivo e também por todo auxílio durante o trabalho.

À minha amiga Giovana por ter me aceitado como uma verdadeira amiga, por ter sido um ombro nos momentos difíceis, por me ensinar a sorrir mais e reclamar menos e por todas as festas que fizemos juntas. Além de tudo isto, por toda a ajuda com o excell, o biostat, o inglês e principalmente pelas análises de DNA:RNA:Proteína. Também agradeço aos meus amigos Gustavo, Marcos, Márcio, Rodrigo, Sarah por sempre estarem a minha disposição quando precisei e pelos bons momentos que passamos juntos.

Enfim, a todos um MUITO OBRIGADA por toda a ajuda e força nestes quase dois anos e, em especial, neste momento.

Ando devagar porque já tive pressa
E levo esse sorriso, porque já chorei demais
Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe
Eu só levo a certeza de que muito pouco eu sei,
Eu nada sei
Conhecer as manhas e as manhãs,
o sabor das massas e das maçãs,
É preciso amor pra poder pulsar,
É preciso paz pra poder seguir,
É preciso a chuva para florir.
Penso que seguir a vida seja simplesmente
Conhecer a marcha, ir tocando em frente
Como um velho boiadeiro levando a boiada,
Eu vou tocando os dias pela longa estrada, eu vou,
Estrada eu sou
Todo mundo ama, um dia todo mundo chora,
Um dia a gente chega, e o outro vai embora.
Cada um de nós compõe a sua história,
E cada ser em si, carrega o dom de ser capaz,
E ser feliz

Almir Sater e Renato Teixeira

RESUMO

A temperatura da água durante a incubação é um fator essencial no desenvolvimento dos peixes. Sendo assim, o objetivo desse estudo foi avaliar a qualidade das larvas e pós-larvas, bem como descrever as principais características morfológicas e a cronologia dos estádios do desenvolvimento embrionário e larval do jundiá (*Rhamdia quelen*) em diferentes temperaturas de incubação. Os embriões foram obtidos através de desova induzida e incubados a 18, 21, 24, 27 e 30ºC. Foram amostrados ao término de cada período (horas após a fertilização-hpf) do desenvolvimento embrionário de acordo com a temperatura em que foram incubados e durante o período larval: 24 horas após a eclosão (hpe), pós-larval (pós-larvas com 7 dias após a eclosão) e juvenis (30 dias após a eclosão). Foram feitos testes de fixação com o intuito de se obter o melhor método de fixação para embriões da espécie nas condições padrão de desenvolvimento (25℃ ±1℃), tanto para microscopia de luz quanto para microscopia eletrônica de varredura. As amostras foram fixadas, com e sem a membrana coriônica, em paraformaldeído 4% em tampão PBS ou PB 0,1M para análises de microscopia de luz e através de três diferentes protocolos do fixador Karnovsky, para análises de microscopia eletrônica de varredura. Através da microscopia de luz e eletrônica, foram descritas as principais alterações morfológicas que caracterizam cada estádio do desenvolvimento inicial desta espécie. A qualidade das larvas eclodidas foi avaliada pela verificação da sobrevivência, freqüência cardíaca, composição centesimal, taxa de síntese protéica, bem como do número e tamanho das fibras musculares formadas nos peixes incubados em diferentes temperaturas. Malformações anatômicas foram observadas em todas as temperaturas, porém, ocorreram com maior freqüência nas temperaturas de 18 e 30^{o}C. Em todas as temperaturas as larvas apresentaram freqüência cardíaca mais elevada que as pós-larvas, sendo este parâmetro dependente da temperatura. Foram realizadas análises da composição centesimal (lipídios e proteínas totais, peso úmido, seco e matéria mineral) das amostras e não foi verificada diferença significativa entre as temperaturas. Houve alteração da celularidade muscular em resposta à temperatura de incubação, sendo que, a 27^{o}C, as fibras se tornaram mais espessas. Embora não tenha havido diferença significativa, verificou-se uma tendência à diminuição da densidade das fibras com o aumento da temperatura nos peixes incubados entre 21 e 27^{o}C. A concentração de DNA e de proteínas aumentou ao longo do tempo em todas as temperaturas e a de RNA diminuiu, exceto a 24^{o}C. A taxa de síntese protéica foi maior a 27 e 30^{o}C. As pós-larvas apresentaram maior crescimento relativo quando incubados a 24 e 27^{o}C, quando comparados ás temperaturas experimentais mais extremas. O crescimento protéico específico mostrou-se diretamente proporcional à temperatura. Os resultados permitem concluir que, 27^{o}C é a melhor temperatura para incubação de embriões e larvas de *R. quelen*, uma vez que resulta em tempo de desenvolvimento relativamente rápido, boas taxas de sobrevivência e de crescimento, elevada síntese protéica, baixa incidência de malformações e formação de fibras musculares hipertrofiadas. As temperaturas de 18 e 30 ^{o}C não são adequadas à incubação desta espécie.

Palavras-Chave: peixes, jundiá, desenvolvimento embrionário, larvicultura, crescimento.

ABSTRACT

Water temperature during incubation is an essential factor in fish development. By this way, the aim of this study was to evaluate the quality of the hatched larvae and postlarvae, and to describe the main morphological features and chronology of the stages of embryonic and larval development of silver catfish (*Rhamdia quelen*) at different temperatures of incubation. Embryos were obtained through induced spawning and incubated at 18, 21, 24, 27 and 30℃. They were sampled at the end of each period (hours postfertilization, hpf) embryonic development according to the temperature at which they were incubated and during the larval period: 24 hours after hatching (hpe), post-larval (post-larvae 7 days after hatching) and juveniles (30 days after hatching). Fixation tests were carried out in order to obtain the best protocol for both light and scanning electron microcopies for embryos of this species in standard development conditions (25℃ ± 1℃). The samples we re fixed with e without the chorionic membrane in 4% paraformaldehyde in 0.1 M PBS or PB for the analysis of light microscopy and by three different protocols of Karnovsky fixative for electron microscopy analysis. The main morphological changes characterizing each development stage were described. The quality of the hatched larvae was evaluated by checking the survival, heart rate, proximal composition, protein synthesis rate, and both number and size of muscle fibers formed in fish incubated at different temperatures. Anatomical malformations were observed at all temperatures, however, occurred more frequently at 18 and 30℃. I n all the temperatures the larvae had presented higher cardiac frequency than the post-larvae stage. The heart rate was directly correlated to temperature. There was not significant difference in proximal composition (lipids, proteins, moisture, and ash) among temperatures. Muscle cellularity change with temperature. Muscle fibers became thicker at 27^{o}C.
A trend (not significant) to the reduction of the density of staple fibres with the increase of the temperature was verified in the fish incubated among 21 and 27^{o}C.The protein and DNA concentration increased throughout the time in all temperatures and RNA concentration decreased, except 24℃. Protein synthesis rate was higher at 27 e 30^{o}C. Relative growth rate was higher at 24 and 27℃ i n comparison to extremer experimental temperatures. Specific protein growth rate was directly correlated to temperature. The present results suggest that 27^{o}C is the optimal temperature to *R. quelen* embryo and larvae incubation, since it result in relatively fast development, good survival, high growth and protein synthesis rates, low malformations occurrence, and formation of hypertrophyc muscle fibers. The extreme temperatures (18 e 30^{o}C) are not recomended to incubation of this species.

Keywords: fish, jundiá, embryonic development, larval development, growth.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 01	EXEMPLAR ADULTO DE *Rhamdia quelen*	18
FIGURA 02	PERÍODO DE ZIGOTO DE *Rhamdia quelen*.....	35
FIGURA 03	PERÍODO DE CLIVAGEM DE *Rhamdia quelen*.....	35
FIGURA 04	PERÍODO DA BLÁSTULA DE *Rhamdia quelen*.....	36
FIGURA 05	PERÍODOS DE BLÁSTULA FINAL E GÁSTRULA de *Rhamdia quelen*.....	39
FIGURA 06	PERÍODO DE SEGMENTAÇÃO DE *Rhamdia quelen*.....	40
FIGURA 07	FORMAÇÃO DO MÚSCULO DE *Rhamdia quelen*.....	40
FIGURA 08	PERÍODO DE FARÍNGULA DE *Rhamdia quelen*.....	41
FIGURA 09	PERÍODO LARVAL DE *Rhamdia quelen*.....	42
FIGURA 10	OBTENÇÃO DOS OVOS DE *Rhamdia quelen*.....	55
FIGURA 11	DESENHO EXPERIMENTAL.....	56
GRÁFICO 01	TAXA DE SOBREVIVÊNCIA.....	62
FIGURA 12	MALFORMAÇÕES ANATÔMICAS.....	63
GRÁFICO 02	ÍNDICE DE MALFORMAÇÕES ANATÔMICAS.....	64
GRÁFICO 03	TAXA DE CRESCIMENTO.....	66
GRÁFICO 04	RAZÃO RNA:DNA EM RELAÇÃO A TAXA DE CRESCIMENTO PROTÉICO.....	67
GRÁFICO 05	RAZÃO RNA:PROTEÍNA.....	68
FIGURA 13	CORTE TRANSVERSAL DA MUSCULATURA EPAXIAL DE JUVENIL DE JUNDIÁ *Rhamdia quelen* INCUBADO A 27℃.....	85
GRÁFICO 06	CONCENTRAÇÃO DE DNA, RNA E PROTEÍNA NO DESENVOLVIMENTO.....	69
GRÁFICO 07	FREQUENCIA CARDÍACA.....	71
GRÁFICO 08	MORFOMETRIA DAS FIBRAS MUSCULARES DE JUVENIS DE JUNDIÁ *Rhamdia quelen*.....	88
GRÁFICO 09	COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DE PÓS LARVAS DE JUNDIÁ *Rhamdia quelen*...	94
FIGURA 14	EMBRIÃO VIVO DE *R. quelen* NO INÍCIO DO PERÍODO DE SEGMENTAÇÃO..	104
FIGURA 15	MATERIAIS PARA EMBLOCAGEM.....	105
FIGURA 16	PROCEDIMENTO PARA EMBLOCAGEM.....	107
FIGURA 17	CORTES HISTOLÓGICOS DE EMBRIÕES E LARVAS DE PEIXES.....	110
FIGURA 18	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE EMBRIÕES DE JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*) EM ESTÁDIO DE SEGMENTAÇÃO.....	113

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 -	PERÍODOS E ESTADIOS DE DESENVOLVIMENTO DE *Rhamdia quelen* INCUBADOS A 21℃, 24℃, 27℃ E 30℃.....	33
TABELA 02 -	ESTUDOS ANTERIORES DO DESENVOLVIMENTO TELEÓSTEO.....	46
TABELA 03 -	ESTÁDIO DO DESENVOLVIMENTO EM QUE FORAM COLETADOS OS EMBRIÕES DAS INCUBADORAS DE CADA	57
TABELA 04 -	CAIXA.....	
	SITUAÇÕES DE FIXAÇÃO PARA MICROSCOPIA DE LUZ A QUE FORAM	102
TABELA 05 –	SUBMETIDOS EMBRIÕES DE *Rhamdia quelen* EM SEGMENTAÇÃO (ESTÁDIO 16)..	112
TABELA 06 -	FORMULAÇÕES DE FIXADOR KARNOVSKI TESTADAS EM EMBRIÕES DE *Rhamdia quelen*.....	112
TABELA 07 -	SITUAÇÕES DE FIXAÇÃO PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA A QUE FORAM SUBMETIDOS EMBRIÕES DE *Rhamdia quelen*.....	116
	MAIORES TAXAS OBTIDAS EM CADA ANÁLISE NAS CINCO TEMPERATURAS DE INCUBAÇÃO EM ESPÉCIMES DE JUNDIÁ.....	

SUMÁRIO

1. CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL.....13
1.1 OBJETIVOS.....21
1.1.1 Objetivos Gerais.....21
1.1.2 Objetivos Específicos.....21
1.2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....22
2. CAPÍTULO II – ESTÁDIOS DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E LARVAL DO JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*) (SILURIFORMES, HEPTAPTERIDAE) INCUBADOS EM DIFERENTES REGIMES DE TEMPERATURA.....26
2.1 INTRODUÇÃO.....27
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....29
2.2.1 Desenho Experimental.....29
2.2.2 Amostragem e Estadiamento.....29
2.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura.....30
2.3 RESULTADOS.....31
2.3.1 Desenvolvimento Embrionário.....31
2.3.1.1 Período 1- Zigoto.....31
2.3.1.2 Período 2 – Clivagem.....32
2.3.1.3 Período 3 – Blástula.....32
2.3.1.4 Período 4 – Gástrula.....36
2.3.1.5 Período 5 – Segmentação.....37
2.3.1.6 Período 6 – Faríngula.....37
2.3.1.7 Período 7 – Eclosão.....37
2.3.2 Desenvolvimento Larval.....41
2.3.2.1 Período 8 – Larval.....41
2.3.3 Desenvolvimento Pós larval.....42
2.3.3.1 Período 9 – Pós Larval.....42
2.4 DISCUSSÃO.....43
2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....47

3. CAPÍTULO III – SOBREVIVÊNCIA, CRESCIMENTO E METABOLISMO DE EMBRIÕES E LARVAS DO JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*) (SILURIFORMES, HEPTAPTERIDAE) OBTIDAS EM DIFERENTES TEMPERATURAS DE INCUBAÇÃO 51
3.1 INTRODUÇÃO.....52
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....55
3.2.1 Obtenção doa Ovos.....55
3.2.2 Desenho Experimental.....55
3.2.3 Amostragem.....57
3.2.4 Avaliação de Malformações Anatômicas.....58
3.2.5 Determinação da Proporção RNA:DNA e da Concentração de Proteínas Totais.....59
3.2.6 Avaliação da Taxa de Crescimento Relativo.....61
3.2.7 Avaliação da Taxa de Crescimento Protéico Específico.....61
3.3 RESULTADOS.....62
3.3.1 Taxa de Sobrevivência e Síntese Protéica.....62
3.3.2 Malformações Anatômicas.....63
3.3.3 Taxa de Crescimento.....64
3.3.4 Frequência Cardíaca.....70
3.4 DISCUSSÃO.....72
3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÄFICAS.....76
4. CAPÍTULO IV – AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DAS LARVAS DO JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*) (SILURIFORMES, HEPTAPTERIDAE) OBTIDAS EM DIFERENTES TEMPERATURAS DE INCUBAÇÃO.....81
4.1 INTRODUÇÃO.....81
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....83
4.2.1 Obtenção dos Ovos.....83
4.2.2 Desenho Experimental.....83
4.2.3 Amostragem.....84
4.2.4 Morfometria das Fibras Musculares.....84
4.2.5 Composição Centesimal.....85
4.2.6 Estatística.....86

4.3 RESULTADOS.....87
4.3.1 Morfometria das Fibras Musculares.....87
4.3.2 Composição Centesimal.....89
4.4 DISCUSSÃO.....91
4.5 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS.....94
5. CAPITULO V - INFLUÊNCIA DO CÓRION E OBTENÇÃO DE UM PROTOCOLO PARA MELHOR FIXAÇÃO DE EMBRIÕES DE *Rhamdia quelen* PARA MISCROSCOPIA DE LUZ E ELETRÔNICA DE VARREDURA NAS CONDIÇÕES PADRÃO DE DESENVOLVIMENTO (25℃ ±1℃) 98
5.1 INTRODUÇÃO.....99
5.1.1 Apresentação.....99
5.1.2 Fixação.....100
5.1.3 Testes de Fixação para Embriões de Peixes.....101
5.1.4 Procedimento de Retirada do Córion dos Embriões de Peixes.....103
5.1.5 Lavagem e Desidratação.....104
5.1.6 Infiltração e Emblocagem em Historesina Plástica.....104
5.1.7 Infiltração e Emblocagem em Parafina e Paraplast.....108
5.1.8 Coloração.....109
5.1.9 Microscopia Eletrônica de Varredura.....111
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....114
6.1 CONCLUSÕES.....117
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....119
ANEXOS.....120

Capítulo I – INTRODUÇÃO GERAL

O crescente interesse no estudo do desenvolvimento de peixes reflete a demanda por informações científicas básicas nas mais diversas áreas afins à biologia e à saúde. O conhecimento do desenvolvimento inicial das espécies é instrumento importante tanto para estudos de biologia do desenvolvimento, quanto para investigações acerca da produção de pescado, toxicologia e ecologia de peixes. Além de instrumentalizar a pesquisa em biologia molecular em estudos envolvendo, por exemplo, diferenciação celular e expressão gênica (WOLPERT et al., 2000), o estudo das formas jovens de peixes fornece, ainda, informações técnicas ao setor produtivo, especialmente na piscicultura (SANCHES et al., 2001).

O estudo detalhado e não-invasivo do desenvolvimento embrionário é possível, uma vez que os ovos de peixes, em geral, podem ser obtidos em grande quantidade e possuem o córion transparente, permitindo que as divisões celulares e os movimentos dos tecidos sejam acompanhados visualmente em tempo real (WOLPERT et al., 2000; GONZÁLEZ-DONCEL et al., 2005).

No momento da fertilização – processo de fusão celular (OTHA,1991) – o espermatozóide dos peixes adentra o ovócito maduro através da micrópila, desencadeando uma série de eventos que culminam com a formação da célula ovo ou zigoto. Esta célula recém formada sofrerá diversas clivagens, que ocorrerão somente no blastodisco, uma região estreita de citoplasma sem vitelo localizada no pólo animal do ovo fertilizado (clivagem meroblástica) (GILBERT, 2006). A maior parte da célula ovo está cheia de vitelo, uma vez que os peixes apresentam ovo do tipo telolécito. Segue-se ao período de clivagem, uma intensa movimentação celular, marcando o período de gastrulação e a formação dos primórdios dos principais órgãos (GANECO, 2003).

Como o desenvolvimento do embrião ocorre somente no blastodisco, este tipo de segmentação meroblástica é chamada de discoidal, devido à forma assumida pela blástula resultante. A blástula dos peixes é uma meia esfera maciça, que não apresenta blastocele. Aproximadamente na décima divisão celular, o início da transição para blástula média se inicia a transcrição dos genes zigóticos, aumentando a síntese de RNA, as divisões celulares se tornam mais lentas, aumentando a duração do ciclo celular, e as células se tornam móveis (GILBERT, 2006). No período de gastrulação, ocorrem os movimentos morfogenéticos de epibolia, extensão convergente e involução resultando na formação dos folhetos germinativos (IWAMATSU, 2004; KIMMEL et al., 1995). A formação dos somitos e a

divisão do cérebro em compartimentos (neurômeros) caracterizaram o período de segmentação, marcando o início da organogênese. A seguir, o embrião se alonga e os rudimentos dos órgãos e sistemas tornam-se gradualmente evidentes (GILBERT, 2006).

Os estádios de desenvolvimento embrionário foram detalhadamente descritos para algumas espécies de peixes pertencentes a diferentes ordens e famílias, tais como *Cynopoecilus melanotaenia* (Cyprinodontiformes, Rivulidae; ARENZON et al., 2002); *Leporinus piau* (Characiformes, Anostomidae; BORÇATO et al., 2004); *Oryzias latipes* (Beloniformes, Adrianichthydae; IWAMATSU, 2004); *Puntius conchonius* (Cypriniformes, Cyprinidae; BHATTACHARYA et al., 2005); e *Osmerus eperlanus eperlanus* L. (Osmeriformes, Osmeridae; GORODILOV & MELNIKOVA, 2006).

O trabalho mais completo e usado como modelo de estudo do desenvolvimento embrionário de peixes é o estadiamento do desenvolvimento do Paulistinha ou Zebrafish (*Danio rerio*, Cypriniformes, Cyprinidae), descrito por Kimmel e colaboradores (1995). Para a descrição dos estádios, este estudo levou em consideração o número de blastômeros, forma da blastoderme, extensão da epibolia, desenvolvimento dos somitos e diversas características do desenvolvimento larval.

O zebrafish e inúmeros outros peixes teleósteos, podem ser manipulados de modo que os mutantes possam ser selecionados e propagados. Além disso, estes animais se desenvolvem rapidamente, de modo que cerca de 24 horas após a fecundação, o embrião forma a maioria de seus tecidos e primórdios dos órgãos (GILBERT, 2006) ou mesmo completam o desenvolvimento embrionário (RODRIGUES-GALDINO, 2006). Após a eclosão, estes passam por um período larval durante o qual continuam seu desenvolvimento às custas do vitelo armazenado. Após um processo de metamorfose que se estende ao período pós-larval, irão adquirir morfologia do adulto, porém, em menor tamanho e imaturos sexualmente e passando a ser chamados de juvenis (GILBERT, 2006).

Embora as técnicas de reprodução induzida já sejam suficientemente conhecidas, o mesmo não acontece na larvicultura, fase em que ainda ocorrem as maiores perdas do processo produtivo (LANDINES PARRA, 2003). Deste modo, a produção de juvenis em larga escala ainda constitui uma limitação na produção (MAI & ZANIBONI-FILHO, 2005). Além da importância para o segmento da piscicultura

engajado na produção de alimentos, progressos na produção de juvenis também podem contribuir para melhorar a oferta de peixes destinados aos programas de repovoamento, atenuando os impactos sobre os estoques naturais (HOLT, 1993).

Além da quantidade de organismos produzidos, é importante que as larvas apresentem potencial para originar adultos com características adequadas ao consumo. De acordo com Burrows (1969), para garantir a qualidade dos peixes adultos, os juvenis devem ter alta resistência, tamanho grande, elevadas reservas de proteína e energia e apresentar baixa incidência de doenças. A obtenção de juvenis com esta qualidade depende em parte das condições de incubação sendo, portanto, necessárias intensas pesquisas para aperfeiçoar o desenvolvimento dos peixes em cativeiro. No entanto, o estudo do desenvolvimento inicial de peixes ainda é bastante escasso na literatura, especialmente no que diz respeito a espécies brasileiras.

A temperatura é um fator crítico no desenvolvimento dos peixes. A temperatura da água durante a incubação é essencial para a qualidade dos embriões de peixes (SAKA et al., 2004), já que afeta intensamente seu desenvolvimento inicial (CLAIREAUX & LAGARDERE 1999; CONIDES & GLAMUZINA, 2002), alterando principalmente o metabolismo, o desenvolvimento normal de diversas estruturas do embrião (SAKA et al., 2004), a duração dos estádios ontogenéticos, o tamanho da larva durante a eclosão, a eficiência na utilização do vitelo (KAMLER, 1992), podendo, ainda, causar deformidades e alterações de gênero (WATANABE et al., 1995; OVERNELL, 1997; FUIMAN et al., 1998). Geralmente temperaturas mais baixas retardam os padrões de desenvolvimento nos peixes e temperaturas mais altas os aceleram (SAKA et al., 2004).

Na produção de peixes em larga escala, a economia geralmente exige que os espécimes cultivados atinjam o tamanho ideal no menor tempo possível. Sendo assim, são frequentemente utilizadas temperaturas elevadas para que o desenvolvimento inicial dos peixes seja acelerado (PETERSON et al., 2004). Entretanto, tanto Klimmogianni e colaboradores (2004), quanto Saka e colaboradores (2004) consideram a possibilidade da incubação em temperaturas mais altas provocar um maior número de malformações tanto no sistema cardíaco quanto nas regiões cefálica e caudal.

Lo (1985)[1] apud Tarifeño e colaboradores (2008) propôs que a taxa de desenvolvimento de peixes é uma função exponencial mista que depende da variação da temperatura e do estádio do desenvolvimento. A magnitude e natureza dos efeitos da temperatura dependem, assim, não somente das espécies, mas também do estádio de desenvolvimento, já que diferentes fases da vida dos peixes requerem, muitas vezes, diferentes temperaturas (HERZIG & WINKLER[2], apud KLIMOGIANNI et al., 2004). Observou-se que os efeitos da temperatura são mais pronunciados durante o crescimento larval que durante a embriogênese (KAMLER, 1992).

Os acontecimentos existentes durante o desenvolvimento embrionário e larval de espécies de peixes fornecem informações relevantes à otimização da cultura sob condições laboratoriais (ARENZON et al., 2002). O tamanho da larva eclodida e a eficiência no consumo do vitelo têm sido frequentemente utilizados como critério para se estimar uma faixa de temperatura ótima para a incubação de embriões de peixes (POLO et al., 1991). Seguindo essencialmente esses critérios morfométricos, muitos estudos foram desenvolvidos para se determinar a temperatura ótima para a incubação dos embriões de peixes, tais como: *Sparus aurata*, no qual a temperatura ótima de incubação é de 19±3^{o}C (POLO et al., 1991); para *Dicentrarchus labrax*, a faixa de temperatura ótima está entre 15 e 17º C (CONIDES & GLAMUZINA, 2002); para *Pagrus major*, entre 14,5 ºC e 25,6 ºC (MIHELAKAKIS & YOSHIMATSU, 1998); para *Dentex dentex* entre 16 e 18ºC (SAKA et al., 2004); para *Pagellus erythrinus* cerca de 18℃ (KLIMMOGIANNI et al., 2004); e para *Gadus morhua* a faixa ótima de temperatura de incubação se encontra entre 2 e 4ºC (PETERSON et al., 2004).

Das diversas Ordens de peixes criados comercialmente no mundo, os Siluriformes, representados pelos bagres ou peixes de couro, vêm apresentando destaque na piscicultura nacional. O jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard, 1824) (FIGURA 1) é um bagre que ocorre desde o centro da Argentina até o sudeste

---

[1] LO, N.H. A model for temperature-dependent Northern anchovy egg development and an automated procedure for the assignment of age to staged eggs. In: Lasker R (ed) An egg production method for estimating spawning biomass of pelagic fish: application to the Northern anchovy, Engraulis mordax. **NOAA, Technical Report**, v. 36, p.43–50,1985.

[2]HERZIG, A.; WINKLER, H. The influence of temperature on the embryonic development of three cyprinid fishes, *Abramis brama, Chalcalburnus chalcoides* and *Vimba vimba*. **Journal of Fish Biology**, v. 28, p. 171-181, 1986.

do México (SILFVERGRIP, 1996), sendo uma espécie nativa das Américas Central e Sul, adaptada a diferentes ambientes e que vem apresentando bons resultados em viveiros de piscicultura, principalmente no sul do Brasil. Nesta espécie pertencente à família Heptapteridae (FROESE & PAULY, 2007), destacam-se as seguintes características: a coloração do corpo variando de marrom avermelhado a cinza escuro, a existência de três pares de barbilhões, sendo um par maxilar que é maior que os outros dois pares de barbilhões mentonianos ou mandibulares (GOMES et al., 2000).

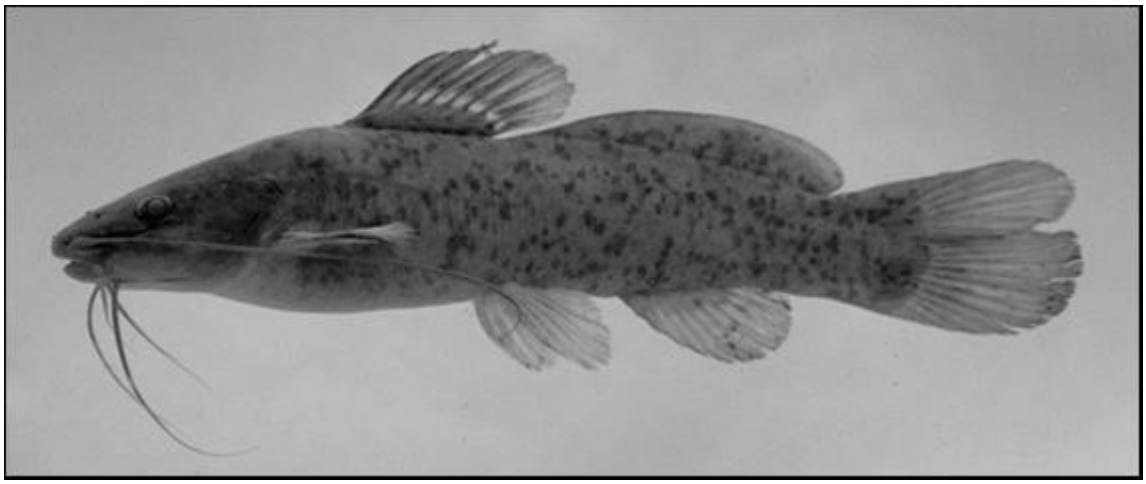


FIGURA 01 - EXEMPLAR ADULTO DE *Rhamdia quelen*
FONTE – Fonte: USGS (2006).

O crescimento do jundiá é maior nos primeiros anos de vida, sendo que os machos crescem mais rápido que as fêmeas até o terceiro ou quarto ano de vida, quando a situação se inverte (BALDISSEROTTO & RADÜNZ NETO, 2004). O tamanho máximo verificado para a espécie é de aproximadamente 66,5 cm de comprimento para as fêmeas e de 52 cm para os machos, segundo os mesmos autores.

Sobre a biologia da espécie, pode ser citado que estes animais vivem em lagos, poços fundos dos rios, águas calmas com fundo de areia e lama, próximo às margens e vegetação (BALDISSEROTTO & RADÜNZ NETO, 2004). As larvas alimentam-se de zooplâncton, mas apresentam variação ontogenética da dieta (BALDISSEROTTO & RADÜNZ NETO, 2004). Os representantes de adultos da espécie são onívoros e generalistas no ambiente natural, tendo preferência por peixes, crustáceos, insetos, restos vegetais e detritos orgânicos (CARNEIRO &

MIKOS, 2005; BALDISSEROTTO & RADÜNZ NETO, 2004). O hábito generalista é favorável à aceitação de ração, quando mantidos em cativeiro.

A espécie é ovulípara apresentando, desta maneira, fecundação e desenvolvimento externos (NAKATANI et al., 2001). A reprodução do jundiá apresenta ritmicidade interna, que é induzida por mudanças ambientais, como aumento da temperatura e do fotoperíodo. Os representantes da espécie se reproduzem a partir de aproximadamente um ano de idade, sendo que o período reprodutivo estende-se de agosto a março (BALDISSEROTTO & RADÜNZ NETO, 2004). Outra característica pertinente com relação à reprodução desta espécie é a desova assincrônica (parcelada), ou seja, os gametas são liberados em diversas ocasiões dentro do período reprodutivo (BALDISSEROTTO & RADÜNZ NETO, 2004).

De acordo com Gomes e colaboradores (2000), os estudos a respeito dos parâmetros físico-químicos da água e o crescimento no cativeiro são essenciais para melhorar o uso desta espécie na cultura de peixes. O jundiá possui uma ampla faixa de tolerância de pH na fase embrionária e larval (6,0 a 9,0) sendo que o pH 4,0 e o pH 5,0 são letais para ovos e larvas, respectivamente (FERREIRA et al., 2000). Entretanto, Zaions & Baldisserotto (2000) propõem que a faixa ideal de pH para um bom crescimento dos juvenis está entre 5,0 e 9,0.

A variabilidade de ambientes de distribuição do jundiá (*Rhamdia quelen*) sugere que seus embriões e larvas possam ser incubados com relativo sucesso em ampla faixa de temperaturas. Faz-se necessário, entretanto, estudos mais específicos, possibilitando o desenvolvimento de estratégias que possam reduzir as perdas na larvicultura e criando, desta forma, novas perspectivas para o cultivo intensivo desta espécie.

Como os juvenis de *Rhamdia quelen* apresentam uma tolerância significativa às variações de temperatura, são considerados euritérmicos (CHIPPARI-GOMES et al., 1999; 2000). A espécie tolera temperaturas entre 15 e 34^{o}C (CHIPPARI-GOMES et al., 1999), sobrevivendo durante invernos frios e crescendo rapidamente no verão (BARCELLOS et al., 2002). Vale ressaltar que a temperatura média da água no sul do Brasil, onde existe a cultura extensiva deste bagre, varia entre 15 e 30ºC (CHIPPARI-GOMES et al., 1999). Estas características contribuem para a ampla distribuição geográfica dessa espécie.

Esta espécie tem atraído a atenção de produtores e pesquisadores devido a várias características favoráveis a sua inclusão no rol de peixes criados comercialmente no Brasil (GOMES et al., 2000). É uma espécie que apresenta excelente aceitação pelo mercado consumidor, tanto para pesca esportiva quanto para consumo direto (CARNEIRO et al., 2003; BALDISSEROTTO et al., 2000). Dados empíricos obtidos através de piscicultores e confirmados por Luchini & Avendaño (1985) indicam que o jundiá é um peixe de rápido crescimento, com fácil adaptação à criação intensiva, rústico, facilmente induzido à reprodução, com altas taxas de fertilização e fecundação, apresentando carne saborosa com baixo teor de gordura e poucos ossos intramusculares.

A criação do jundiá vem crescendo de forma constante e acelerada nos últimos anos, demandando esforços dos grupos de pesquisa envolvidos em trabalhos científicos voltados ao conhecimento desta espécie e suas particularidades quando mantida em cativeiro. Podendo–se destacar estudos sobre reprodução e fisiologia reprodutiva (BARCELLOS et al., 2002), incubação (SILVA et al., 2003), larvicultura (LOPES et al., 2001; SILVA et al., 2003), alimentação (COLDEBELLA & RADÜNZ-NETO, 2002), respostas ao estresse (BARCELLOS et al., 2002, 2006), análises bioquímicas (VIEIRA et al., 2004), entre outros.

Estudos anteriores descreveram brevemente o desenvolvimento embrionário e larval do jundiá (NAKATANI et al., 2001, BALDISSEROTTO & RADÜNZ NETO, 2004, PEREIRA et al., 2006; RODRIGUES-GALDINO, 2006), porém, sem detalhes de todas as fases do desenvolvimento e com critérios muito diferentes do sistema modelo (zebrafish).

Sendo assim, o presente estudo visou realizar a descrição morfológica de todas as fases do desenvolvimento embrionário e larval do jundiá, segundo o sistema modelo, e avaliar o crescimento e a qualidade das larvas produzidas em diferentes regimes de temperatura. Ademais, as informações geradas neste estudo contribuíram para enriquecer o conhecimento sobre a biologia do desenvolvimento de peixes.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivos Gerais

Avaliar o crescimento e a qualidade das larvas eclodidas, bem como descrever as principais características morfológicas e a cronologia dos estádios do desenvolvimento embrionário e larval do jundiá (*Rhamdia quelen*), em diferentes temperaturas de incubação (18, 21, 24, 27 e 30^{o}C).

1.1.2 Objetivos Específicos

a. Descrever os estádios do desenvolvimento embrionário e larval do jundiá (*Rhamdia quelen*), em cinco regimes diferentes de temperaturas, baseado em critérios morfológicos.
b. Determinar a taxa de sobrevivência em cada estádio de desenvolvimento nas temperaturas testadas.
c. Avaliar a cronologia do desenvolvimento e o tempo de eclosão das larvas incubadas nas diferentes temperaturas testadas.
d. Avaliar a taxa metabólica dos organismos em desenvolvimento mantidos nos diferentes regimes de temperatura, através de medida indireta (taxa de batimentos cardíacos)
e. Verificar o efeito da temperatura na qualidade das larvas eclodidas através da avaliação do tamanho, composição química, celularidade celular e presença de malformações anatômicas.
f. Avaliar o efeito da temperatura na taxa de crescimento e na taxa de síntese protéica.
g. Verificar a influência do córion na fixação dos embriões e obter um protocolo para o melhor método de fixação para embriões da espécie nas condições padrão de desenvolvimento (25℃ ±1℃), tanto para microscopia de luz quanto para microscopia eletrônica de transmissão e varredura.

1.2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARENZON, A.; LEMOS, C.A.; BOHRER, M.B.C. The influence of temperature on the embryonic development of the annual fish *Cynopoecilus melanotaenia* (CYPRINODONTIFORMES, RIVULIDAE). *Brazilian Journal of Biology,* São Carlos, v. 62, n. 4b, p. 743-747, 2002.

BALDISSEROTTO, B.; RADÜNZ NETO, J. *Criação de jundiá*. Santa Maria: UFSM, 2004.

BALDISSEROTTO, B.; BRANDÃO, D. A.; RADÜNZ NETO, J. Jundiá. *Panorama da Aqüicultura*, v.10, p. 48-50, 2000.

BARCELLOS, L. J. G.; WASSERMANN, G. F.; SCOTT, A.P.; WOEHL, V.M; LUTHIER, F.; QUEVEDO, R. M.; ITTZÉS, I.; KRIEGER, M. H. Plasma steriods concentrations in relation reproductive cycle cultured male *Rhamdia quelen. Journal of fish Biology,* v.61, n.3, p.751-763, 2002.

BARCELLOS, L.J.G.; KREUTZ, L.C.; QUEVEDO, R. M.. Previus Crhonic stress does not alter the cortisol response to na additional acute stressor in jundiá *Rhamdia quelen (Quoy & Gaimard)*, fingerlings. *Aquaculture*, v.253,n.1-4, p. 317-321, 2006.

BHATTACHARYA, H.; ZHANG, S.C.; WANG, Y.J. Embryonic development of the rosy barb *Puntius conchonius* Hamilton 1822 (Cyprinidae). *Tropical Zoology,* Firenze, v.18, p. 25-37, 2005.

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, 2004.

BURROWS, R.E. The influence of fingerling quality on adult salmon survivals. *Trans. Am. Fish. Soc*., v. 98, p. 777-784, 1969.

CARNEIRO, P.C.F.; MIKOS, J.D.; BENDHACK, F. Processamento: O jundiá como matéria prima. *Panorama da Aqüicultura*, v.13, p.17-21, 2003.

CARNEIRO, P.C.F.; MIKOS, J.D. Freqüência alimentar e crescimento de alevinos de jundiá, *Rhamdia quelen*. *Ciência Rural,* v.35, n.1, p.187-191, 2005.

CHIPPARI-GOMES, A. R.; GOMES, L.C.; BALDISSEROTTO, B. Lethal temperatures for silver catfish *Rhamdia quelen, fingerlings.* Journal of *Applied Aquaculture*. v. 9, n.4, p.11-21, 1999.

CHIPPARI-GOMES, A. R.; GOMES, L.C.; BALDISSEROTTO, B. Lethal temperatures for *Rhamdia quelen* larvae (Pimelodidae). *Ciência Rural*, v. 9, p. 1069-1071, 2000.

CLAIREAUX, G. & LAGARDERE, J. P. Influence of temperature, oxygen and salinity on the metabolism of the European sea bass. *Journal of Sea Research,* v. 42, n. 2, p. 157-168, 1999.

COLDOBELLA, I.,J.; RADUNZ-NETO, J. Farelos de soja na alimentação de alevinos de jundiá *Rhamdia quelen. Ciência Rural*, v.32, p. 1069-1071, 2002.

CONIDES, A. & GLAMUZINA, B. Study on the effects of rearing density, temperature and salinity on hatching performance of the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture International*, v. 9, n. 3, p. 217-224, 2002.

FERREIRA, A.A.; NUNER, A.P.O.; ESQUIVEL, J. R. Influência da temperatura sobre os ovos e as larvas de jundiá *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae). Florianópolis, Anais do Simpósio Brasileiro de Aqüicultura, Sociedade Brasileira de Aqüicultura, 2000.

FROESE, R.; PAULY, D. (Eds.). FishBase. World Wide Web electronic publication 2007. Disponível em <http://www.fishbase.org>. Acesso em: 20/7/2008.

FUIMAN, L. A.; POLLING, K. R. & HIGGS, D. M. Quantifying developmental progress for comparative studies of larval fishes. *Copeia*, v. 1998, n. 3, p. 602-611, 1998.

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

GILBERT, S.F. Developmental Biology. 8 ed. Sinauer, 2006.

GOMES, L.C.; GOLOMBIESKI, J.I.; CHIPPARI GOMES, A.R.; BALDISSEROTTO, B. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (PISCES, PIMELODIDAE): uma revisão. *Ciência Rural*, v.30, n.1, p.179-185, 2000.

GONZÁLEZ-DONCEL, M., OKIHIRO, M. S.; VILLALOBOS, S. A.; HINTON D. E; TARAZONA J. V. A quick reference guide to the normal development of *Oryzias latipes* (Teleostei, Adrianichthyidae). *J. Appl. Ichthyol*. v.21, p.39–52, 2005.

GORODILOV, Y.N.; MELNIKOVA, E.L. Embryonic development of the European Smelt *Osmerus eperlanus eperlanus* (L.) (Neva Population). *Russian Journal of Marine Biology*, v. 32, n. 3, p. 173-185, 2006.

HERZIG, A.; WINKLER, H.. The influence of temperature on the embryonic development of three cyprinid fishes, *Abramis brama*, *Chalcalburnus chalcoides mento* and *Vimba vimba*. *J Fish Biol*, v.28, p.171–181, 1986.

HOLT, G. The potencial hole of larval fish culture in alleviating population and habitat losses. In: FUIMAN, L. (Ed.). Water quality and the early life stages of fishes**.** *American Fishery Society Simpimposium*, v. 14, p. 167-172. 1993.

IWAMATSU, T. Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*. *Mechanisms of Development*, v.121, p.605-618, 2004.

KAMLER, E. Early Life History of Fish: An Energetics Approach**.** London: Chapman & Hall. 1992. 288p.

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

KLIMOGIANNI, A. KOUMOUNDOUROS, G. KASPIRIS, Æ. P. KENTOURI, M. Effect of temperature on the egg and yolk-sac larval development of common Pandora, *Pagellus erythrinus*. *Marine Biology*, v. 145, n.5, p. 1015-1022, 2004.

LANDINES PARRA, M.A. Efeito da triiodotironina (T3) no desenvolvimento embrionário e no desenvolvimento de larvas de pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*), piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) e dourado (*Salminus maxillosus*). Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

LOPES, J.M.; SILVA, L.V.F.; BALDISSEROTTO, B. Survival and grown silver catfish larvae exposed to diferent water pH. *Aquaculture Internacional*, v.9, n.1, p.73-80, 2001.

LUCHINI, L.; AVENDAÑO, T. Primeros resultados de cultivo de un pez de augas calidas (Rhamdia sapo) con fines de producion y consumo humano. *Revista Argentina de Produção Animal*, v.4, p.621-629, 1985.

MAI, M.G.; ZANIBONI-FILHO, E. Efeito da idade de estocagem em tanques externos no desempenho da larvicultura do dourado *Salminus brasiliensis* (Osteichthyes, Characidae). *Acta Scientiarum Animal Sciences*, Maringá, v. 27, n.2, p. 287-296, 2005.

MIHELAKAKIS, A. & YOSHIMATSU, T. Effects of salinity and temperature on incubation period, hatching rate and morphogenesis of the red sea bream. *Aquaculture International*, v. 6, n. 2, p. 171-177, mar. 1998.

NAKATANI, K.; AGOSTINHO, A.A; BAUMGARTNER, G.; BIALETZKI, A.; SANCHES, P.V.; MAKRAKIS, M.C.; PAVANELLI, C.S. *Ovos e larvas de água doce: Desenvolvimento e manual de identificação*. Maringá: EDUEM, 2001.

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

OVERNELL, J. Temperature and efficiency of development during endogenous feeding in herring embryos and yolk-sac larvae. *Journal of Fish Biology*, v. 50, n. 2, p. 358-365, 1997.

PEREIRA, C.R.; BARCELLOS, L.J.G.; KREUTZ, L.C.; QUEVEDO, R.M.; RITTER, F.; SILVA, L.B. Embryonic and Larval Development of Jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard, 1824, Pisces, Teleostei), a South American Catfish. *Brazilian Journal of Biology*, v.66, n. 4, p. 1057-1063, 2006.

PETERSON R.H., SPINNEY H.C.E. & A. SREEDHARAN. Development of Atlantic salmon (*Salmo salar*) eggs and alevins under varied temperature regimes. *J. Fish Res. Bd Can.*,v. 4, p.31-43, 2004.

POLO, A.; YUFERA, M. & PASCUAL, E. Effects of temperature on egg and larval development of *Sparus aurata* L**.** *Aquaculture*, v. 92, p. 367-375, 1991.

RODRIGUES-GALDINO, A.M. Descrição do Desenvolvimento Embrionário e Larval do Jundiá (*Rhamdia quelen*). Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas) Universidade Federal do Paraná, 2006.

SAKA, Ş., FIRAT, K & ÇOBAN, D. Development of the common dentex (*Dentex dentex*) eggs in relation to temperature. *Aquaculture Research*, v. 35, n. 3, p. 224-231, 2004.

SANCHES, P.V.; BAUMGARTNER, G.; BIALETZKI, A.; et al. Caracterização do desenvolvimento inicial de *Leporinus friderici* (Osteichthyes, Anostomidae) da bacia do rio Paraná, Brasil. *Acta Scientiarum*, Maringá, v. 23, n. 2, p. 383-389, 2001.

SILFVERGRIP, A. M. C. A sistematic revision of the neotropical catfish genus Rhamdia. Department of Zoology, Stockholm and Department of Vertebrate Zoology. Swedish Museum of the Natural History. Stockholm. 156p, 1996.

SILVA, J. A. M.; PEREIRA-FILHO, M.; OLIVEIRA-PEREIRA, M. I. Valor nutricional e energético de espécies vegetais importantes na alimentação do Tambaqui. *Acta Amazônica*, Manaus, v. 33, n. 4, p. 687-700, 2003.

SILVA, L.V.F. MORFOLOGIA, MORFOMETRIA, DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS MUCOSAS E DE CLORETO EM EMBRIÕES E LARVAS DE JUNDIÁ *Rhamdia quelen* (Heptapteridae). Efeito do pH e concentrações de calico e magnésio na água. São Carlos, 130f. Tese. (Doutorado em Ciências). Universidade Federal de São Carlos –SP, 2006.

TARIFEÑO, E.; CARMONA, M.; LLANOS-RIVERA, A.; CASTRO, L. R. Temperature effects on the anchoveta *Engraulis ringens* egg development: do latitudinal differences occur? *Environment Biology Fish* v. 81, p. 387–395, 2008.

USGS (2006) U.S. Geological Survey. Disponível em: http://www.nas.er.usgs.gov/.../FactSheet.asp?speciesID=839. Acesso em: 22 nov. 2006

VIEIRA, V.P.; MORSH, V.M.; LERMEN, C.L.; CISMOSKI, A.S.; TABALDI, L.A.; SCHETINGER, C.M.R. ATP and ADP hydrolysis in the kidney and liver of fish, chickens and rats. *Comparative biochemistry and Physiology*, v.139B, p.713-720, 2004.

WATANABE, W. O. Hatchery study of the effects of temperature on eggs and yolksac larvae of the Nassau grouper *Epinephelus striatus*. *Aquaculture*, v. 136, n. 1/2, p. 141-147,1995.

WOLPERT, L.; BEDDINGTON, R.; BROCKES, J.; JESSEL, T.; LAWRWNCE, P.; MEYEROWITZ, E. *Princípios de Biologia do Desenvolvimento*. Porto Alegre: Artmed, 484p, 2000.

ZAIONS, M.I.; BALDISSEROTTO. Níveis corporais de Na e K e sobrevivência de alevinos de *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Pimelodidae) submetidas as variações agudas de pH da água. *Ciência Rural*, v. 30, p.1041-1045, 2000.

Capítulo II – ESTÁDIOS DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E LARVAL DO JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*) (SILURIFORMES, HEPTAPTERIDAE), INCUBADOS EM DIFERENTES REGIMES DE TEMPERATURA[3]

[3] O conteúdo desse artigo é parte integrante do artigo Rodrigues-Galdino, A.M.; Maiolino, C.V.; Forgati, M.; Donatti, L.; Mikos, J.D.; Carneiro, P. C. F.; Rios, F. S. Embryonic and larval development of the Neotropical catfish *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) incubated in different temperature regimes. **Zygote** (Cambridge) (*in press*), cuja cópia se encontra em anexo.

2.1 INTRODUÇÃO

A descrição dos estádios embrionários das espécies de peixes pode ser útil na identificação taxonômica dos embriões em ambientes naturais. Estas informações são importantes em estudos conservacionistas e ecológicos, uma vez que os locais de desova podem ser corretamente reconhecidos (ALVES & MOURA, 1992). Além disso, a larvicultura pode ser otimizada a partir de dados científicos referentes às melhores condições ambientais para a incubação (ALVES & MOURA, 1992).

O crescimento rápido é típico da história de vida inicial dos peixes, sendo que as condições ótimas para o desenvolvimento embrionário e larval variam entre as diferentes espécies. A temperatura é um fator crítico na determinação da taxa de crescimento, pois pode alterar o tempo de desenvolvimento, o tamanho durante a eclosão, a eficiência na utilização do vitelo e na formação de estruturas e tecidos fundamentais (KAMLER, 1992; SAKA et al., 2004; GABILLARD et al., 2005). Altas temperaturas podem apresentar efeitos teratogênicos ou provocar alterações da celularidade muscular (FINN, 2007).

O jundiá (*Rhamdia quelen*) é uma espécie de peixe euritérmica, nativa da América do Sul e Central, que tolera temperaturas de 15 a 34ºC (CHIPPARI-GOMES et al., 1999), capaz de sobreviver a invernos rigorosos e crescer rapidamente durante o verão (BARCELLOS et al., 2002). Estudos realizados nos últimos anos com esta espécie apontam seu grande potencial para a aqüicultura (CARNEIRO et al., 2003), havendo crescente interesse tanto na pesquisa quanto no setor produtivo.

O desenvolvimento inicial do jundiá foi descrito anteriormente, porém apenas de forma resumida (GODINHO et al., 1978; PEREIRA et al., 2006), sendo que o estadiamento desta espécie ainda permanece incompleto, prejudicando a padronização e precisão dos estudos sobre o desenvolvimento da mesma (FUJIMURA & OKADA, 2007).

O estadiamento permite uma comparação dos processos que ocorrem durante o desenvolvimento entre as espécies-modelo e espécies correlatas, revelando mecanismos que delineiam as alterações evolutivas entre estas (FUJIMURA & OKADA, 2007).

A produção comercial de Siluriformes (bagres) vem crescendo no mundo inteiro; no entanto, os estudos sobre a biologia do desenvolvimento de bagres brasileiros ainda são incipientes (GODINHO et al., 1978; LUZ & ZANIBONI FILHO, 2002; LUZ et al., 2001; PEREIRA et al., 2006). A temperatura da água no Sul do Brasil, onde o jundiá é cultivado mais intensamente, varia de 15 e 30ºC (CHIPPARI-GOMES et al., 1999). Segundo Gomes e colaboradores (2000), estudos relacionados aos parâmetros físico-químicos da água e o crescimento em cativeiro são essenciais para a melhoria da utilização desta espécie na piscicultura.

O presente estudo investigou o desenvolvimento embrionário e larval do jundiá incubados em diferentes temperaturas e propôs um sistema de estadiamento desta espécie através de critérios morfológicos.

2.2 MATERIAIS & MÉTODOS

2.2.1 Desenho Experimental

Jundiás machos e fêmeas, sexualmente maduros, foram induzidos a se reproduzir através de hipofisação. Para cada uma das temperaturas experimentais (21ºC, 24ºC, 27ºC e 30ºC) foram utilizadas seis incubadoras de 1,3L cada, mantidas em tanques de 100L. O oxigênio dissolvido foi monitorado por um oxímetro YSI – 55 (Hexis) e mantido entre 6 e 7 mg/L através de aeração. Os embriões foram gradualmente adaptados a cada uma das temperaturas experimentais. Foram mantidos aproximadamente três mil embriões provenientes de um mesmo lote em cada uma das incubadoras.

2.2.2 Amostragem e Estadiamento

Em cada tratamento, os embriões foram amostrados a cada trinta minutos durante as primeiras dezenove horas e, na seqüência, em intervalos de uma hora até que todas as larvas viáveis, incubadas nas diferentes temperaturas, tivessem eclodido. As larvas foram amostradas a cada doze horas até a completa absorção do vitelo. No final do período larval, as pós-larvas foram transferidas para tanques externos de concreto e alimentadas com zooplâncton. Pós-larvas com sete e vinte e um dias foram também amostradas e fixadas. As amostras de cada uma das incubadoras foram pipetadas cuidadosamente em lâminas escavadas e, em seguida, fotomicrografias dos organimos vivos foram adquiridas através de uma câmera Sony Cyber Shot acoplada a um microscópio de luz Quimis. Os estádios do desenvolvimento foram determinados utilizando os critérios de Kimmel et al. (1995). Os embriões não foram descorionizados, sendo as descrições baseadas nos indivíduos intactos. A idade dos indivíduos foi marcada em horas pós fertilização (hpf) ou dias pós fertilização (dpf).

2.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

Após fixação em Karnovsky (paraformaldeído 2%, glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7.2 a 4ºC), os embriões e larvas foram lavados no mesmo tampão, descorionizados manualmente utilizando agulhas de acupuntura e desidratados em série alcoólica crescente. As amostras foram submetidas ao ponto crítico de secagem, com $CO_{2,}$ em um Balzers® CPD – 010, metalizadas com ouro em um Balzers® SCD – 030, e analisadas em um microscópio eletrônico de varredura JEOL®-JSM 6360 LV, do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

2.3 RESULTADOS

O desenvolvimento embrionário do jundiá se inicia com a fertilização e se encerra com a eclosão do córion (estádios 1-25; TABELA 1). O desenvolvimento embrionário foi subdividido em sete períodos: zigoto, clivagem, blástula, gástrula, segmentação, faríngula e eclosão. O desenvolvimento larval foi subdividido em três períodos: larva inicial, larva média e larva tardia (estádios 26-28), sendo estes caracterizados pela presença da vesícula vitelina. Subsequentemente, após o consumo de todo o vitelo, os organismos foram considerados pós-larvas (estádio 29).

Os embriões de jundiá apresentaram uma relação negativa entre o tempo de desenvolvimento e a temperatura de incubação (TABELA 1). Dessa forma, a 30ºC, as larvas eclodiram após dezenove horas de incubação, enquanto que levaram quarenta e três horas para eclodirem a 21ºC. A duração de cada período variou com cada temperatura experimental. A 21ºC, a duração dos períodos de segmentação e faríngula foram muito maiores que nas temperaturas mais altas.

A TABELA 1 sumariza as principais características do desenvolvimento do jundiá. Os caracteres morfológicos principais de cada estádio foram padronizados a despeito da temperatura, conforme descrito a seguir.

2.3.1 Desenvolvimento Embrionário

2.3.1.1 Período 1: Zigoto:

Um distinto espaço perivitelínico emerge ao redor do ovo fertilizado devido à separação do córion da membrana plasmática, formando a membrana de fertilização. O citoplasma se separa do vitelo e se acumula no pólo animal, formando o citoplasma ativo (blastodisco) (FIGURA 02).

2.3.1.2 Período 2 – Clivagem:

O período de clivagem consiste em seis etapas (estádios 2-7, FIGURA 03). Este período foi caracterizado por uma série de divisões mitóticas no citoplasma ativo (clivagens meroblásticas) que resultam em sessenta e quatro blastômeros. Após cada clivagem, os blastômeros diminuem em tamanho.

2.3.1.3 Período 3 – Blástula:

O período de blástula consiste de quatro estádios (estádios 8-11). A blástula inicial (estádio 8) foi caracterizada pela blastoderme de 128 a 256 células, formando uma meia-esfera elevada a partir da célula vitelina. A blástula média (estádio 9) apresenta de 512 a alguns milhares de blastômeros, uma camada envelope externa (EVL) e uma camada sincicial de vitelo (YSL). A YSL é uma camada sincicial localizada na intersecção do vitelo com a blastoderme, sendo perceptível em microscopia de luz, como uma região escura. As margens da blastoderme são bastante irregulares (FIGURA 04A-B). Na blástula tardia (estádio 10), a blastoderme se achata devido à intercalação entre os blastômeros, formando, assim, uma massa uniforme compacta (FIGURA 04C). Ao final deste período, a blastoderme se torna bastante achatada e se inicia o movimento morfogenético conhecidos como epibolia. Durante o estádio 11, as margens da blastoderme chegam a cobrir 30% da célula vitelina (FIGURA 04D).

TABELA 01. PERÍODOS E ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DE *Rhamdia quelen* INCUBADOS A 21℃, 24℃, 27℃ E 30℃.

Período	Estádio	hpf 21°C	hpf 24°C	hpf 27°C	hpf 30°C	Descrição
Embrião						
Zigoto	**1**	0:00	0:00	0:00	0:00	**1 célula** – Citoplasma ativo se desloca em direção ao pólo animal e formaçõa da membrana de fertilização
Clivagem	**2**	0:40	0:40	*	*	**2 células** – Clivagem meroblástica
	3	1:00	1:00	1:00	*	**4 células**– matriz de 2 x 2 blastômeros
	4	1:30	1:15	1:10	1:00	**8 células** – matriz de 2 x 4 blastômeros
	5	2:00	1:30	1:20	1:10	**16 células** – matriz de 4 x 4 blastômeros
	6	2:20	1:40	1:30	1:20	**32 células** – matriz de 4 x 8 blastômeros, células começam a compactar
	7	2:40	1:50	1:45	1:30	**64 células** – 2 camadas de 32 blastômeros, formas YSL
Blástula	**8**	3:00	2:00	2:00	1:45	**Blástula inicial** - 128-256 blastômeros, formando uma semi-esfera
	9	4:00	3:00	2:30	2:00	**Blástula média** – 512 ou mais blastômeros
	10	5:00	4:00	3:00	2:30	**Blástula tardia** – Achatamento do blastodisco
	11	5:30	5:00	4:45	4:00	**30% Epibolia** - Blastoderma altamente achatado com espessura uniforme; margem chega a 30% da distância entre os pólos animal e vegetal
Gástrula	**12**	6:00	6:00	5h15	5:00	**50% Epibolia** – Margens do blastoderma atingem 50% da distância entre os pólos animal e vegetal; anel germinativo e, posteriormente, o escudo embrionário é visível
	13	9:30	6:30	6:00	5:30	**75% Epibolia** – Blastoderma envolve 75-80% do embrião, lado dorsal é mais espesso
	14	10:00	7:30	7:00	6:00	**Tampão de vitelo** –Tampão de vitelo no pólo vegetal (blatóporo)
	15	11:00	9:00	8:00	7:00	**Nêurula** - Blastoderma cobre totalmente o tampão de vitelo, fechando o blastóporo; sulco neural visível; embrião torna-se elíptico
Segmentação	**16**	11:30	9:30	8:30	7:30	**Somitos 2-3** - Os primeiros pares de somitos e a vesícula óptica são visíveis
	17	15:00	11:15	9:00	8:00	**6 somitos** – Neurômeros cerebrais, vesículas ópticas, as narinas (órgão olfativo primordial), e notocorda visíveis
	18	15:30	12:00	10:00	8:30	**10 somitos -** Vesícula de Kupfer e formação da placa ótica. Vesícula óptica mais evidente.
	19	16:30	13:00	11:00	9:00	**14 somitos** – Mesencéfalo ligeiramente proeminente, lentes ópticas, início da formação da extensão de vitelo.

	20	17:30	14:00	11:30	10:30	**18 somitos** – Vesícula ótica, pelo menos 3 neurômeros no rombencéfalo, broto da cauda começa a projetar-se, primeiras contrações musculares
	21	20:30	15:30	15:00	12:30	**25 somitos** – somitos (miômeros) em “forma de V”, flexões laterais do corpo, cauda e extensão de vitelo alongadas, otólitos na vesícula ótica, aorta dorsal visível, vesícula de Kupfer desapareceu
Faríngula	**22**	26:00	17:00	16:00	14:30	**Faríngula inicial**- ~ 30 miômeros, motilidade intensa (embrião em rotação no interior do córion), desenvolvimento do intestino anterior (mas a boca e o ânus permanecem fechados), cavidade pericárdica visível, mesencéfalo dividido em dois hemisférios
	23	40:00	19:00	18:00	16:00	**Faríngula média** – batimentos cardíacos (65-69 bpm), circulação fraca, intestino médio visível, extensão de vitelo desapareceu, nadadeira embrionária (dorsal contínua com caudal e anal)
	24	41:00	21:00	19:00	18:00	**Faríngula tardia** – Circulação aferente e eferente mais intensas (~ 80 bpm), ~ 40 miômeros, embriões dobrados (1/2 tronco) no interior do córion; córion se deforma com os movimentos do embrião, as aberturas correspondentes à boca e opérculo são visíveis, intestino posterior visível
Eclosão	**25**	43:00	26:00	20:00	19:00	**Eclosão** - motilidade baixa pouco antes da eclosão, ~ 100 bpm, sem pigmentação.
Larva	**26**	*	36:00	*	*	**Larva inicial** – Olhos pigmentados, a boca é uma abertura elíptica, primórdios dos barbilhões (3 pares), poro anal e opérculos abertos, bolsas faríngeas começam a desenvolver, neuromastos (estruturas da linha lateral) presentes no tronco e ns região cefálica.
	27	*	66:00	*	*	**Larva média** - Corpo torna-se pigmentado, barbilhões com pequenas e numerosas protuberâncias (botões gustativos), barbilhões maxilarer maiores que os mentonianos, lábios inferior e superior tornam-se definidos
	28	*	90:00	*	*	**Larva tardia** – Barbilhões bem desenvolvidos, botões gustativos nos barbilhões e lábios, maxilar projetado, narinas profundas com células ciliadas, saco vitelino muito reduzido, bexiga natatória inflada, início da alimentação exógena
Pós-larva	**29**	*	7 dpf	*	*	Saco vitelino ausente, barbilhões e nadadeiras bem desenvolvidas.
Juvenil	**30**	*	21 dpf	*	*	Aspecto semelhante ao adulto, poros do sistema de linha lateral

NOTA: *hpf = horas após a fertilização em; dpf = dias após a fertilização; YSL = camada sincicial de vitelo; *= não analisado.*

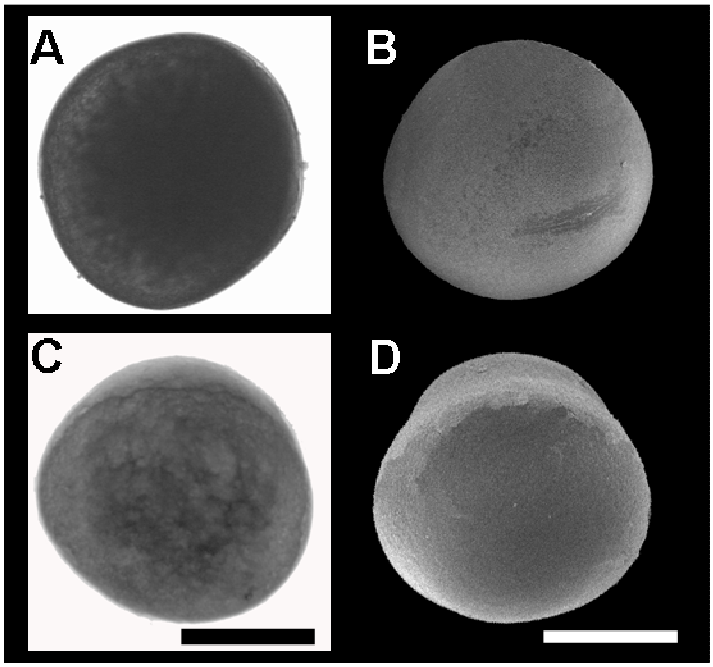


FIGURA 02. PERÍODO DE ZIGOTO DE *Rhamdia quelen*.
LEGENDA: (A-B) imediatamente após a fertilização. (C-D) deslocamento do citoplasma e acúmulo no pólo animal, formando blastodisco (estádio 1). A e C são imagens embriões fixados e observados sob microscópio de luz, e B e C são imagens de microscopia eletrônica de varredura. Escala: 500 μm

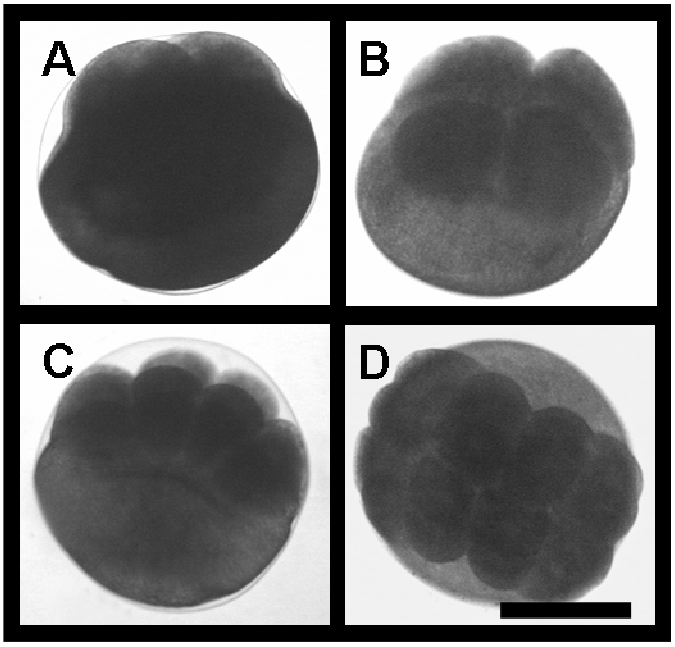


FIGURA 03. PERÍODO DE CLIVAGEM DE *Rhamdia quelen*.
LEGENDA: Embriões fixados e observados sob microscópio de luz, com: (A) dois (estádio 2), (B) quatro (estádio 3), (C) oito (estádio 4) e (D) dezesseis blastômeros (estádio 5). Escala: 500 μm

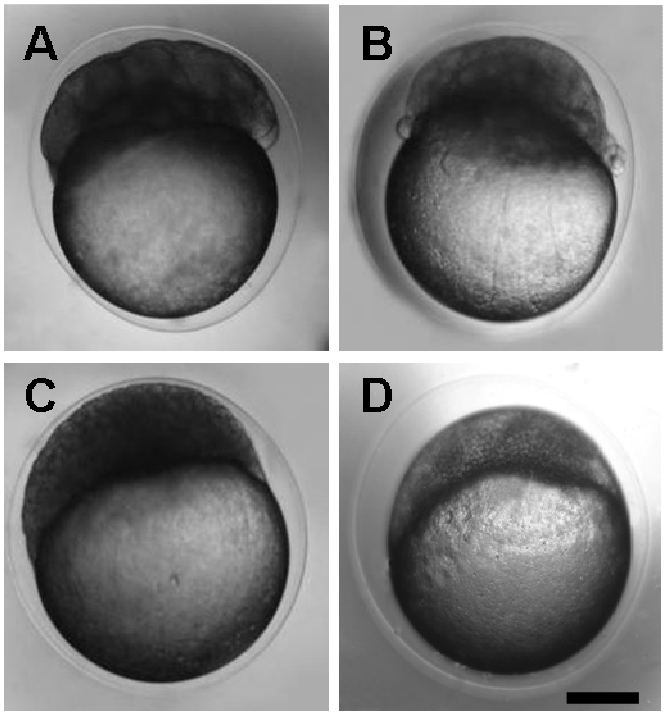


FIGURA 04. PERÍODO DA BLÁSTULA DE *Rhamdia quelen*.
LEGENDA: Análise de embriões vivos sob microscópio de luz. (A) blástula inicial (estádio 8), (B) blástula média (estádio 9); (C) blástula final (estádio 10) e (D) 30% epibolia (estádio 11). Escala:200 μm

2.3.1.4 Período 4 - Gástrula:

O período de gástrula composto de quatro fases (estádios 12-15). O estádio 12 é caracterizado por 50% de epibolia (FIGURA 05A) e pela presença do anel germinativo ao redor da margem do blastoderma (FIGURA 05C-05D). O anel germinativo é formado pela superposição epiblasto e hipoblasto. Posteriormente, o escudo embrionário é formado pelo espessamento do anel germinativo, no futuro lado dorsal do embrião. O escudo parte do anel germinativo em direção ao pólo animal. Com o avanço da epibolia, a blastoderme gradualmente cobre a célula vitelina (FIGURA 05E-05H). Durante o estádio de nêurula (estádio 15, FIGURA 05I-05J) a blastoderme recobre totalmente o tampão vitelino, fechando o blastóporo. O sulco neural é visível e o embrião torna-se elíptico.

2.3.1.5 Período 5 - Segmentação:

O período de segmentação consiste em seis fases (estádios 16-21, FIGURA 06). A formação dos somitos, o início da organogênese e a compartimentalização do cérebro caracteriza este período. A segmentação mesodérmica começa a formar os somitos. Paralelamente à formação do terceiro par de somitos, as vesículas ópticas tornam-se visíveis. A vesícula de Kupfer, estrutura relacionada a padronização lateral, aparece e desaparece durante este período. O broto da cauda começa a sobressair e a extensão de vitelo é formada. As primeiras contrações musculares ocorrem no estádio 20 (dezoito somitos). A partir dos somitos, desenvolvem-se miótomos em forma de V (FIGURA 07), que permitem flexões laterais do corpo do embrião no estádio 21 (vinte e cinco somitos).

2.3.1.6 Período 6 - Faríngula:

O período faríngula consiste em três fases (estádios 22-24, FIGURA 08). A faríngula inicial (estádio 22) tem cerca de trinta miótomos e apresenta motilidade intensa (FIGURA 08A). Durante este período, o corpo do embrião se alonga e a faríngula tardia (estádio 24) apresenta cerca de quarenta miótomos, necessitando se dobrar no interior do córion. A circulação do sangue se inicia durante este período. Uma circulação fraca é visível através do corpo translúcido do embrião no estádio 23, tornando-se mais intensa no estádio 24. A cavidade pericárdica é visível no estádio 22 e os primeiros batimentos cardíacos ocorrem na faríngula média (estádio 23). Estruturas importantes como a nadadeira primordial (nadadeira embrionária), intestino, e as aberturas relacionadas à boca e ao opérculo se tornam visíveis neste período. Um par de otólitos também aparece como pequenos grânulos situados na superfície interna de cada otocisto. O sangue circula nas três veias vitelínicas. O período de faríngula apresentou maior variação entre as temperaturas, com duração de 17h a 21℃ e 30℃ apenas 4.5h (TABELA 01).

2.3.1.7 Período 7 - Eclosão:

O período de eclosão apresenta um único estádio (estádio 25). O período de eclosão se caracteriza pela baixa mobilidade pouco antes da saída das larvas de

dentro do córion. O coração chega a cem bpm. No momento da eclosão, as larvas não apresentam qualquer pigmentação. A velocidade de desenvolvimento foi inversamente proporcional à temperatura. Em média, as larvas eclodiram após 19h de incubação a 30℃, após 20h a 27℃, após 26h a 24 ℃ e após 43h a 21℃ (TABELA 01).

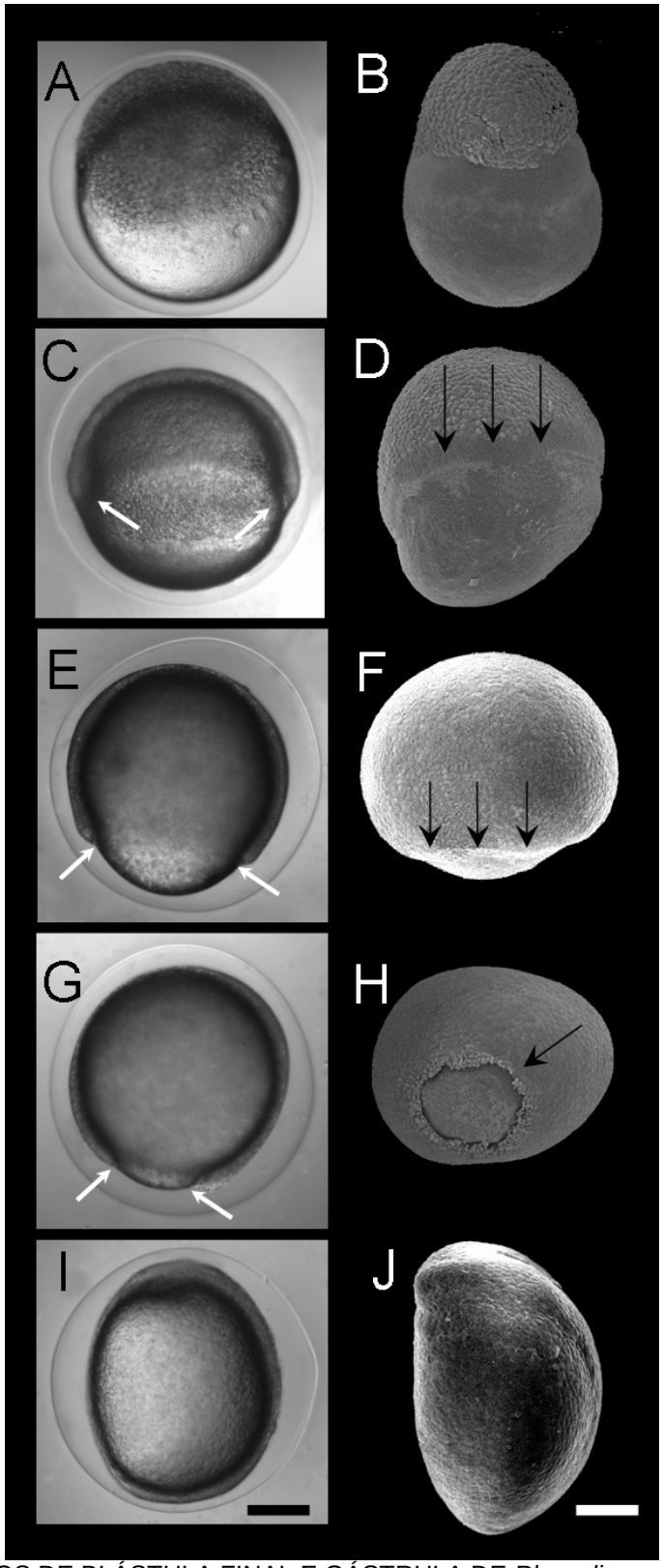


FIGURA 05**.** PERÍODOS DE BLÁSTULA FINAL E GÁSTRULA DE *Rhamdia quelen*.
LEGENDA: (A) 50% epibolia (estádio 12) (B) blástula tardia (estádio 10); (C) 50% epibolia com formação de anel germinativo (estádio 12); (D) 50% de epibolia (estádio 12); (EF) 75 % de epibolia (estádio 13); (GH) tampão de vitelo (90% de epibolia, estádio 14) e (IJ) estádio de nêurula (estádio 15). Embriões da coluna da esquerda foram analisados vivos sob microscopia de luz, enquanto que os embriões da coluna da direita foram analisados sob microscopia eletrônica de varredura. Todos os embriões estão em vista lateral, exceto (H), que está em vista do pólo vegetal. Setas indicam limite das células em epibolia. Escala: 200 µm

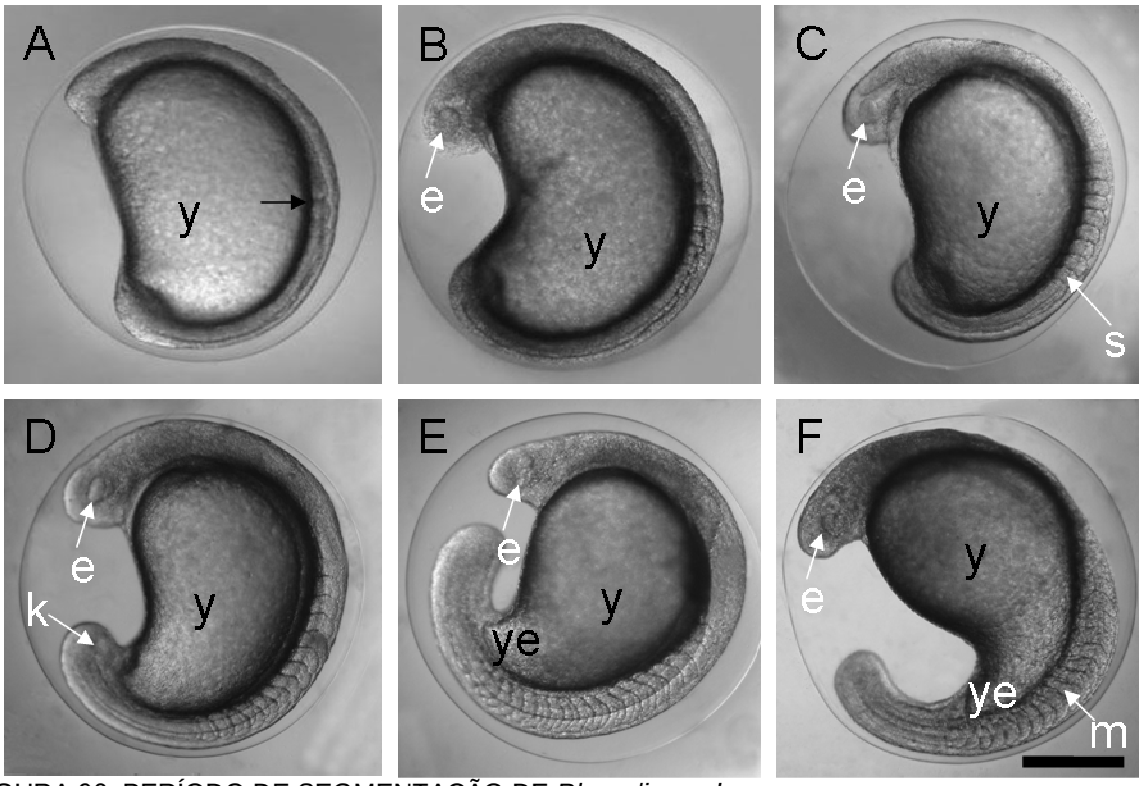


FIGURA 06**.** PERÍODO DE SEGMENTAÇÃO DE *Rhamdia quelen*.
LEGENDA: Análise de embriões vivos com: (A) 2-3 somitos (estádio 16) (B) 6 somitos (estádio 17); (C) 10 somitos (estádio 18); (D) 14 somitos (estádio 19); (E) 18 somitos (estádio 20); (F) 25 somitos (estádio 21). Símbolos: e = olho, k = vesícula de kupfer, m = miômeros, s = somito, y = vitelo, ye = extensão de vitelo. Escala: 200 μm.

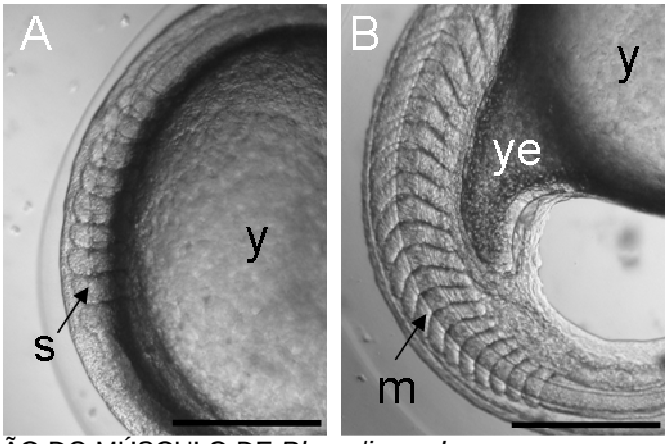


FIGURA 07. FORMAÇÃO DO MÚSCULO DE *Rhamdia quelen*.
LEGENDA: (A) análise de embriões vivos com 10 somitos (estádio 18) e (B) 25 somitos (estádio 21). Símbolos: m = miômeros, s = somito, y = vitelo, ye = extensão de vitelo. Escala: 100 μm.

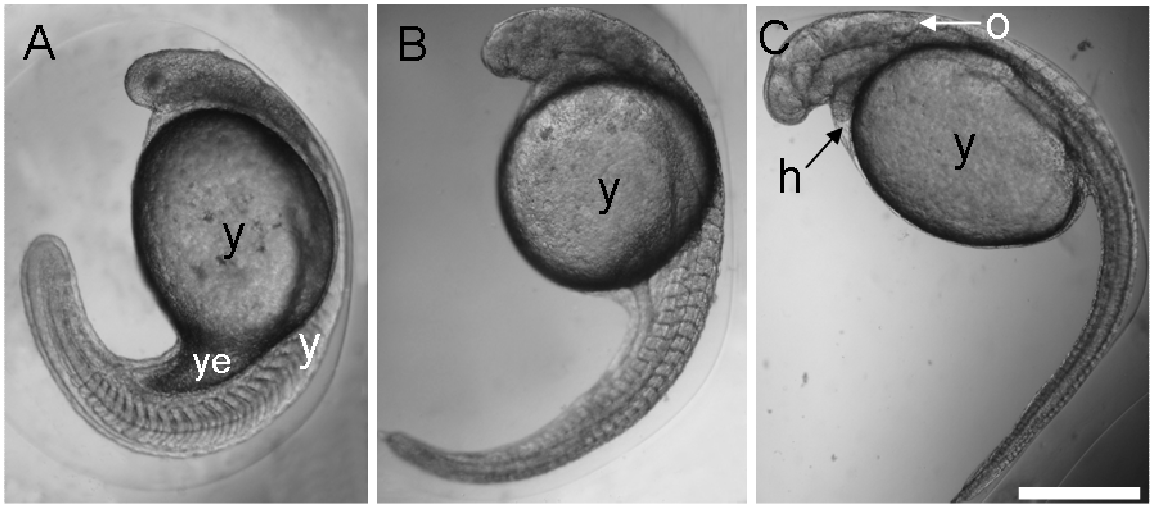


FIGURA 08. PERÍODO DE FARÍNGULA DE *Rhamdia quelen*.
LEGENDA: Embriões vivos nos estádios: (A) faríngula inicial (estádio 22); (B) faríngula média (estádio 23); (C) faríngula tardia (estádio 24). Símbolos: h = coração (cavidade pericárdica), o = placa ótica, y = vitelo, ye = extensão de vitelo. Escala: 500 μm

2.3.2 Desenvolvimento Larval

2.3.2.1 Período 8 - Larval:

O período larval foi dividido em três fases (estádios 26-28, FIGURA 09). O desenvolvimento larval se inicia após a eclosão e termina com a completa absorção do vitelo. A célula vitelina é muito reduzida no estádio 28. Os olhos se tornaram pigmentados na larva inicial (estádio 26), mas o corpo se torna pigmentado na larva média (estádio 27). A boca é uma abertura elíptica e três pares de barbilhões crescem em torno dela na larva inicial. Os lábios inferior e superior se desenvolvem e a mandíbula se projeta nas larvas médias. Entre os estádios 27 e 28, as larvas inflam a bexiga natatória e iniciam a alimentação exógena.

2.3.3 Desenvolvimento Pós-Larval

2.3.3.1 Período 9 – Pós Larval:

Este período é caracterizado pela ausência da vesícula vitelina, embora o organismo ainda apresente uma nadadeira embrionária. É o principal período de metamorfose, processo pelo qual o peixe adquire as formas semelhantes ao indivíduo adulto, embora seja sexualmente imaturo e de tamanho muito reduzido (período
Juvenil).

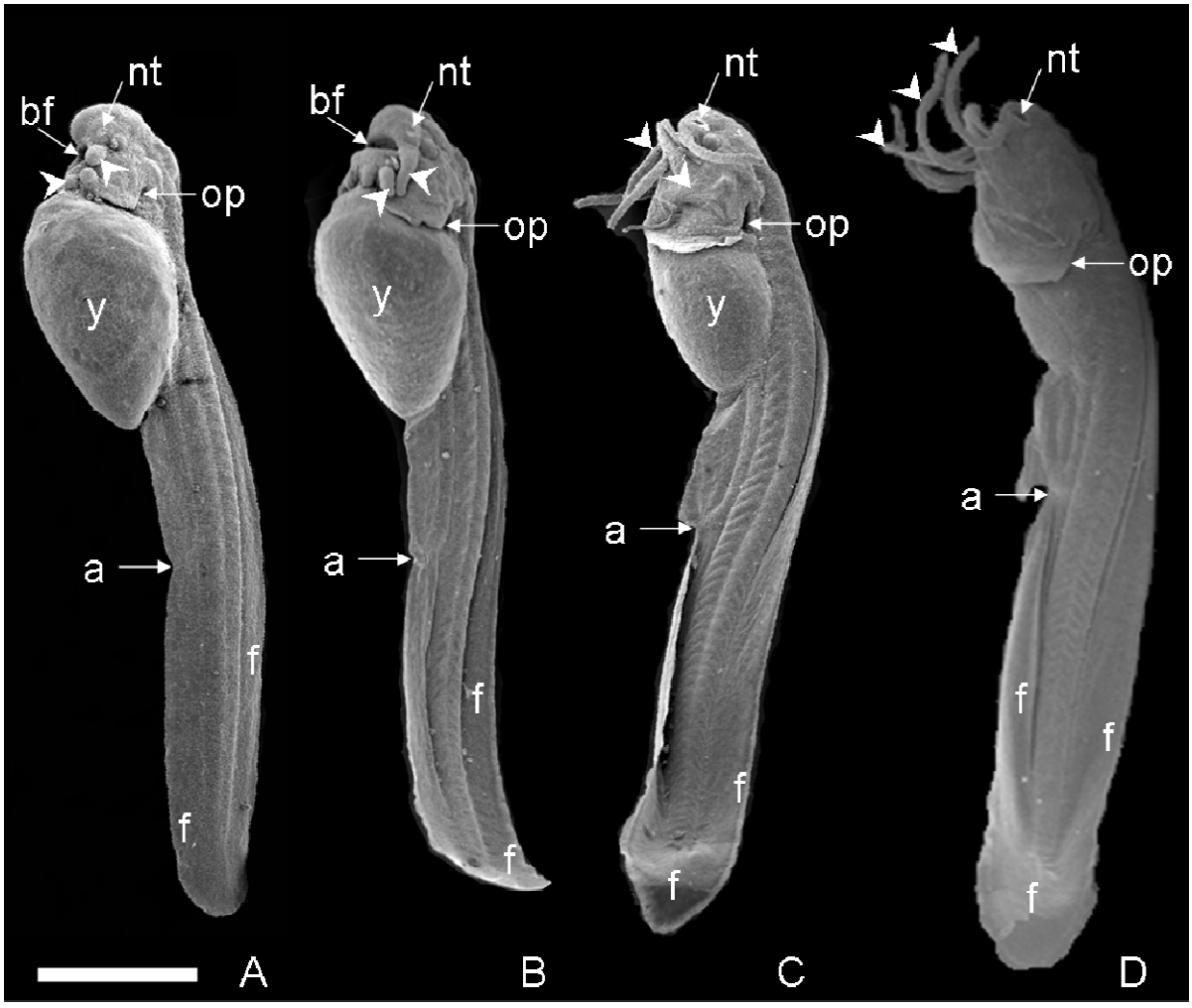


FIGURA 09. PERÍODO LARVAL DE *Rhamdia quelen*.
LEGENDA: Microscopia eletrônica de varredura: (AB) larvas iniciais (estádio 26, sendo A mais jovem do que B), (C) larvas médias (estádio 27), (D) larvas tardias (estádio 28). Símbolos: a = poro anal, bf = cavidade bucofaríngea (fenda oral), f = nadadeira embrionária, nt = narina, op = cavidade opercular, y = vitelo, cabeças de seta = barbilhões. Escala: 500 μm

2.4 DISCUSSÃO

O conhecimento dos estádios embrionário e larval, bem como o controle da temperatura da água sob condições laboratoriais é de grande valia para otimizar o tempo e o trabalho. Não obstante, o conhecimento do desenvolvimento embrionário e larval sob diferentes regimes de temperatura é importante para avaliar as melhores condições de produção de alevinos de boa qualidade.

A nomenclatura e a numeração dos períodos embrionário e larval são muito divergentes na literatura. A classificação adotada para o presente estudo foi baseada em Kimmel e colaboradores (1995). No presente estudo, foram descritos sete períodos para o desenvolvimento embrionário (zigoto, clivagem, blástula, gástrula, segmentação, faríngula e eclosão) e três períodos larvais (larvas iniciais, larvas médias e larvas tardias). Além disso, foram descritas as características mais notáveis do período pós-larval e do início da fase juvenil.

Em espécies cujo sentido visual predominante para a percepção de alimentos, como *Brycon amazonicus* (NEUMANN, 2008), os olhos são bem desenvolvidos, mesmo em larvas. Os olhos de *R. quelen* tornaram-se pigmentados após a eclosão, durante o estádio larval inicial. No entanto, como outros bagres (BRITZKI et al., 1999), *R. quelen* apresenta olhos relativamente reduzidos e estruturas mecanosensoriais (sistema de linha lateral) e quimiosensoriais (botões gustativos) bem desenvolvidos. Durante o período larval, lábios e três pares de barbilhões desenvolvem-se e são cobertos com numerosos botões gustativos. Além disso, os neuromastos, presentes desde o final do período embrionário, desenvolvem-se em um sistema de linha lateral abundante tanto no tronco quanto na região cefálica. Estruturas quimiosensorias e um sistema de linha lateral eficientes são essenciais para manter os hábitos de *R. quelen*, visto que esta espécie onívora forrageia predominantemente durante a noite, alimentando-se principalmente de presas bentônicas (GUEDES, 1980; SCHULZ & LEUCHTENBERGER, 2006).

A nadadeira embrionária permanece durante todo o período larval e parte do período pós-larval de *R. quelen*. Van Snike e colaboradores (1997) propuseram que esta nadadeira está relacionada não apenas com a locomoção, mas também contribui para aumentar a superfície de trocas gasosas através da pele. Segundo Neumann (2008), a reabsorção da nadadeira embrionária marca o fim de um

período de mudanças drásticas no corpo, quando o pequeno peixe adquire uma respiração branquial eficiente e as nadadeiras definitivas são formadas, permitindo a mudança do padrão de natação.

O desenvolvimento das estruturas relacionadas com a natação e, principalmente, para a detecção de alimentos, sugere que *R. quelen* é potencialmente capaz de consumir alimento exógeno, mesmo antes do esgotamento do vitelo. Além disso, a presença de abundantes estruturas quimiosensoriais neste período inicial, sugere que esta espécie é capaz de selecionar alimentos desde a primeira alimentação. A abertura da boca das larvas de algumas espécies de peixes ocorre simultaneamente com o início dos movimentos horizontais da natação (LUZ et al., 2001) e pigmentação dos olhos (LASKER et al., 1970). A bexiga natatória de *R. quelen* infla durante o estádio de larva tardia, permitindo melhores movimentos de forrageamento, coincidindo com a diminuição do vitelo e maturação do intestino.

Durante os primeiros dias, larvas de peixes consomem a reserva de energia do vitelo. O período de alimentação endógena é essencial para a maturação das estruturas digestivas, permitindo que as larvas alcancem locais com recursos alimentares disponíveis. Larvas tardias de *R. quelen* iniciam a alimentação exógena mesmo antes do consumo total do vitelo. Na verdade, a boca começa a abrir antes de eclosão, durante o estádio de faríngula tardia. Segundo Govoni e colaboradores (1986), o intestino das larvas é funcional durante a primeira alimentação exógena, embora seja estruturalmente e fisiologicamente mais simples do que o intestino adulto. No presente estudo, as larvas finais foram alimentadas com zooplâncton, mesmo antes do esgotamento completo do vitelo, indicando a funcionalidade do trato digestório.

A reserva de vitelo presente nas larvais finais provavelmente é uma garantia. Isto diminuiu o risco de mortalidade, no caso de escassez de alimento no ambiente. O início da alimentação exógena é um período crítico na história de vida de peixes, pois pode ocorrer atrofia do intestino após apenas um dia de privação de alimento, sendo o tempo de sobrevivência sem alimento extremamente limitado em muitas espécies de peixes (THEILACKER, 1978).

A temperatura da água é um importante fator determinante na biologia dos peixes. Um efeito óbvio de altas temperaturas é o aumento da taxa de desenvolvimento embrionário (GARSIDE, 1966; VERNIER, 1969; OJANGUREN et al., 1999; SAKA et al., 2004; COOK, et al., 2005; MARTELL et al. 2005; NINHAUS-

SILVEIRA et al., 2006). Da mesma forma, observou-se uma relação negativa entre o tempo de desenvolvimento embrionário e temperatura de incubação em *R. quelen*.

A TABELA 2 apresenta dados da literatura sobre a duração do desenvolvimento embrionário em uma série de espécies de teleósteos. Com a análise destes dados é possível concluir que o tempo de incubação não está relacionado com a organização taxonômica das espécies. Com poucas exceções, os embriões de peixes mantidos entre 24 e 26℃ eclodem em até vinte e quatro horas. Temperaturas mais altas geralmente aceleram, enquanto as temperaturas inferiores reduzem a duração do desenvolvimento embrionário. As exceções a esse padrão estão provavelmente relacionadas com características ambientais e/ou comportamentais de cada espécie, como a ocorrência de cuidados parentais, ou adesividade do ovos, que são fatores de proteção à prole, permitindo um desenvolvimento mais lento.

Gomes e colaboradores (2000) demonstraram que alevinos de *R. quelen* aclimatados a 31℃ podem tolerar temperaturas entre 15℃ e 34℃. Todas as temperaturas testadas no presente estudo (21℃, 24° C, 27℃ e 30℃) permitem o desenvolvimento embrionário e larval nesta espécie. *R. quelen* produzem ovos mais rapidamente a 30℃ quando comparado às temperaturas experimentais mais baixas. No entanto, alguns defeitos anatômicos, como edema cardíaco, foram mais freqüentes a 30℃ (ver capitulo III desta dissertação). O efeito teratogênico da temperatura nesta espécie exige estudos futuros. Arenzon e colaboradores (2002) mostraram resultados semelhantes em *Cynopoecilus melanotaenia*. Nesta espécie, as larvas incubadas a 20℃, 21℃ e 25℃ apresentam defeitos anatômicos que impossibilitam sua movimentação, tornando impossível a sua sobrevivência.

Além disso, as elevadas taxas metabólicas sob temperaturas elevadas levam ao consumo mais rápido do vitelo, pois em ambientes naturais, o esgotamento das reservas endógenas antes da maturação completa das estruturas relacionadas com a captura e processamento de alimentos exógenos e/ou antes da pós larva atingir os locais com alta concentração de alimentos pode colocar em risco a sobrevivência dos indivíduos.

TABELA 02. ESTUDOS ANTERIORES DO DESENVOLVIMENTO DE TELEÓSTEO

Espécies	Temperatura	Tempo de eclosão (hpf)	Autores
ORDEM BELONIFORMES			
FAMÍLIA ADRIANICHTHYIDAE			
Oryzias latipes	25°C	200h00	Gonzáles-Doncel et al., 2005
ORDEM CHARACIFORMES			
FAMÍLIA ANOSTOMIDAE			
Leporinus friderici	27.6°C	13h20	Sanches et al., 2001
FAMÍLIA CHARACIDAE			
Brycon cephalus	26°C	10-11h00	Romagosa et al., 2001
Colossoma macropomum	25-26°C	18h30	Ribeiro et al., 1994
Piaractus mesopotamicus	25-26°C	22h00	Ribeiro et al., 1994
Paracheirodon axelrodi	26°C	19-20h00	Anjos & Anjos, 2006
Astyanax bimaculatus	24-25°C	17h00	Sato et al., 2006
Tetragonopterus chalceus	24-25°C	20h00	Sato et al., 2006
FAMÍLIA ERYTHRINIDAE			
Hoplias malabaricus	24-26°C	44h00	Azevedo & Gomes, 1942
FAMÍLIA PROCHILODONTIDAE			
*Prochilodus scrofa (*sinônimo de *P. lineatus)*	24°C	22h00	Cavicchioli & Leonhardt, 1993
Prochilodus lineatus	24°C	22h00	Ninhaus-Silveira et al., 2006
Prochilodus lineatus	28℃	14h00	Ninhaus-Silveira et al., 2006
ORDEM CYPRINIFORMES			
FAMÍLIA CYPRINIDAE			
Danio rerio	28°C	48h00	Kimmel et al., 1995
ORDER PERCIFORMES			
FAMÍLIA CICHLIDAE			
Oreochromis niloticus	28°C	120h00	Fujimura & Okada, 2007
ORDER SILURIFORMES			
FAMÍLIA AUCHENEPTERIDAE			
Parauchenipterus galeatus	27-28°C	64h00	Sanches et al., 1999

NOTA: Desenvolvimento embrionário (tempo de eclosão) pós-fertilização em horas (hpf).

2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, M.S.D.; MOURA, A. Estádios de desenvolvimento embrionário de curimatã-pioa *Prochilodus affinis* (Reinhardt, 1874) (Pisces, Prochilodontidae). *Encontro Anual De Aquicultura De Minas Gerais, Codevasf,* p.61-71, 1992.

ANJOS, H. D. B.; ANJOS, C., R. Biologia reprodutiva e desenvolvimento embrionário e larval do cardinal tetra, *Paracheirodon axelrodi* Schultz, 1956 (Characiformes: Characidae), em Laboratório. *B. Inst. Pesca,* v. *32*,n.2, p. 151-160, 2006.

ARENZON, A.; LEMOS, C.A.; BOHRER, M.B.C. The influence of temperature on the embryonic development of the annual fish *Cynopoecilus melanotaenia* (CYPRINODONTIFORMES, RIVULIDAE). *Brazilian Journal of Biology,* v. 62, n. 4b, p. 743-747, 2002.

AZEVEDO, P.; GOMES, A. L. Contribuição ao estudo da biologia da Traíra *Hoplias malabarica* (Bloch, 1794). *Bol.Ind. Anim.*, v. 5, no. 4, p. 15-64, 1942.

BARCELLOS, L. J. G.; WASSERMANN, G. F.; SCOTT, A.P.; WOEHL, V.M; LUTHIER, F.; QUEVEDO, R. M.; ITTZÉS, I.; KRIEGER, M. H. Plasma steriods concentrations in relation reproductive cycle cultured male *Rhamdia quelen. Journal of fish Biology,* v.61, n.3, p.751-763, 2002.

BRITSKI, H.A., SILIMON, K.Z. & LOPES, B.S. *Peixes* do *Pantanal*: *manual de identificação.* Embrapa-SPI, Brasilia/Embrapa-CPAP, Corumba. 1999.

CARNEIRO, P.C.F.; MIKOS, J.D.; BENDHACK, F. Processamento: O jundiá como matéria prima. *Panorama da Aqüicultura*, 13, 17-21, 2003.

CAVICCHIOLI, M.; LEONHARDT, J. H. Estudo do desenvolvimento morfológico de larvas de Curimbatá, *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1882), obtidas de reprodução induzida. *Revista Unimar,* Maringá, v. 15, suplemento, p. 109-124, 1993.

CHIPPARI-GOMES, A.R., GOMES, L.C., BALDISSEROTTO, B. Lethal temperatures for Silver Catfish, Rhamdia quelen, fingerlings. J. *Appl. Aquacult*., 9, 11–21, 1999.

COOK, M.A.; GUTHRIE1, K.M.; RUST, M.B.; PLESHA, P.D. Effects of salinity and temperature during incubation on hatching and development of lingcod *Ophiodon elongatus* Girard, embryos. *Aquaculture Research*, v.36, p.1298-1303, 2005.

FINN, R.N. The physiology and toxicology of salmonid eggs and larvae in relation to water quality criteria. *Aquatic Toxicology*, 81, 337-354, 2007.

FUJIMURA, K. & OKADA, N. Development of the embryo, larva and early juvenile of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). *Developmental staging system Develop. Growth Differ*. 49, 301–324, 2007.

GABILLARD, J.C.; WEIL, C.; RESCAN, P.Y.; NAVARRO, I.; GUTIERREZ, J.; LE BAIL, P.Y. Does the GH/IGF system mediate the effect of water temperature on fish growth? *Areview Cybium*, v. 29, n.2, p. 107-117, 2005.

GARSIDE E.T. Developmental rate and vertebral number in salmonids. J. Fish. Res. Bd Canada, v.23, p.1537-1551, 1966.

GODINHO, H.M.; FENERICH, N.A.; NARAHARA, M.Y. Desenvolvimento embrionário e larval de *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) (Siluriformes, Pimelodidae). Rev. Brasil. Biol., v.38, n.1, p. 151-156, 1978.

GOMES, L.C.; GOLOMBIESKI, J.I.; CHIPPARI GOMES, A.R.; BALDISSEROTTO, B. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (PISCES, PIMELODIDAE): uma revisão. Ciência Rural, v.30, n.1, p.179-185, 2000.

GONZÁLEZ-DONCEL, M., OKIHIRO, M. S.; VILLALOBOS, S. A.; HINTON D. E; TARAZONA J. V. A quick reference guide to the normal development of *Oryzias latipes* (Teleostei, Adrianichthyidae). *J. Appl. Ichthyol*. v.21, p.39–52, 2005.

GOVONI, J. J., BOEHLERT, G. W. & WATANABE, Y. The physiology of digestion in fish larvae. *Environmental Biology of Fishes*. 16, 59-77 apud MACIEL, C. M. R. R. Ontogenia de larvas de piracanjuba, *Brycon orbignyanus* Valenciennes (1849) (Charciformes, Characidae, Bryconinae). Masters Degree, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1986.

GUEDES, D.S. Contribuição ao estudo da sistemática e alimentação de jundiás *(Rhamdia spp*) na região central do Rio Grande do Sul (Pisces, Pimelodidae). Santa Maria – RS, 1980. 99p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Curso de Pós - graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, 1980.

KAMLER, E. Early Life History of Fish: An Energetics Approach**.** London: Chapman & Hall. 288p, 1992.

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

LASKER, R., FEDER, H.M., THEILACKER, G.H. & MAY, R.C. Feeding, growth, and survival of *Engraulis mordax* larvae reared in the laboratory. *Marine Biology, n.*5, p.345–53, 1970.

LUZ, R.K. & ZANIBONI-FILHO, E. Larvicultura do Mandi-amarelo *Pimelodus maculatus* Lacépède, 1803 (Siluriformes: Pimelodidae) em diferentes densidades de estocagem nos primeiros dias de vida. *Rev. Bras. Zootec,* [online]. 31, 560-565, 2002.

LUZ, R. K.; REYNALTE-TATAJE, D. A.; FERREIRA, A. A.; ZANIBONI-FILHO, E. Desenvolvimento Embrionário e Estágios Larvais do Mandi-Amarelo *Pimelodus maculatus. Boletim do Instituto de Pesca*, v. 27, n.1, p. 49 – 55, 2001.

MARTELL, D. J.; KIEFFER, J. D.; TRIPPEL, E. A. Effects of temperature during early life history on embryonic and larval development and growth in haddock. *Journal of Fish* Biology. v.66, p. 1558–1575,2005.

NEUMANN, E. Desenvolvimento inicial de jatuarana, *Brycon amazonicus* (Teleostei, Characidae). Masters Degree, Centro de Aqüicultura da Universidade Estadual Paulista-Centro de Aqüicultura, Jaboticabal, 2008.

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

OJANGUREN, A. F.; REYES-GAVILA, F.G.; MUNHOZ, R.R. Effects of temperature on growth and efficiency of yolk utilisation in eggs and pre-feeding larval stages of Atlantic salmon. *Aquaculture International*, v.7, p.81–87, 1999.

PEREIRA, C.R.; BARCELLOS, L.J.G.; KREUTZ, L.C.; QUEVEDO, R.M.; RITTER, F.; SILVA, L.B. Embryonic and Larval Development of Jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard, 1824, Pisces, Teleostei), a South American Catfish. *Brazilian Journal of Biology*, v.66, n. 4, p. 1057-1063, 2006.

ROMAGOSA, E.;NARAHARA, M.Y.; VERANI, N.F. Stages of embryonic development of the “Matrinxã”, *Brycon Cephalus* (PISCES, CHARACIDAE). *Boletim do Instituto de Pesca*, v.27, n.1, p.27 - 32, 2001.

RIBEIRO, C. R. Estudo comparativo da embriogênese de peixes ósseos (Pacu, *Piaractus mesopotamicus;* Tambaqui *Calossoma macropomum* e hibrído Tambacu). *Rev. Bras. Biol.,* Rio de Janeiro, v. 55, suplemento 1, p. 65-78, 1994.

SAKA, Ş., FIRAT, K & ÇOBAN, D. Development of the common dentex (*Dentex dentex*) eggs in relation to temperature. *Aquaculture Research*, v. 35, n. 3, p. 224-231, 2004.

SANCHES, P.V.; BAUMGARTNER, G.; BIALETZKI, A.; et al. Caracterização do desenvolvimento inicial de *Leporinus friderici* (Osteichthyes, Anostomidae) da bacia do rio Paraná, Brasil. *Acta Scientiarum*, Maringá, v. 23, n. 2, p. 383-389, 2001.

SANCHES, P.V., NAKATANI, K. & BIALETZKI, A. Morphological description of developmental stages of *Parauchenipterus galeatus* (Linnaeus, 1766) (Siluriformes, Auchenipteridae) on the floodplain of the Upper Paraná River. *Rev. Bras. Biol*. v.59, P.429–38, 1999.

SATO, Y.; SAMPAIO, E.V.; FENERICH-VERANI, N.; VERANI, J.R. Biologia reprodutiva e reprodução induzida de duas espécies de Characidae (Osteichthyes, Characiformes) da bacia do São Francisco, Minas Gerais. *Revista Brasileira de Zoologia, v.* 23, n.1, p.267-273, 2006.

SCHULZ & LEUCHTENBERGER. Activity Patterns of South AmericanSilver Catfish (*Rhamdia quelen*). C. *Braz. J. Biol.* 66, 565-574, 2006.

THEILACKER, H. Effect of starvation on the histological and morphological characteristics of jack mackerel *Uchurus symmetricus*, larvae. *Fish. Bull*. US. 76403-414, 1978.

VAN SNIKE, G. M. J., VAN DEN BOOGAART, J. G. M. & OSSE, J. W. M. Larval growth patterns in *Cyprinus carpio* and *Clarias gariepinus* with attention to the finfold. *Journal of Fish Biology*. 50, 1339-1352, 1977.

VERNIER J.M. Table chronologique du développement embryonnaire de la truite arcenciel, *Salmo gairdneri*. *Ann . Embryol. Morphol.*, v.2, p.495-520, 1969.

Capítulo III – TERATOGENICIDADE, SOBREVIVÊNCIA, CRESCIMENTO E METABOLISMO DE EMBRIÕES E LARVAS DO JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*) (SILURIFORMES, HEPTAPTERIDAE), OBTIDAS EM DIFERENTES TEMPERATURAS DE INCUBAÇÃO

3.1 INTRODUÇÃO

O conhecimento do desenvolvimento inicial das espécies é instrumento importante tanto para estudos de biologia do desenvolvimento, quanto para investigações acerca da produção de pescado, toxicologia e ecologia de peixes.

Além da quantidade de organismos produzidos, é importante que as larvas apresentem potencial para originar adultos com características adequadas ao consumo. De acordo com Burrows (1969), para garantir a qualidade dos peixes adultos, os juvenis devem ter alta resistência, tamanho grande, elevadas reservas de proteína e energia e apresentar baixa incidência de doenças. A obtenção de juvenis com esta qualidade depende em parte das condições de incubação sendo, portanto, necessárias intensas pesquisas para aperfeiçoar o desenvolvimento dos peixes em cativeiro.

Na produção de peixes em larga escala, a economia geralmente exige que os espécimes cultivados atinjam o tamanho ideal no menor tempo possível. Sendo assim, são frequentemente utilizadas temperaturas elevadas para que o desenvolvimento inicial dos peixes seja acelerado (PETERSON et al., 2004). Entretanto, tanto Klimmogianni e colaboradores (2004), quanto Saka e colaboradores (2005) consideram a possibilidade da incubação em temperaturas mais altas provocar um maior número de malformações tanto no sistema cardíaco quanto nas regiões cefálica e caudais.

A taxa de síntese protéica se altera de acordo com o período do desenvolvimento em que o organismo se encontra, Os embriões de peixes, assim como de outros grupos, apresentam uma quantidade de fatores de desenvolvimento provenientes do ovócito, que dirigem as etapas iniciais da embriogênese. Uma vez que estes fatores maternos se esgotam na blástula média, a taxa de síntese protéica diminui e passa a aumentar novamente com o passar do desenvolvimento marcando o início da transcrição dos genes zigóticos (GILBERT, 2006).

Um fator crítico no desenvolvimento dos peixes é a temperatura. Durante a incubação, é essencial controlar as condições de temperatura da água para se manter a qualidade dos embriões de peixes (CLAIREAUX & LAGARDERE, 1999; CONIDES & GLAMUZINA, 2001; SAKA et al., 2004). A temperatura, altera o metabolismo, podendo levar ao desenvolvimento anormal de diversas estruturas do

embrião (KINNE & KINNE[§], apud SAKA et al., 2004), podendo causar deformidades e até mesmo alterações no gênero (BATTY et al., 1993; WATANABE et al., 1995; OVERNELL, 1997; FUIMAN et al., 1998). Além disso, a duração dos estádios ontogenéticos, o tamanho da larva durante a eclosão e a eficiência na utilização do vitelo (KAMLER, 1992) também são frequentemente modificados pela temperatura. Geralmente temperaturas mais baixas retardam os padrões de desenvolvimento nos peixes e temperaturas mais altas os aceleram (SAKA et al., 2004).

Tarifeño e colaboradores (2008) sugeriram que a influência da temperatura no desenvolvimento é mais significativa quando se analisam parâmetros fisiológicos dos peixes.

Lo (1985)[**] apud Tarifeño (2008) propôs que a taxa de desenvolvimento de peixes é uma função exponencial mista que depende da variação da temperatura e do estádio do desenvolvimento. A magnitude e direção dos efeitos da temperatura dependem, assim, não somente das espécies, mas também do estádio de desenvolvimento, já que diferentes fases da vida dos peixes requerem, muitas vezes, diferentes temperaturas (HERZIG & WINKLER[††], apud KLIMMOGIANNI et al., 2004). Kamler (1992) observou, ainda, que os efeitos da temperatura são mais pronunciados durante o crescimento larval que durante a embriogênese.

Os acontecimentos existentes durante o desenvolvimento embrionário e larval de espécies de peixes fornecem informações relevantes à otimização da cultura sob condições laboratoriais (ARENZON, 2002).

A criação do jundiá *(Rhamdia quelen*) vem crescendo de forma constante e acelerada nos últimos anos, demandando esforços dos grupos de pesquisa envolvidos em trabalhos científicos voltados ao conhecimento desta espécie e suas particularidades quando mantida em cativeiro.

---

1 KINNE, O. & KINNE, E. M. Rates of development in embryos of a cyprinodont fish exposed to different temperature-salinity-oxygen combinations. **Canadian Journal of Zoology**, v. 40, p. 231-253, 1962.

****** LO, N.H. A model for temperature-dependent Northern anchovy egg development and an automated procedure for the assignment of age to staged eggs. In: Lasker R (ed) An egg production method for estimating spawning biomass of pelagic fish: application to the Northern anchovy, Engraulis mordax. **NOAA, Technical Report** , v. 36, p.43–50,1985.

3 HERZIG, A.; WINKLER, H. The influence of temperature on the embryonic development of three cyprinid fishes, *Abramis brama, Chalcalburnus chalcoides* and *Vimba vimba*. **Journal of Fish Biology**, v. 28, p. 171-181, 1986.

Neste capítulo foi discutido o efeito da temperatura de incubação na taxa de sobrevivência, crescimento e na qualidade das larvas, pós-larvas e juvenis obtidos. A qualidade dos organismos foi estimada pela menor porcentagem de malformações anatômicas e maior tamanho. A taxa metabólica foi estimada indiretamente pela taxa cardíaca. A taxa de síntese protéica e a. razão RNA:DNA foram avaliados juntamente com as taxas de crescimento relativo e de crescimento protéico específico.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Obtenção dos ovos:

Os ovos de *Rhamdia quelen* (jundiá) foram obtidos no Laboratório de Pesquisa e Piscicultura (LAPEP) da PUCPR (São José dos Pinhais – PR). Durante o período reprodutivo da espécie, exemplares adultos foram induzidos a desovar por hipofização (injeção intramuscular de hipófise de carpa) e massageados ventralmente para a extrusão dos ovócitos (FIGURA 10 A). Após a fertilização *in vitro* (FIGURA 10 B), a água contendo os zigotos foi cuidadosamente trocada várias vezes para retirada do excesso de sêmen. Ao longo das lavagens, a temperatura da água foi gradativamente ajustada até atingir a temperatura desejada. Os zigotos foram rapidamente transportados para o Laboratório de Biologia Adaptativa (Departamento de Biologia Celular – UFPR), onde foram aclimatados e incubados em 18^{o}C, 21^{o}C, 24^{o}C, 27^{o}C e 30^{o}C.

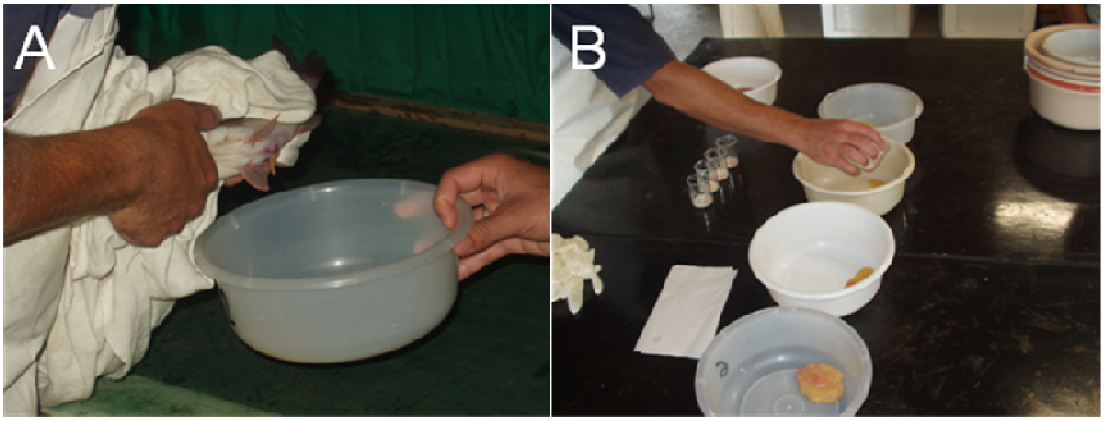


FIGURA 10. Obtenção dos ovos de *Rhamdia quelen.*
LEGENDA: (A) Procedimento para liberação dos ovócitos de uma fêmea e (B) fertilização *in vitro* de *Rhamdia quelen*.

3.2.2 Desenho Experimental:

Foram realizadas três repetições dos bioensaios, sendo que cada um teve duração de 31 dias. O Bioensaio 1 foi realizado em dezembro de 2008, o Bioensaio 2, em janeiro de 2009 e o Bioensaio 3, em fevereiro de 2009.

Nos Bioensaios 1 e 2, amostras de zigotos foram incubadas em 21^{o}C, 24^{o}C, 27^{o}C e 30^{o}C, em duplicata. No Bioensaio 3, a temperatura de incubação foi de 18^{o}C, 21^{o}C, 24^{o}C e 27^{o}C, em triplicata (FIGURA 11A). Cada réplica consistiu de uma caixa plástica de 30x12x9cm com água em temperatura controlada, contendo dez incubadoras (FIGURA 11C e D). Os bioensaios foram montados em ambiente climatizado a 18^{o}C (Bioensaio 3) ou 21^{o}C (Bioensaios 1 e 2) e as temperaturas mais altas foram obtidas através de aquecedores termostatizados em cada caixa plástica (FIGURA 11D).

Em cada incubadora (FIGURA 11B), confeccionada com potes plásticos com tampa com capacidade para 150 mL e aeração individual, foram colocados vinte zigotos. Os bioensaios foram realizados em sistema estático, sendo que água das incubadoras foi trocada a cada sete dias. A água das caixas plásticas foi reposta à medida que sofreram evaporação.

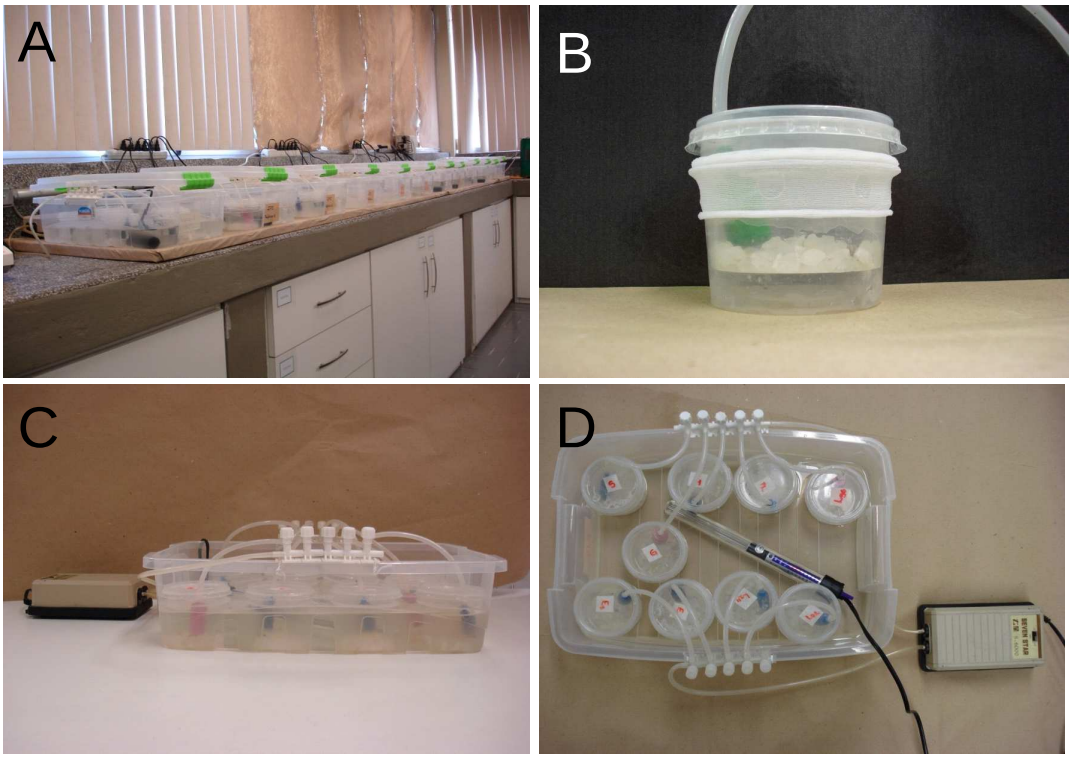


FIGURA 11. Desenho Experimental.
LEGENDA:(A) Bioensaio montado com caixas plásticas, havendo três réplicas para cada temperatura experimental (B) incubadora de 150mL para vinte embriões contendo um aerador (C) caixa plástica de 30x12x9cm contendo dez incubadoras (cada uma com seu aerador) e termostato em vista lateral e (D) sistema em vista superior.

3.2.3 Amostragem:

Os organismos foram retirados da incubadora com uma pipeta, observados e fotografados com auxílio de uma câmera digital Sony Cyber Shot acoplada ao microscópio de luz Bioval. Através dessas observações e imagens, foi estimada a taxa de sobrevivência, a natureza e a porcentagem de malformações anatômicas e a freqüência cardíaca. Uma vez que os embriões e larvas são translúcidos, os batimentos cardíacos podem ser facilmente visualizados e quantificados. Para a determinação das taxas de crescimento, determinação de concentração total de RNA, DNA e de proteínas, os embriões foram coletados nos mesmo tempos, conforme descrito a seguir. Uma vez que a amostra de indivíduos incubados a 18^{o}C foi pouco representativa, estes não foram utilizados para todas as análises, conforme explicitado nos resultados.

TABELA 03: ESTÁDIO DO DESENVOLVIMENTO EM QUE FORAM COLETADOS OS EMBRIÕES DAS INCUBADORAS DE CADA CAIXA.

Incubadora	**Estádio do Desenvolvimento**	**Tempo**
1	Gástrula	5-11 hpf*
2	Segmentação	7-20 hpf*
3	Faríngula	14-21 hpf*
4	Eclosão	19-43 hpf*
5	Larva 24	24 hpe
6	Larva 48	48 hpe
7	Larva 72	72 hpe
8	Larva 96	96 hpe
9	Pós Larva	7 dpe
10	Juvenil	30 dpe

** Houve variação de tempo para os embriões atingirem os diferentes estádios em cada temperatura. hpf = horas após a fertilização; hpe = horas após a eclosão e dpe = dias após a eclosão.*

3.2.4 Avaliação de Malformações Anatômicas:

As malformações foram classificadas em: (i) malformações cefálicas, (ii) malformações axiais (do tronco) e (iii) malformações cardíacas (edema cardíaco). Foram atribuídos valores (*a*) de acordo com a ocorrência de cada tipo de malformação, dependendo do número de indivíduos afetados em cada amostragem: 0 = ausência de malformações, 2 = presença de malformações em menos de 50% dos indivíduos, 4 = presença de malformações em mais de 50%, porém menos de 100% dos indivíduos e 6 = presença de malformações em 100% dos indivíduos.

O índice de malformação cefálica (I_{cef}) foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$I_{cef} = \sum_{est} \left(\frac{\sum_{i} a}{n} \right),$$

onde, est = estádio de desenvolvimento, i = amostragem, a = valores atribuídos de acordo com a ocorrência de malformações na cabeça e n = número de observações.

O índice de malformação axial (I_{ax}) foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$I_{ax} = \sum_{est} \left(\frac{\sum_{i} a}{n} \right),$$

onde, est = estádio de desenvolvimento, i = amostragem, a = valores atribuídos de acordo com a ocorrência de malformações no tronco e n = número de observações.

O índice de malformação cardíaca (I_{car}) foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$I_{car} = \sum_{est} \left(\frac{\sum_{i} a}{n} \right),$$

onde, est = estádio de desenvolvimento, i = amostragem, a = valores atribuídos de acordo com a ocorrência de edema cardíaco e n = número de observações.

O índice de malformação geral (I_G) foi calculado pelo somatório dos demais índices (I_{cef}, I_{ax} e I_{car}).

3.2.5 Determinação da Proporção RNA:DNA e da Concentração de Proteínas Totais:

Para extração de DNA, RNA e proteína totais foi utilizado um Kit de extração múltipla a partir de uma mesma amostra (AllPrep DNA/RNA/Proteins - Quiagen®). Os termos relativos aos nomes dos tampões e tubos utilizados neste procedimento são fornecidos pelo fabricante deste Kit que não divulga os reagentes que compõem os mesmos.

As amostras foram coletadas em cada estágio do desenvolvimento para cada temperatura, congeladas em nitrogênio líquido e estocadas em freezer -80℃. Cada amostra consistiu de um pool de 20 indivíduos. Cada amostra foi previamente homogeneizada com o auxilio de uma agulha e aproximadamente 30 mg de cada uma foi novamente homogeneizada com tampão RLT® em velocidade máxima por 30 segundos, com auxílio de um Tissue Ruptor (aparelho lisador e homogenizador-Quiagen®). O lisado foi centrifugado por 3 min a 13.000 rpm em centrífuga Eppendorf®. O sobrenadante foi cuidadosamente removido com uma micropipeta e transferido para a coluna AllPrep DNA spin® (com tubo coletor de 2 ml) e centrifugado por 30s a 10.000 rpm. A coluna AllPrep DNA spin foi cuidadosamente retirada, colocada em um novo tubo coletor, e acondicionada em temperatura ambiente (15–25℃) ou a 4℃ para posterior purifica ção do DNA.

Em seguida, foi realizada a purificação de RNA total. Para tanto foi utilizado o eluído restante do sobrenadante obtido na primeira centrifugação, ao qual foi adicionado 430 μL de etanol 96–100% e misturado bem com uma micropipeta. Parte deste homogenado (700 μL) foi transferido para uma coluna de RNeasy spin® com tubo coletor e centrifugado por 15s a 10.000 rpm. O eluído foi transferido para um tubo de 1,5 ml para purificação das proteínas posteriormente. À coluna RNeasy spin® foi adicionado 700 μL de tampão RW1® e centrifugado por 15s a 10.000 rpm para lavar a membrana da coluna. O eluído foi descartado. Foi adicionado 500 μL tampão RPE® à coluna RNeasy spin® e centrifugado por 15s a 10.000 rpm para lavar a membrana da coluna. O eluído foi descartado. Foi novamente adicionado

500 μL tampão RPE® à coluna RNeasy spin® e centrifugado por 2 min a 10.000 rpm para lavar a membrana da coluna. Em seguida, a coluna RNeasy spin® foi colocada em um novo tubo coletor de 1,5 ml e adicionado 40 μL água livre de RNase diretamente na membrana da coluna, e centrifugado por 2 min a 10.000 rpm para eluir o RNA.

Em seguida foi realizado procedimento para precipitação de proteínas totais adicionando 600 μL de Tampão APP® ao eluído da primeira lavagem (com etanol 96–100%) da extração de RNA. Este foi misturado vigorosamente e incubado a temperatura ambiente por 10 min para precipitar as proteínas. Depois foi centrifugado a 13.000 rpm por 10 min e o sobrenadante foi cuidadosamente descartado. Em seguida, foi adicionado 500 μL de etanol 70% ao pellet e centrifugado a 13.000 rpm por 1 min. O sobrenadante foi removido com uma micropipeta e o pellet aguardou secagem por 10 min a temperatura ambiente. Seguiu-se a adição de 100 μL de Tampão ALO® e misturou-se vigorosamente no agitador vórtex para dissolver o pellet. Para dissolver as proteínas mais facilmente, dissolveu-se o pellet em 30 μL de SDS 5% (w/v). Os tubos foram incubados por 5 min a 95℃, em banho seco, para dissolver completamente e desnaturar as proteínas e aguardou-se resfriamento em temperatura ambiente. Após este passo os tubos foram centrifugados por 1 min a 13.000 rpm para que qualquer resíduo restante formasse um pellet. Passou-se o sobrenadante para um novo tubo de 1,5 ml o qual foi estocado em freezer -20ºC para posterior leitura espectofotométrica.

Para purificação de DNA genômico, foram utilizadas colunas lavadas com tampão RLT® no início do procedimento descrito acima. Adicionou-se a elas 500 μL de tampão AW1® e centrifugou-as por 15s a 10.000 rpm para lavar a membrana da coluna. Descartou-se o eluido. Seguindo a sequência dos procedimentos, foi adicionado 500 μL de tampão AW2® a coluna AllPrep DNA spin® e centrifugado por 2 min a 13.000 rpm para lavar a membrana da coluna. A coluna AllPrep DNA® foi colocada em um novo tubo coletor de 1,5 ml e foi adicionado 100 μL de tampão EB® (pré-aquecido a 70℃) diretamente na membrana da coluna. Estes tubos foram incubados a temperatura ambiente (15–25℃) por 2 min e então centrifugados por 1 min a 10.000 para eluir o DNA. As amostras de DNA, RNA e proteínas foram acondicionadas em freezer -20℃ até a leitura da concentração. A determinação da

concentração dos três elementos foi quantificada através de leitura em aparelho Nanodrop ND1000 no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR.

3.2.6 Avaliação da taxa de crescimento relativo:

Devido à dificuldade de se retirar toda água presente ao redor das amostras, o peso dos organismos foi estimado pela determinação do peso seco. Para tanto, amostras com 10 indivíduos foram colocadas em cadinhos de cerâmica de peso conhecido, mantido a 65^{o}C e pesadas a cada 24h até a estabilização do peso. A taxa de crescimento relativa (*RGR*) foi calculada de acordo com Ricker (1958), utilizando-se a seguinte equação:

$$RGR = (e^{G_{DW}} - 1) \times 100$$

$$\text{sendo, } G_{DW} = \frac{\ln BDW_{t2} - \ln BDW_{t1}}{t_2 - t_1}$$

onde: BDW_{t1} e BDW_{t2} são o peso seco das amostras medidas em t_1 e t_2. Os tempos t_1 e t_2 consistem dos estádios de desenvolvimento em comparação (gástrula e pós-larva) medido em horas após a fecundação para cada temperatura experimental.

3.2.7 Avaliação da taxa de crescimento protéico específico:

O coeficiente de crescimento protéico (*Gp*) foi calculado através da equação, descrita por Caldarone e colaboradores (2001). A partir do cálculo do *Gp* foi calculada a Taxa de Crescimento Protéico Específico (*SGR*) (Houde & Schekter 1981).

$$SGR = (e^{Gp} - 1) \times 100$$

$$\text{sendo, } Gp = \frac{\ln P_{t2} - \ln P_{t1}}{t_2 - t_1}$$

onde, *P* a concentração de proteínas nos embriões ou pós-larvas em μg/indivíduo e *t* é o tempo de desenvolvimento em horas após a fecundação. t_1 foi considerado o tempo em que os embriões estavam em período de gástrula e t_2 foi considerado o tempo despendido para chegar ao estádio de larva inicial (24 hpe) em cada temperatura experimental.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Taxa de Sobrevivência:

A sobrevivência total, neste estudo, foi calculada pela porcentagem de juvenis ao final dos experimentos (trinta dias após a eclosão) em relação ao número de zigotos incubados no sistema em cada temperatura experimental (18℃, 21℃, 24℃, 27℃ e 30℃), sendo que os indivíduos coletad os e fixados ao longo do período foram considerados sobreviventes. O GRÁFICO 01 ilustra o resultado da análise desses dados, cujas médias ajustam-se a uma função polinomial (R^2 = 0,9937).

Em todas as temperaturas experimentais houve altas taxas de mortalidade, sendo esta maior nas temperaturas extremas (18℃ e 30℃). Apenas 24,7% dos indivíduos sobreviveram a 30℃, e 34% a 18℃. Na fa ixa entre 21℃ e 27℃, foram registrados os maiores índices de indivíduos sobreviventes. A maior taxa de sobrevivência foi observada nos organismos incubados a 24℃ (51%) (GRÁFICO 01). A 21℃ houve 48,44% de sobrevivência e, a 27℃ , 41,31% dos indivíduos sobreviveram (GRÁFICO 01).

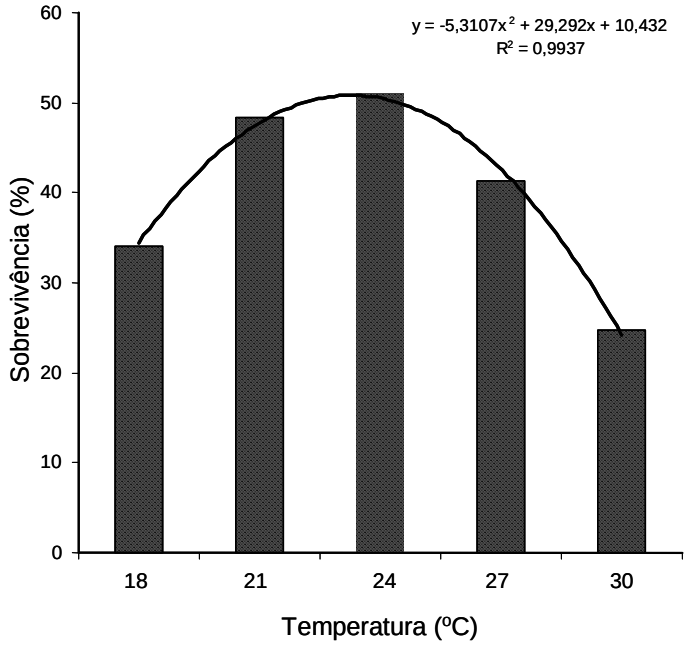


GRÁFICO 01**.** TAXA DE SOBREVIVÊNCIA.
LEGENDA: Juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*) ao final de trinta dias de experimento, incubados a:18℃, 21℃, 24℃, 27℃ e 30℃. A taxa de sobreviv ência é dada % de juvenis (30 hpe) em relação ao número inicial de zigotos em cada situação experimental.

3.3.2 Malformações Anatômicas:

Os grupos de peixes incubados em todas as temperaturas experimentais apresentaram alguma porcentagem de malformações. Foram verificadas malformações cefálicas (FIGURA 12 B), cardíacas (FIGURA 12 C) e axiais (FIGURA 12 D). O tipo de malformação mais freqüente em todas as temperaturas foi o edema cardíaco,(FIGURA 12 C), seguido por curvaturas anormais do tronco, que foram consideradas malformações axiais (FIGURA 12 D), os indivíduos considerados normais estão apresentados na FIGURA 12 A.

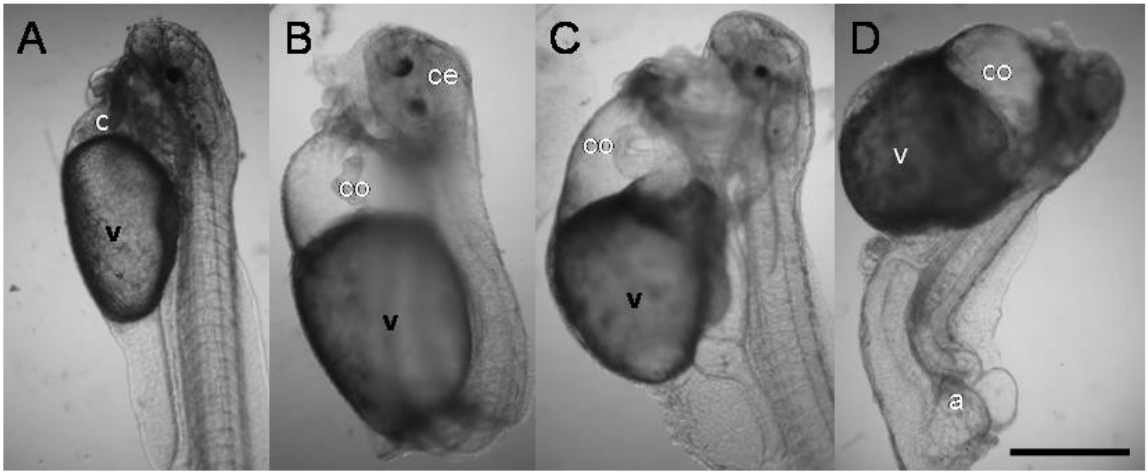


FIGURA 12**.** MALFORMAÇÕES ANATÔMICAS.
LEGENDA: (A) exemplar de jundiá normal, (B) malformação cefálica e edema cardíaco, (C) edema cardíaco (D) malformações axiais e edema cardíaco. Símbolos: v = vitelo, c = cavidade pericárdica com morfologia normal, ce = região cefálica com morfologia anormal, co = edema cardíaco, a = tronco com curvatura anormal. Barra da escala: 500µm.

O cálculo dos índices de malformação demonstrou que a incubação nas temperaturas experimentais mais extremas resultou em maior freqüência de malformações (GRÁFICO 02). A 30^{o}C, foi verificado o maior índice de malformação geral em conseqüência principalmente da alta incidência de edemas cardíacos (GRÁFICO 02). A incubação a 18^{o}C resultou no segundo maior índice de malformação, havendo menor ocorrência de edemas cardíacos, porém maior ocorrência de malformações axiais e cefálicas, quando comparados a 30^{o}C (GRÁFICO 02).

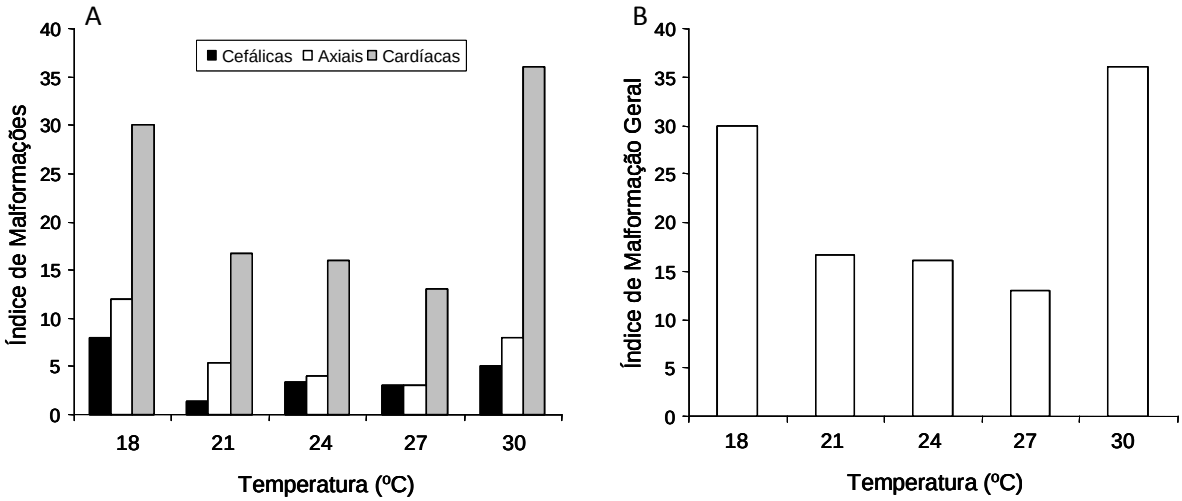


GRAFICO 02. ÍNDICE DE MALFORMAÇÕES ANATÔMICAS.
LEGENDA: (A) Índice de malformações cefálicas, axiais e cardíacas nos espécimes incubados a 18℃, 21℃, 24℃, 27℃ e 30℃ durante o desenvolvim ento embrionário e larval e (B) índice de malformações geral, no qual foram reunidos os três tipos de malformações. Legenda das colunas no primeiro gráfico: preta -malformações cefálicas, branca - axiais e cinza - cardíacas.

3.3.3 Taxa de Crescimento e Síntese Protéica

Os dados referentes à taxa de crescimento dos juvenis de jundiá estão apresentados no GRÁFICO 03. As maiores taxas de crescimento relativo (RGR) dos tratamentos experimentais foram registradas nas temperaturas de 24^{o}C e 27^{o}C (GRÁFICO 03 A). Entre o período de gástrula e pós-larva, estes indivíduos aumentaram sua massa (peso seco) em cerca de 2% a cada hora (GRÁFICO 03 A).

Foi verificada uma relação positiva (função polinomial; R^2 = 1) entre a temperatura e taxa de crescimento protéico específico (SGR) entre o período de gástrula e larva (24 hpe) (GRÁFICO 03 B). A 21^{o}C, a SGR foi de 0,40%.d^{-1}, aumentando para 4,39 a 24^{o}C, 6,58%.d^{-1} a 27^{o}C e chegando a 7,03%.d^{-1} a 30^{o}C. Se considerarem-se apenas as temperaturas entre 21 e 27^{o}C, existe uma correlação positiva linear entre as duas taxas de crescimento (RGR=0,0911 SGR + 1,4419, R^2 = 0,9397). No entanto, a relação entre RGR e SGR a 30^{o}C é semelhante à menor temperatura (21^{o}C;GRÁFICO 04 A).

As larvas incubadas entre 21 e 24^{o}C, apresentaram uma razão semelhante entre SGR e a razão RNA:Proteína, sendo esta progressivamente maior a 27 e 30^{o}C (GRÁFICO 04 B). A razão RNA:Proteína foi mais baixa a 21 e 24^{o}C, intermediária a 27^{o}C e mais elevada a 30^{o}C (GRÁFICO 05).

Comparando-se os indivíduos em estádios de gástrula (estádio 13), segmentação (estádio 21) e larva (24 hpf; estádio 26), a concentração de DNA (μg/g) aumentou ao longo do tempo em todas as temperaturas (GRÁFICO 06 A). Já a concentração de RNA (μg/g) aumentou ao longo do tempo em todas as temperaturas, exceto a 24^{o}C, na qual apresentou diminuição (FIGURA 06 B).

Quando comparadas às gástrulas, a razão RNA:DNA diminuiu expressivamente nos embriões em segmentação, mantendo-se em baixos níveis nas larvas incubadas a 21 e 24^{o}C (FIGURA 06 C). A 21^{o}C, esta razão caiu de cerca de 10 para menos de 2, enquanto que a 24^{o}C, ficou aproximadamente entre 5 e 3. A 27^{o}C, verificou-se o mesmo padrão, embora a variação tenha sido menos expressiva entre os estádios (entre 4 e 3) (GRÁFICO 06 C). Entretanto, a 30^{o}C, houve um aumento da razão RNA:DNA de 2 nas gástrulas para quase 8 nos embriões em segmentação, retornando para valores mais baixos (próximos de 3) nas larvas (GRÁFICO 06 C). No período larval (estádio 26), a razão RNA:DNA ficou entre 1 e 3,5 em todas as temperaturas (2,85 a 21^{o}C; 1,00 21 a 24^{o}C, 3,42 a 27^{o}C e 2,72 a 30^{o}C).

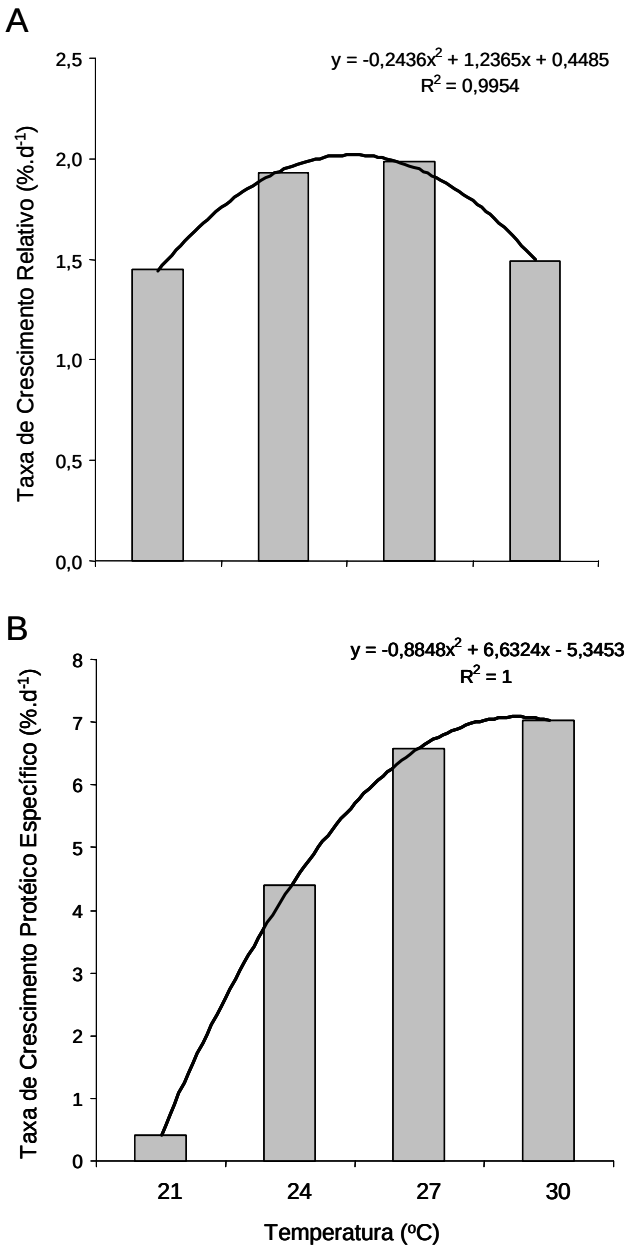


GRÁFICO 03. TAXA DE CRESCIMENTO.

LEGENDA: (A) Taxa de crescimento relativo (RGR) dos espécimes de jundiá incubados a 21℃, 24℃, 27℃ e 30℃ dada em %.d $^{-1}$. (B) Gráfico da taxa de crescimento protéico específico (SGR) dos juvenis de jundiá incubados a 21℃, 24℃, 27℃ e 30 ℃ dada em %.d $^{-1}$.

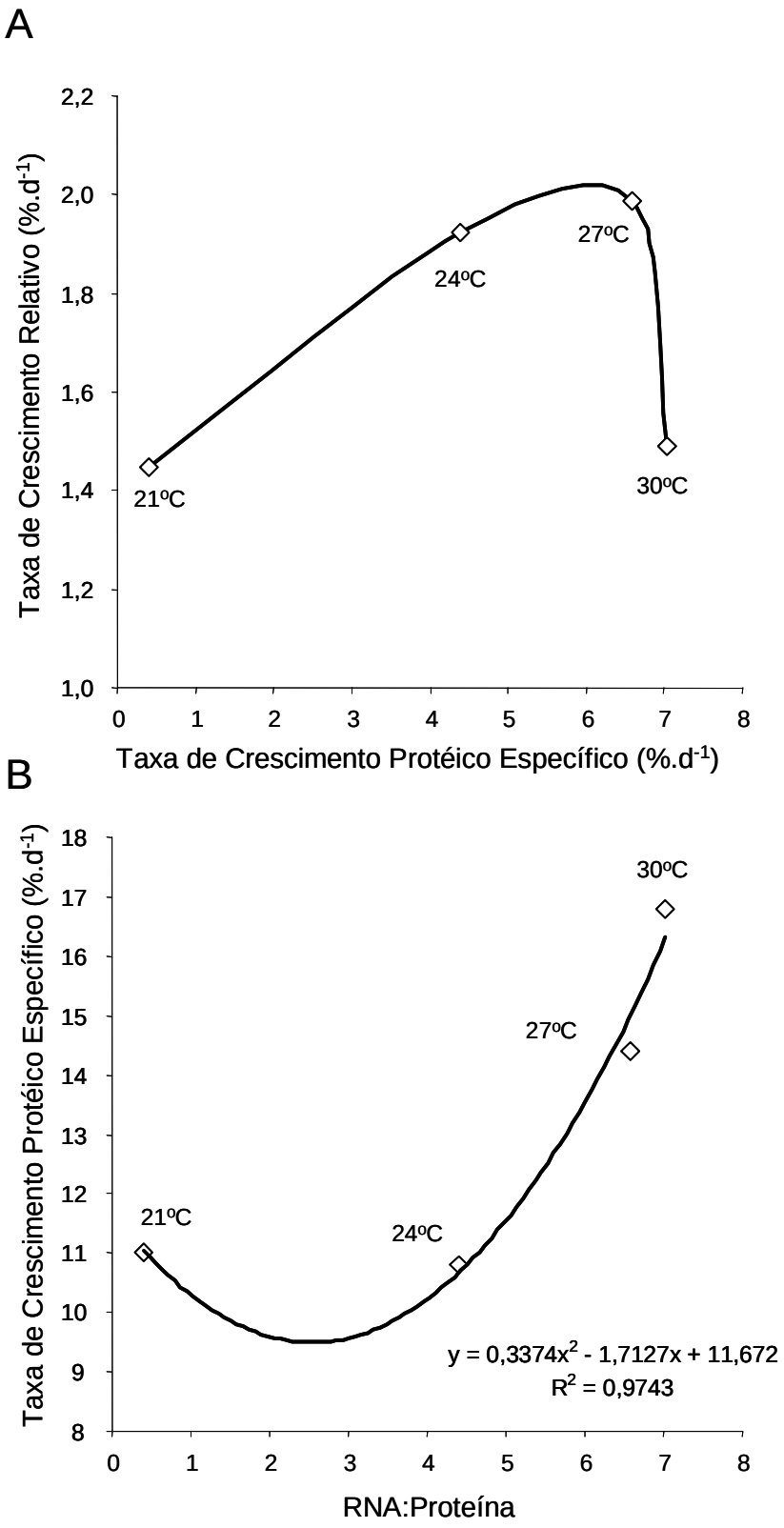


GRÁFICO 04: RAZÃO RNA:DNA EM RELAÇÃO A TAXA DE CRESCIMENTO PROTÉICO.
LEGENDA: (A) taxa de crescimento protéico específico foi dada em $\%.d^{-1}$ em relação a taxa de crescimento relativo, dos espécimes cultivados a 21℃, 24℃, 27°e 30℃ e (B) a taxa de crescimento protéico específico em relação a razão RNA:Proteína dos embriões e larvas incubados a 21℃, 24℃, 27°e 30℃, dada em $\%.d^{-1.}$

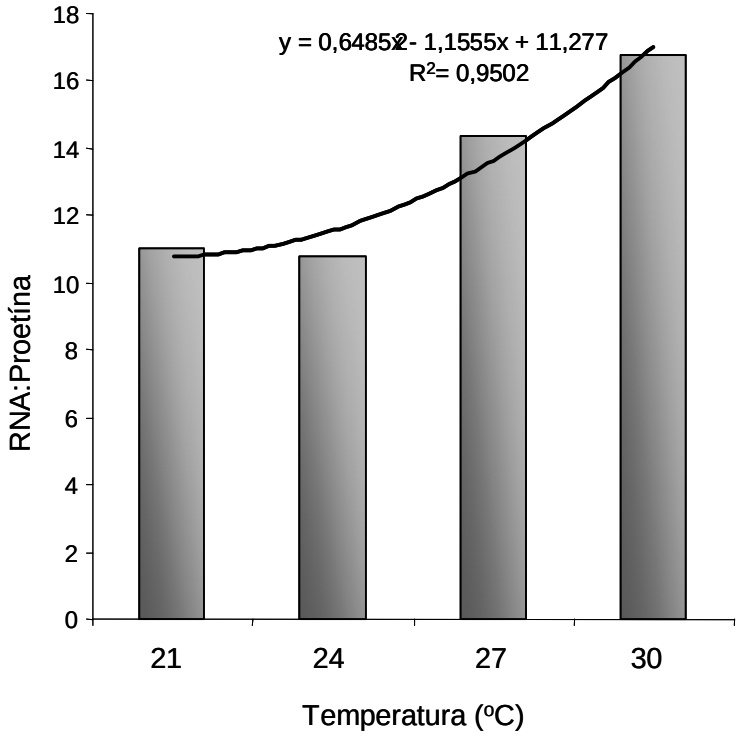


GRÁFICO 05:RAZÃO RNA:PROTEÍNA.
LEGENDA:Relação RNA e proteína em relação as quatro temperaturas de incubação de embriões e larvas de jundiá.

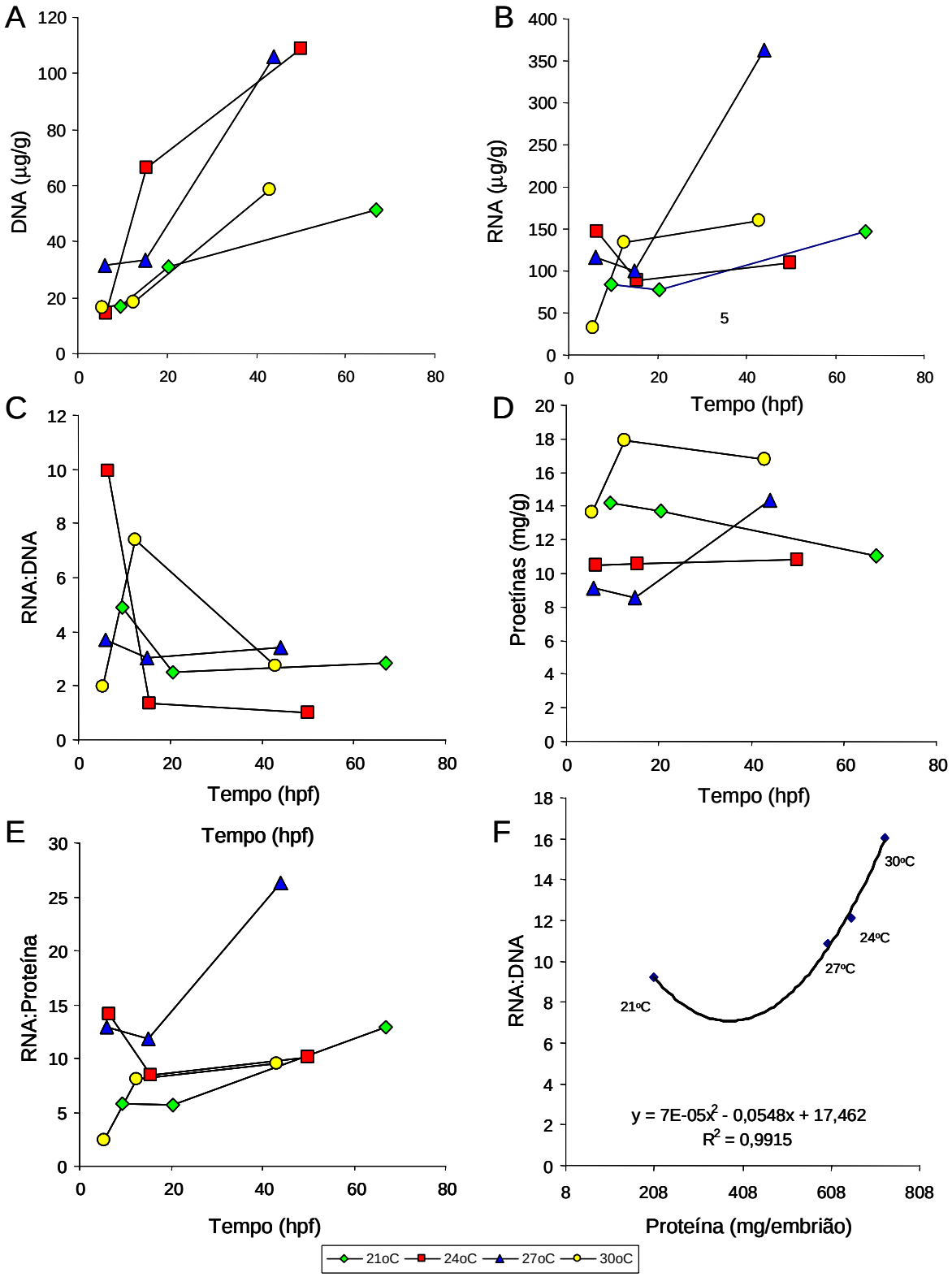


GRÁFICO 06: CONCENTRAÇÃO DE DNA, RNA E PROTEÍNA NO DESENVOLVIMENTO.
LEGENDA: (A) Concentração de DNA em µg/g de embrião ao longo do desenvolvimento, (B) concentração de RNA em µg/g de embrião ao longo do desenvolvimento, (C) razão RNA:DNA (D) concentração de proteínas em mg/ g de embrião (E) razão RNA:proteína e (F) razão RNA:DNA em relação a concentração de proteínas por embrião de jundiá incubados a 21℃, 24℃, 27℃ e 30℃.

Ainda comparando-se os indivíduos em estádios de gástrula (estádio 13), segmentação (estádio 21) e larva (24 hpf; estádio 26), verificou-se, ao longo do tempo de incubação, um aumento na concentração total de proteínas (mg/g), bem como na razão RNA:proteínas nos organismos mantidos nas duas maiores temperaturas (27 e 30^{o}C) (GRÁFICO 06 D e E). No entanto, a 24^{o}C, embora tenha havido uma diminuição na razão RNA:proteínas, a concentração de proteínas praticamente manteve-se inalterada. A 21^{o}C, esta razão aumentou, enquanto que a concentração de proteínas diminuiu. O GRÁFICO 06 F demonstra a relação entre a razão RNA:DNA e a concentração total de proteínas (mg/g).

3.3.4 Freqüência Cardíaca

A frequência cardíaca (f_R) foi analisada após a eclosão dos organismos, nos estádios de larva tardia (96 hpe; estádio 28) e pós-larvas (168 hpe; estádio 29). Em todas as temperaturas as larvas apresentaram f_R mais elevada que as pós-larvas. Verificou-se, ainda, uma correlação positiva entre a f_R e a temperatura nas larvas. Ao se analisar ligeira diminuição observada nas pós-larvas incubadas a 30^{o}C, deve-se levar em consideração o tamanho pequeno desta amostra, bem como o maior erro padrão.

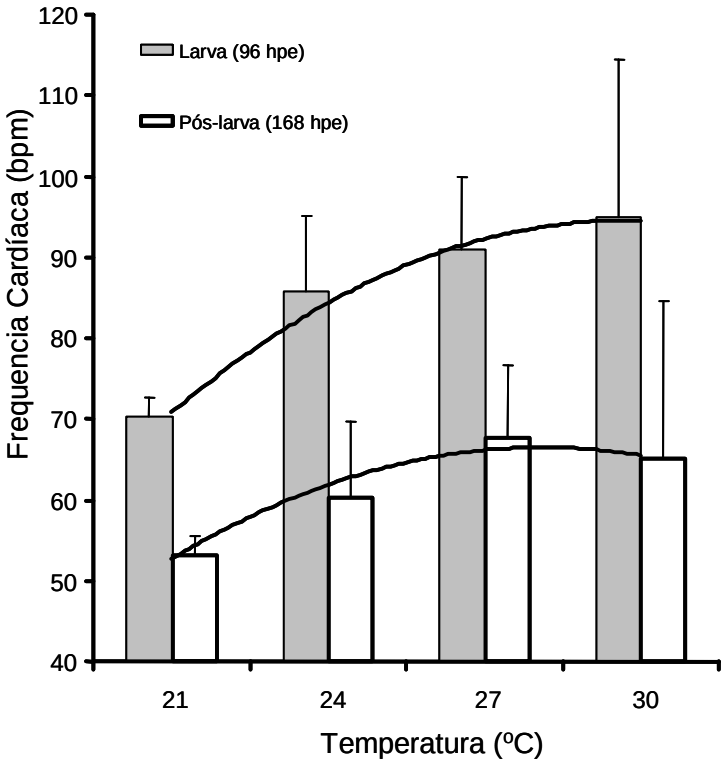


GRÁFICO 07: FREQUÊNCIA CARDÍACA.

LEGENDA: Frequência cardíaca em batimentos por minuto (bpm) das larvas 96 horas após a eclosão e de pós larvas (168 horas após a eclosão) de jundiá incubados a 21℃, 24℃, 27℃ e 30℃.

3.4 DISCUSSÃO

Em peixes, o crescimento é um processo responsável pelo gasto de uma porção significativa da energia disponível (JOBLING, 1985; WIESER,1994), sendo grande parte dos gastos energéticos atribuídos á deposição de proteínas (JOBLING, 1985; BROWN & CAMERON, 1991; HOULIHAN, 1991). O crescimento ocorre quando há preponderância de síntese sobre degradação.

Nos peixes que apresentam altas taxas de crescimento, o custo energético muitas vezes se limita ao mínimo custo bioquímico de síntese protéica (CONCEIÇÃO et al., 1998). Por outro lado, aqueles que apresentam taxas de crescimento mais lentas, geralmente utilizam mais energia no processo de crescimento (WIESER & MEDGYESY, 1990; HOULIHAN et al., 1993, 1995). Em baixas taxas de crescimento, a energia gasta com ativação de tRNA e constante produção de rRNA, por exemplo, é muito alta quando comparada ao custo para formação das ligações peptídicas em si (HOULIHAN et al., 1995).

Conceição e colaboradores (1998) demonstraram que a transição do padrão de crescimento e do metabolismo larval para juvenil é um processo gradual onde as taxas de crescimento diminuem à medida que o animal cresce. As larvas crescem muito rapidamente quando comparadas aos peixes juvenis e adultos (CONCEIÇÃO et al., 1998).

Existe uma relação linear direta entre a taxa de crescimento em peixes juvenis e a temperatura (BUCKLEY et al., 1984; OKAMOTO et al., 2006). O bacalhau *Gadus morhua* com cerca de 300g cresce numa taxa de aproximadamente 1% ao dia, sintetizando 1,25g, sendo 0,4 g desta proteína utilizada para o crescimento (HOULIHAN et al., 1988).

Piedras et al. (2004) avaliaram o crescimento de juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*), com peso médio inicial de 25 g, criados às temperaturas de 20, 23 e 26 ºC, durante 33 dias, e demonstraram que o maior crescimento específico para a espécie ocorre a 23,7℃.

No presente estudo, a maior taxa de crescimento relativo ao final do período pós-larval (início do período juvenil) do jundiá foi registrada nas temperaturas de 24℃ e 27℃. Existe, ainda, uma relação direta entr e a temperatura e a taxa de crescimento protéico específico dos espécimes incubados entre 21℃ e 27℃. Entretanto, a 30℃, embora a síntese protéica tenha sido elevada, o ganho de

massa foi inferior quando comparado às demais temperaturas, indicando menor eficiência na conversão energética.

A taxa metabólica varia durante os estádios ontogenéticos dos peixes, aumentando, por exemplo, entre os períodos de blástula e gástrula em embriões de *Colossoma macropomum*, diminuindo em seguida e voltando a aumentar no período larval (CASTRO-PEREZ, 2004). Durante o estádio larval, a taxa metabólica pode ser cerca de cinco vezes maior do que nas pós-larvas, quando ocorre alteração da alimentação endógena para exógena (GISBERT et al., 2001).

Os batimentos cardíacos de espécimes de jundiá *R. quelen*, analisados neste estudo, apresentaram uma medida indireta da taxa metabólica, na qual a freqüência cardíaca aumentou com a temperatura. Este resultado poderia sugerir que o metabolismo aumentou com a temperatura, o que era esperado. Além disso, as larvas tiveram freqüência cardíaca mais alta que as pós larvas, dado que corrobora com Wieser e colaboradores (1988), que afirmam que o aumento da massa corporal leva à diminuição da taxa metabólica.

Os embriões de peixes, assim como de outros grupos, apresentam uma quantidade de fatores de desenvolvimento, para realizarem sua síntese protéica, que recebem da mãe. Uma vez que estes ditos fatores maternos se esgotam, em determinada fase do desenvolvimento, a taxa de síntese protéica diminui e passa a aumentar novamente com o passar do desenvolvimento marcando o início da transcrição dos genes zigóticos. Além disso, como o embrião está em desenvolvimento, a taxa de síntese protéica irá mudando de acordo com o período do desenvolvimento em que o embrião se encontra, uma vez que no início ocorrem muitas divisões mitóticas para formar novas células dos embriões em clivagem, por exemplo, que irão progressivamente diminuindo ao longo do desenvolvimento (GILBERT, 2006).

A relação entre a taxa de crescimento e razão RNA:DNA é controversa. Alguns estudos mostraram que não existe relação entre a temperatura, a razão RNA:DNA e o crescimento, como afirma Caldarone e colaboradores (2001). Entretanto, Ferguson & Danzmann (1990) afirmaram que a temperatura e a razão RNA:DNA são inversamente proporcionais quando a taxa de crescimento é constante em *Oncorhynchus mykiss*. Por outro lado, Okamoto e colaboradores (2006), encontraram uma relação diretamente proporcional entre a razão RNA/DNA e o crescimento em *Mugil platanus.*

Existem evidências que apontam para uma correlação positiva entre a taxa de síntese protéica e a concentração de RNA nos tecidos, bem como com a razão RNA:proteína (HOULIHAN, 1991; FOSTER et al., 1992; HOULIHAN et al., 1993).

A razão RNA:Proteína indica que há síntese protéica e neste estudo esta razão apresentou-se maior a 27℃ e 30℃ e menor nas temperaturas 21℃ e 24℃. A taxa de crescimento relativo do jundiá foi maior a 24℃ e 27℃ e a taxa de crescimento protéico específico foi diretamente proporcional à temperatura.

A concentração de DNA aumentou entre os estádios de gástrula e segmentação. Isto ocorreu, pois, inicialmente as células são maiores existindo menor quantidade de DNA por massa de embrião. Estas células por sua vez, gradualmente vão ficando menores e a concentração de DNA aumenta. A diminuição da razão RNA:DNA diminuiu entre os estádios de gástrula e segmentação e pode ser explicada, pois, inicialmente a quantidade de RNA é alta devido aos mRNAs maternos. Contudo, a 30℃, a razão RNA:DNA foi elevada no período de segmentação, decaindo novamente na larva. Este resultado é condizente com o alto metabolismo do embrião nesta temperatura. Na larva, no entanto, embora a freqüência cardíaca aponte para um metabolismo alto, a taxa de transcrição foi mais baixa.

Foster e colaboradores (1992) verificaram que a 5^{o}C, o bacalhau (*Gadus morhua*) apresenta concentração mais elevada de RNA nos tecidos que a 15^{o}C. Entretanto, na temperatura mais alta houve maior eficiência traducional, ou seja, maior massa de proteína sintetizada por grama de RNA ao dia. Estes autores sugerem que esta alteração na concentração e na atividade do RNA com a temperatura de aclimatação provavelmente represente um mecanismo de compensação térmica, permitindo o crescimento do bacalhau em baixas temperaturas.

A maior taxa de sobrevivência dos juvenis *de R. quelen* foi observada entre as temperaturas 21℃ e 27℃, onde foram registrados os menores índices de malformações gerais. A maior taxa de sobrevivência foi observada nos juvenis incubados a 24℃.

Nas temperaturas extremas (18℃ e 30℃) foram regis trados os mais altos níveis de malformações gerais, e, além disso, altas taxas de mortalidade. Pode ser possível que as malformações sejam fatores causadores da mortalidade destes espécimes.

As larvas observadas noventa e seis horas após a eclosão (L96) registraram um aumento proporcional de batimentos cardíacos por minuto-frequência cardíaca- com o aumento da temperatura. Também foi registrada uma freqüência cardíaca mais baixa nas pós larvas quando comparadas as L96. Foi possível observar uma relação direta da freqüência cardíaca entre as temperaturas 21℃ e 27℃ e esta parece diminuir um pouco a 30℃, quando comparamos a 27℃. Contudo deve-se levar em consideração que a amostra era pequena, não podendo afirmar esta proposição com certeza.

Muitos experimentos relacionando a temperatura com o crescimento e a sobrevivência de organismos aquáticos foram realizados com o objetivo de melhorar o cultivo de diferentes espécies (OREN, 1981). Este também foi o foco deste estudo, através dos dados apresentados acima.

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARENZON, A.; LEMOS, C.A.; BOHRER, M.B.C. The influence of temperature on the embryonic development of the annual fish *Cynopoecilus melanotaenia* (CYPRINODONTIFORMES, RIVULIDAE). *Brazilian Journal of Biology,* São Carlos, v. 62, n. 4b, p. 743-747, 2002.

BATTY, R. S.; BLAXTER, J. H. S. & FRETWELL, K. Effect of temperature on the escape responses of larval herring, *Clupea harengus*. *Marine Biology*, v. 115, n. 4, p. 523-528, 1993.

BROWN, C. R. & CAMERON, J. N. The relationship between specific dynamic action (SDA) and protein synthesis rates in the Channel catfish. *Physiological Zoology, v.* 64**,** p.298–309, 1991.

BUCKLEY, J. TURNER, S. I. HALAVIK, T. A. SMIGIELSKI A. S., DREW AND LAURENCE, G. C. Effects of temperature and food availability on growth, survival, and RNA-DNA ratio of larval sand lance *(Ammodytes* americanus)*'Ecol. hog. Ser*. v.15, p.91-97, 1984.

BURROWS, R.E. The influence of fingerling quality on adult salmon survivals. *Trans. Am. Fish. Soc*., v. 98, p. 777-784, 1969.

CALDARONE EM, WAGNER M, ST. ONGE-BURNS J, BUCKLEY LJ. Protocol and guide for estimating nucleic acids in larval fish using a fluorescence microplate reader. Ref Doc 01–11:1–22, *National Marine Fisheries Service*, Woods Hole, MA. Also available at www.nefsc.noaa.gov/nefsc/ publications/crd/crd0111/0111.htm, 2001.

CASTRO-PÉREZ, C.A. Effects of ultraviolet radiation exposure on the swimming performance and hematological parameters of *tambaqui, colossoma macropomum*. *International Congress on the Biology of Fish,* 2004.

CLAIREAUX, G. & LAGARDERE, J. P. Influence of temperature, oxygen and salinity on the metabolism of the European sea bass. *Journal of Sea Research,* v. 42, n. 2, p. 157-168, 1999.

CONIDES, A. & GLAMUZINA, B. Study on the effects of rearing density, temperature and salinity on hatching performance of the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture International*, v. 9, n. 3, p. 217-224, 2001.

CONCEIÇÃO, L. E. Amino acid profiles and amino acid utilization in larval african catfish (*Clarias gariepinus*): effects of ontogeny and temperature. *Fish. Physiol. Biochem*, Oxford, v. 19, p. 43-57, 1998.

FERGUSON, M. DANZMANN, R. RNA/DNA ratios in white muscle as estimates of growth in rainbow trout held at different temperatures. Can J Zool, v. 68, p.1494–

1498, 1990.

FOSTER, A. R. HOULIHAN, D. F. HALL, S. J. BURREN, L. J. The effects of temperature acclimation on protein synthesis rates and nucleic acid content of juvenile cod (*Gadus morhua L*.) *Can. J. Zool.*, v. 70, n.11, p. 2095–2102, 1992.

FUIMAN, A. POLLING, L. A. HIGGS, K. R. Quantifying developmental progress for comparative studies of larval fishes. *Copeia*, v. 1998, n. 3, p. 602-611, 1998.

GILBERT, S.F. Developmental Biology. 8 ed. Sinauer, 2006.

GISBERT, E. CECH, J. J. DOROSHOV, JR. S. I. Routine metabolism of larval green sturgeon (*Acipenser medirostris Ayres*). *Fish Physiology and Biochemistry, v.*25, p.195–200, 2001.

HERZIG, A.; WINKLER, H. The influence of temperature on the embryonic development of three cyprinid fishes, *Abramis brama, Chalcalburnus chalcoides* and *Vimba vimba*. *Journal of Fish Biology*, v. 28, p. 171-181, 1986.

HOULIHAN, D.F. Protein turnover in ectotherms and its relationship to energetics. In: Advances in Comparative and Environmental Physiology, v.7 (ed, R. Gilles), Springer-Verlag, Berlin, pp. 1-43, 1991.

HOULIHAN, D. F., PEDERSEN, B. H., STE.ENSEN, J. F. & BRECHIN, J. Protein synthesis, growth and energetics in larval herring (*Clupea harengus*) at diferent feeding regimes. *Fish Physiology and Biochemistry, v.* 14, p.195–208, 1995.

HOULIHAN, D. F. HALL, S. J. GRAY, C. NOBLE, B. S. Growth Rates and Protein Turnover in Atlantic Cod, *Gadus morhua. Can. J. Fish. Aquat. Sci*., v.45, n.6, p. 951–964, 1988.

HOULIHAN, D.F. MATHERS, E. FOSTER, A.R. Biochemical correlates of growth rate in fish. In: Jensen, J.C., Rankin, F.B. (Eds.), *Fish Ecophysiology.* Chapman. & Hall, London,pp. 45–71. 1993.

JOBLING, M.; JØRGENSEN, E.H.; SIIKAVUOPIO, S.I. The influence of previous feeding regime on the compensatory growth response of maturing and immature arctic charr, *Salvelinus alpinus*. *Journal of Fish Biology*, v.43, p.409-419, 1985.

KAMLER, E. Early Life History of Fish: An Energetics Approach. London: Chapman & Hall. 1992. 288p.

KINNE, O. & KINNE, E. M. Rates of development in embryos of a cyprinodont fish exposed to different temperature-salinity-oxygen combinations. *Canadian Journal of Zoology*, v. 40, p. 231-253, 1962.

KLIMOGIANNI, A. KOUMOUNDOUROS, G. KASPIRIS, Æ. P. KENTOURI, M. Effect of temperature on the egg and yolk-sac larval development of common

Pandora, *Pagellus erythrinus. Marine Biology*, v.145, p.1015-1022, 2004.

LO, N.H. A model for temperature-dependent Northern anchovy egg development and an automated procedure for the assignment of age to staged eggs. In: Lasker R (ed) An egg production method for estimating spawning biomass of pelagic fish: application to the Northern anchovy, Engraulis mordax. *NOAA, Technical Report* , v. 36, p.43–50,1985.

OKAMOTO, M. H., SAMPAIO, L. A. & MAÇADA, A. P. EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE O CRESCIMENTO E A SOBREVIVÊNCIA DE JUVENIS DA TAINHA *Mugil platanus* GÜNTHER, 1880. *Atlântica*, Rio Grande, v.28(1), p. 61-66, 2006.

OREN, O.H. Aquaculture of grey mullets. Nova York, *Cambridge University Press*, 1981.

OVERNELL, J. Temperature and efficiency of development during endogenous feeding in herring embryos and yolk-sac larvae. *Journal of Fish Biology*, v. 50, n. 2, p. 358-365, 1997.

PETERSON, R. H.; MARTIN-ROBICHAUND, D. J. & HARMON, P. Influence of incubation temperature on body movements of Atlantic cod (*Gadus morhua L.)* embryos and on size at hatch. *Aquaculture Research*, 35, 453-457, 2004.

PIEDRAS, S. R. N.; MORAES,P. R. R.; POUEY, Fernandes, J. L. O. CRESCIMENTO DE JUVENIS DE JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*), DE ACORDO COM A TEMPERATURA DA ÁGUA. *B. Inst. Pesca*, São Paulo, v.*30*,n.2, p.177 - 182, 2004.

RICKER, W.E. Handbook of computations for biological statistics of fish populations. Ottawa: Fisheries Research Board of Canada, 300p, 1958.

SAKA, Ş., FIRAT, K & ÇOBAN, D. Development of the common dentex (*Dentex dentex*) eggs in relation to temperature. *Aquaculture Research*, v. 35, n. 3, p. 224-231, 2004.

TARIFEÑO, E.; CARMONA, M.; LLANOS-RIVERA, A.; CASTRO, L. R. Temperature effects on the anchoveta *Engraulis ringens* egg development: do latitudinal differences occur? *Environment Biology Fish* v. 81, p. 387–395, 2008.

WATANABE, W. O. et al. Hatchery study of the effects of temperature on eggs and yolksac larvae of the Nassau grouper *Epinephelus striatus*. *Aquaculture*, v. 136, n. 1/2, p. 141-147,1995.

WIESER, W. Energetics of fish larvae, the smallest vertebrates. *Acta Physiologica Scandinavica*, v.154, n. 3, p. 279-290, 1994.

WIESER, W.; KRUMSCHNABEL, G.; OJWANG-OKWOR, J.P. The energetic of starvation and growth after refeeding in juveniles of three cyprinid species. *Environmental Biology Fishes*, v.33, p.63-71, 1988.

WIESER, W. MEDGYESY, N. Cost and efficiency of growth in the larvae of two species of fish with widely differing metabolic rates. *Proc. Soc. Lond Biological Sciences,* v. 242, p.51-56, 1990.

Capítulo IV – AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE PÓS-LARVAS DE JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*) (SILURIFORMES, HEPTAPTERIDAE), OBTIDOS EM DIFERENTES TEMPERATURAS DE INCUBAÇÃO

4.1 INTRODUÇÃO

A preocupação com a qualidade da carne do pescado cresce à medida que a produção total da indústria da pesca e da aqüicultura aumenta. A qualidade da carne pode ser alterada por fatores extrínsecos, incluindo a temperatura, especialmente durante o período de desenvolvimento e crescimento (JOHNSTON et al., 2000). A composição bioquímica, particularmente de lipídios, pode alterar as propriedades nutricionais e sensoriais da carne dos peixes (REGOST et al., 2001). Além disso, a celularidade, ou seja, o número e distribuição das fibras é o principal determinante da textura da carne (HATAE et al., 1990; FAUCONNEAU et al., 1993; HURLING et al., 1996). A principal meta da pesquisa neste campo é estabelecer uma relação entre o modo de produção zootécnica e a qualidade da carne, incluindo a textura, o sabor, o valor nutricional e as características de processamento.

O crescimento muscular de peixes difere dos mamíferos devido ao recrutamento contínuo de células ao longo da vida (GREER-WALKER, 1970; STICKLAND, 1988). Nos estágios iniciais do desenvolvimento, as células precursoras miogênicas são amplamente distribuídas no miótomo (VEGGETTI et al., 1990; STOIBER & SANGER, 1996; JOHNSTON et al., 1998, 2000). Estas células podem proliferar e fundir-se às fibras preexistentes, aumentando sua espessura (hipertrofia), ou ainda podem fundir-se umas às outras formando novas fibras (hiperplasia) (JOHNSTON et al., 1998; JOHNSTON, 2001).

Variações da temperatura podem causar alterações fenotípicas, que refletem no número, tamanho e estado de diferenciação das fibras musculares, bem como nas propriedades contráteis e metabólicas do músculo esquelético dos peixes (STICKLAND et al., 1988; MOKSNESS et al., 1995; VIEIRA & JOHNSTON, 1992; JOHNSTON, 1993; VALENTE et al., 1999). Tais alterações podem levar a diferenças nas taxas de crescimento muscular, refletindo no tamanho das larvas e dos adultos.

A temperatura ambiental promove o crescimento através de um efeito direto na secreção de hormônio do crescimento (GH) (GABILLARD et al., 2005). Alguns autores sugerem que a variação na temperatura pode alterar a proliferação e diferenciação de células-tronco miogênicas. Estes eventos são dirigidos por fatores regulatórios miogênicos, que desempenham um papel essencial na proliferação e diferenciação das fibras musculares (OLSON, 1992; RUDNICKI & JAENISCH, 1995).

Peixes incubados em temperatura acima daquelas mais freqüentes no ambiente costumam apresentar um número menor de fibras musculares de maior diâmetro e um maior número daquelas de pequeno diâmetro (STICKLAND et al., 1988; VIEIRA & JOHNSTON, 1992). Por outro lado, peixes de várias espécies incubados em baixas temperaturas apresentam um maior número total de fibras musculares, bem como de vértebras (STICKLAND et al., 1988; NATHANAILIDES et al., 1995).

Altas temperaturas durante o desenvolvimento podem ser teratogênicas ou causar efeitos em longo prazo na celularidade muscular (FINN, 2007). Em *Clupea harengus,* por exemplo*,* a síntese de miofibrilas ocorre em estádios mais avançados do desenvolvimento em embriões incubados em temperaturas mais baixas. Por exemplo, no estádio de 50 somitos, as miofibrilas são encontradas nas células dos 31 primeiros somitos a 12^{o}C, mas somente nos 20 primeiros somitos a 5^{o}C (JOHNSTON et al., 1997). Tais efeitos da temperatura no desenvolvimento podem influenciar a sobrevivência das larvas.

Os Siluriformes, representados pelos bagres, vêm apresentando destaque na piscicultura nacional. Dentre estes, o jundiá (*Rhamdia quelen*) é uma espécie de água doce nativa, adaptada a diferentes ambientes e que vem apresentando bons resultados em viveiros de piscicultura, principalmente no Sul do Brasil. A temperatura média das águas continentais no Sul do Brasil, onde se concentra a criação de jundiá, é bastante variável (15 a 30^{o}C) (CHIPPARI-GOMES et al., 1999; CARVALHO et al., 2003).

Neste capítulo foi discutido o efeito da temperatura de incubação na qualidade das pós-larvas obtidas, objetivando-se avaliar o potencial de formação de carne nesta espécie. O potencial de formação de músculo e a qualidade do mesmo foram avaliados pela composição centesimal, pela densidade e área transversal das fibras musculares presentes no músculo epaxial dos organismos em desenvolvimento. Estas características, podem afetar a qualidade da carne, indicando a melhor temperatura de incubação para obtenção de um melhor produto. Além disso, os resultados deste estudo contribuirão para o melhor entendimento do efeito das condições ambientais no desenvolvimento animal.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Obtenção dos ovos:

Os ovos de *Rhamdia quelen* (jundiá) foram obtidos no Laboratório de Pesquisa e Piscicultura (LAPEP) da PUCPR (São José dos Pinhais – PR). Durante o período reprodutivo da espécie, exemplares adultos foram induzidos a desovar por hipofização (injeção intramuscular de hipófise de carpa) (FIGURA 10 A). Após a fertilização *in vitro* (FIGURA 10 B), a água contendo os zigotos foi cuidadosamente trocada várias vezes para retirada do excesso de sêmen. Ao longo das lavagens, a temperatura da água foi gradativamente ajustada até atingir a temperatura desejada. Os zigotos foram rapidamente transportados para o Laboratório de Biologia Adaptativa (Departamento de Biologia Celular – UFPR), onde foram aclimatados e incubados em 18^{o}C, 21^{o}C, 24^{o}C, 27^{o}C e 30 ^{o}C.

4.2.2 Desenho Experimental:

Foram feitas três repetições dos bioensaios, sendo que cada um teve duração de 31 dias. O Bioensaio 1 foi realizado em dezembro de 2008, o Bioensaio 2, em janeiro de 2009 e o Bioensaio 3, em fevereiro de 2009.

Nos Bioensaios 1 e 2, amostras de zigotos foram incubadas em 21^{o}C, 24^{o}C, 27^{o}C e 30^{o}C, em duplicata. No Bioensaio 3, a temperatura de incubação foi de 18 ^{o}C, 21^{o}C, 24^{o}C e 27^{o}C, em triplicata (FIGURA 11 A). Cada réplica consistiu de uma caixa plástica de 30x12x9cm com água em temperatura controlada, contendo dez incubadoras (FIGURA 11 C e D). Os bioensaios foram montados em ambiente climatizado a 18^{o}C (Bioensaio 3) ou 21^{o}C (Bioensaios 1 e 2) e as temperaturas mais altas foram obtidas através de aquecedores termostatizados em cada caixa plástica (FIGURA 11 D).

Em cada incubadora (FIGURA 11 B), confeccionada com potes plásticos com tampa com capacidade para 150mL e aeração individual, foram colocados vinte zigotos. Os bioensaios foram realizados em sistema estático, sendo que água das

incubadoras foi trocada a cada sete dias. A água das caixas plásticas foram repostas à medida que sofreram evaporação.

Os embriões de cada incubadora em uma mesma caixa foram mantidos em experimento por tempos diferentes, de acordo o estádio do desenvolvimento, conforme descrito na TABELA 03 do capítulo 03. Ao completar os tempos referentes a cada estádio do desenvolvimento, os vinte embriões de cada incubadora foram coletados e o experimento desta incubadora, encerrado.

4.2.3. Amostragem:

Ao final dos tratamentos, os organismos foram retirados da incubadora com o auxílio de uma pipeta e após a retirada do excesso de água foram pesados. Parte das amostras foi congelada em nitrogênio líquido e mantida em freezer -80°C para posterior determinação da composição centesimal. Outras amostras foram fixadas em: Karnovisky (Paraformaldeído 2%, Glutaraldeído 2,5% em tampão Cacodilato 0,1M, pH 7,2 a 4°C) para análise da morfometria das fibras musculares, conforme descrito abaixo.

4.2.4 Morfometria das fibras musculares:

Cinco amostras de indivíduos no final do período pós larval/início do período juvenil (30 dias após a eclosão) de cada tratamento foram fixadas em solução Karnovsky por três horas, lavadas com tampão Cacodilato 0,1M, desidratadas e emblocadas em resina PolyEmbed. Os cortes semifinos (~1μm) foram obtidos com navalhas de vidro em ultramicrótomo Leica e corados com Azul de Toluidina Borificado. Três lâminas de cada amostra foram analisadas em um Microscópio Olympus 10AD. De cada lâmina foram capturadas 3 imagens com uma câmera Sony-Cyber Shot 13.6 MP acoplada ao microscópio e estas foram analisadas através do software Image Tool (v. 3.0). Foi determinada a área superficial de cinco células da musculatura lateral em cada imagem, totalizando 15 células de cada lâmina.

Para determinação da densidade de fibras foi utilizado o software Image J 1.42. Para tanto, foi contado o número de células da musculatura epaxial em seção

transversal no campo mais abrangente possível do corte, em um quadrante com área conhecida (90x90µm). As células foram divididas em dois grupos de acordo com o tamanho, sendo consideradas pequenas e grandes (FIGURA 13).

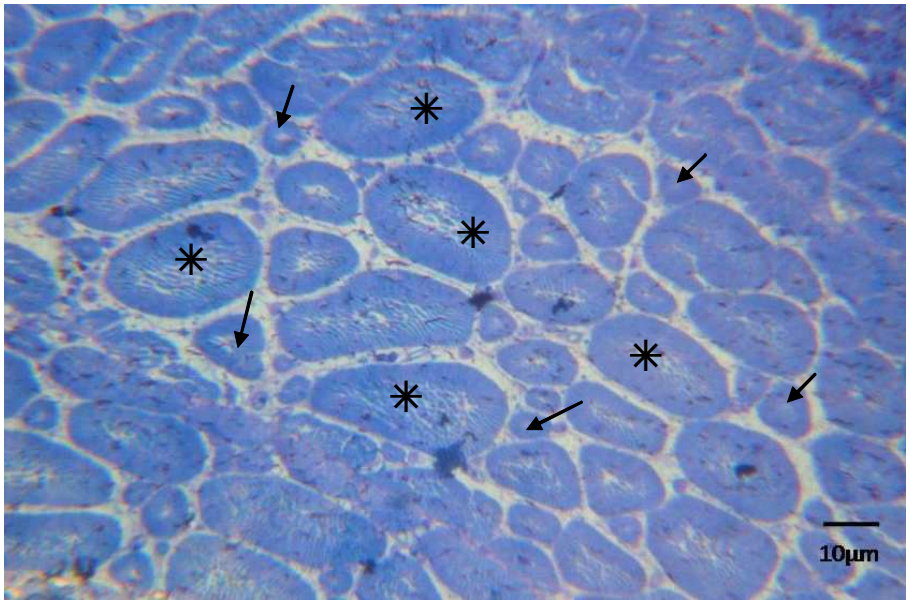


FIGURA 13. CORTE TRANSVERSAL DA MUSCULATURA EPAXIAL DE JUNDIÁ *Rhamdia quelen* INCUBADOS A 27℃.
LEGENDA:Os asteriscos indicam algumas fibras que foram consideradas como 'fibras maiores', enquanto que as setas apontam para algumas células consideradas como 'fibras menores'. Coloração: Azul de Toluidina Borificado.

4.2.5 Composição Centesimal:

O conteúdo total de proteínas, lipídios, umidade e cinzas foram determinados nas amostras de pós-larvas de jundiá. Para determinação do conteúdo de água das amostras, estas foram pesadas em cadinhos de cerâmica de peso conhecido, mantido a 65^{o}C e pesadas a cada 24h até a estabilização do peso. Após este processo foram queimadas em uma mufla Quimis® (500℃) por seis horas e pesadas novamente para determinação do conteúdo mineral de cada amostra. Esta última etapa foi realizada no Laboratório de Nutrição Animal da PUCPR.

Amostras de cada estágio foram retiradas do freezer -80^{o}C, e homogeneizadas em água destilada numa proporção de 1:4 ou 1:3 (massa:volume). Uma alíquota de 100 µL foi destinada a determinação de proteínas totais (adaptado a partir de LOWRY et al., 1951) e outra de 200-400 µL foi destinada a determinação de lipídios totais (adaptado a partir de FOLCH et al., 1957).

Para a extração de lipídios as alíquotas de 200-400µL das amostras homogeneizadas em água (conforme descrito acima), foram misturadas a duas partes de uma solução de clorofórmio:metanol (1:1), de modo a triplicar o volume, agitado no agitador mecânico (Vortex), deixado em repouso por 10 minutos e adicionada mais uma parte de clorofórmio, sendo mantidos a 4^{o}C por um período de 6 horas. Para que ocorresse a separação de fases, foi adicionada uma parte de solução salina (NaCl 0,9%), permanecendo novamente em repouso a 4^{o}C por mais seis horas. Decorrido o tempo descrito acima, a solução separou-se em duas fases, sendo a inferior clorofórmica e a superior aquosa. O sobrenadante (fase aquosa) foi aspirado com auxílio de uma pipeta Pasteur e descartado. A fase inferior (clorofórmica) foi filtrada e transferida para placas de Petri previamente pesadas, permitindo a evaporação sob capela de exaustão por cerca de 24 horas. As placas de Petri foram novamente pesadas após a completa evaporação. Foi calculada a diferença de peso entre as placas e calculada a concentração de lipídios presente no tecido inicial. Estas análises foram feitas em duplicata.

4.2.6 Estatística:

Os dados numéricos foram analisados através do software GraphPad Instat (v. 3.0). Após a verificação da homogeneidade através do teste Kolmogorov-Smirnov, foram aplicados testes paramétricos (ANOVA com pós-teste Tukey-Kramer). Os valores são expressos em média ± erro padrão da média.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Morfometria das fibras musculares:

Os pós larvas que apresentaram as fibras com maior ($p<0,05$) área superficial das fibras musculares foram aqueles incubados a 27ºC (GRÁFICO 06), apresentando 533,49 $\pm$ 9,85 μm^2 (n = 255; GRÁFICO 08 A). Os espécimes mantidos a 24ºC e a 30ºC apresentaram fibras com área inferior ($p<0,05$) às demais temperaturas, sendo de 343,37 $\pm$ 13,19 (n = 95) e 294,38 $\pm$ 12,37 μm^2 (n = 30); respectivamente (GRÁFICO 08 A). A incubação a 21ºC resultou em fibras com áreas intermediárias (420 $\pm$ 15,06 μm^2; n = 210; $p<0,05$).

A maior ($p<0,05$) densidade de fibras com a área maior foi observada nas pós larvas incubados a 21ºC (14,91 $\pm$ 1,02 fibras.μm^{-2}; n = 45) e a menor ($p<0,05$) densidade naqueles incubados a 27ºC (11,59 $\pm$ 0,44 fibras.μm^{-2}; n 37) (GRÁFICO 08 B). Os espécimes incubados a 24 e 30ºC apresentaram densidade intermediária de fibras maiores, sendo estatisticamente semelhantes às demais temperaturas (12,07 $\pm$ 0,55, n= 14 e 12,67 $\pm$ 0,33, n = 3, respectivamente). Os diferentes tratamentos não provocaram diferenças significativas na densidade de fibras menores, nem tampouco na densidade total de fibras musculares epaxiais (GRÁFICO 08 B).

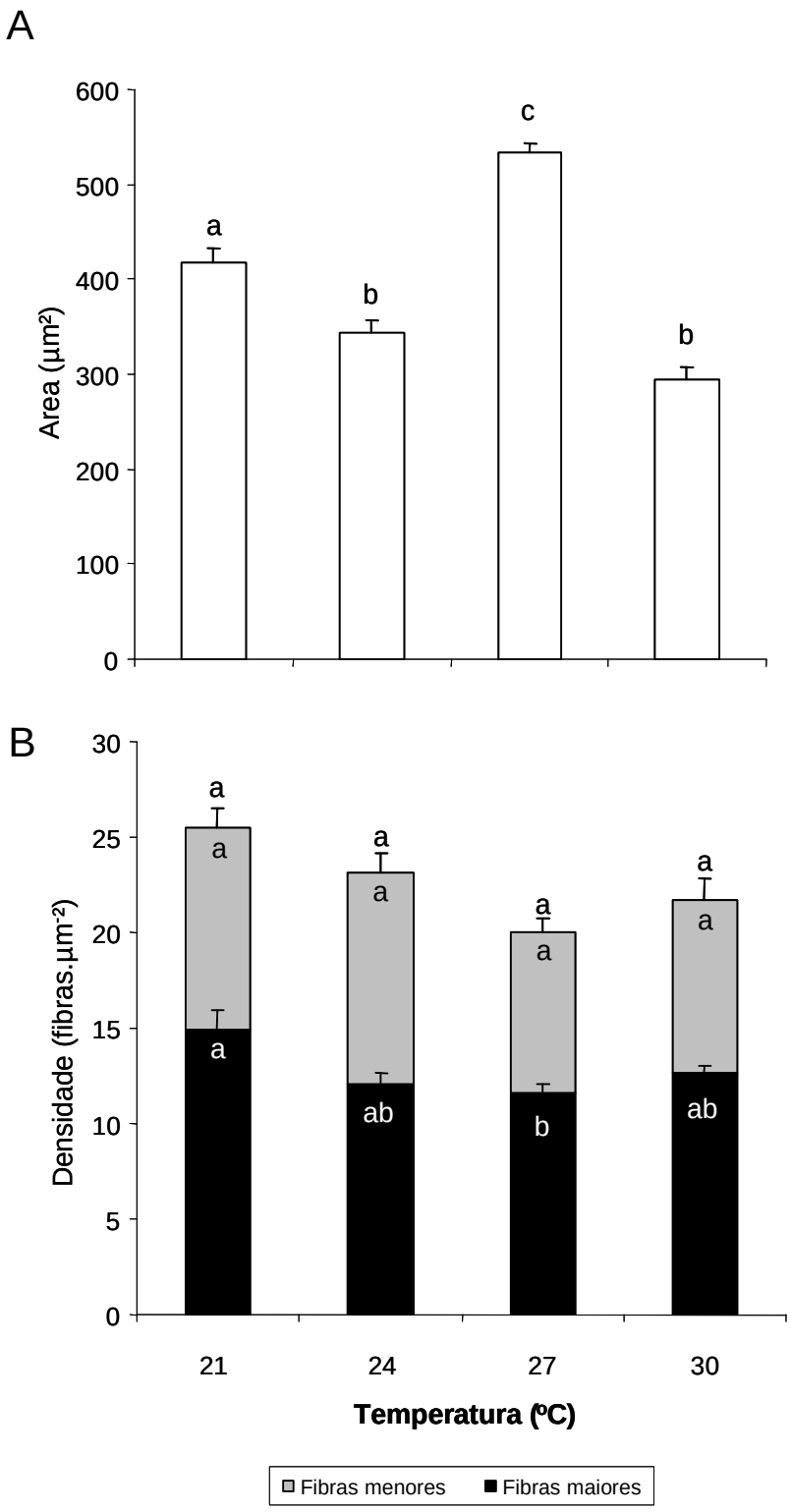


GRÁFICO 08. MORFOMETRIA DAS FIBRAS MUSCULARES DE PÓS LARVAS DE JUNDIÁ *Rhamdia quelen*.

LEGENDA: (A) Área (μm^2) das fibras musculares e (B) densidade de fibras maiores e menores por μm^2. Os valores são médias ± erro padrão da média. ANOVA: $p<0,05$ para densidade de fibras maiores e $p>0,05$ para fibras menores e densidade total de fibras. Tukey-Kramer: letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa ($p<0,05$) para área e para densidade total de células. Letras diferentes dentro das barras cinza indicam diferença significativa ($P<0,05$) para densidade de fibras menores, e dentro das barras pretas para densidade de fibras maiores.

4.3.2 Composição Centesimal:

O conteúdo de água nas amostras de pós–larvas (estádio 28) incubadas nas quatro temperaturas experimentais não apresentou diferença significativa, representando, em média 81,14%, do peso dos animais (GRÁFICO 09 A).

O conteúdo total de proteína nas pós-larvas de jundiá apresentou-se semelhante nos espécimes incubados em todas as temperaturas, representando, em média 13,52%, do peso dos animais (GRÁFICO 09 A,B). A incubação também não alterou o conteúdo médio de lipídios totais (2,87 %) e cinzas (3,17%) (GRÁFICO 09 A,B).

Vale notar que, embora a média de valores para lipídios seja menor a 30^{o}C, os testes aplicados não apontaram para diferenças significativas. Este resultado pode ser conseqüência do número baixo de amostras disponíveis nesta temperatura (n=4) em comparação às demais (9< n < 12). Para proteínas, analisou-se 6 amostras de 30^{o}C e 12 a 13 amostras de cada uma das demais temperaturas. O número menor de amostras disponíveis a 30^{o}C deveu-se ao fato de que, nesta temperatura, tenha ocorrido maior mortalidade (ver Cap. III desta dissertação).

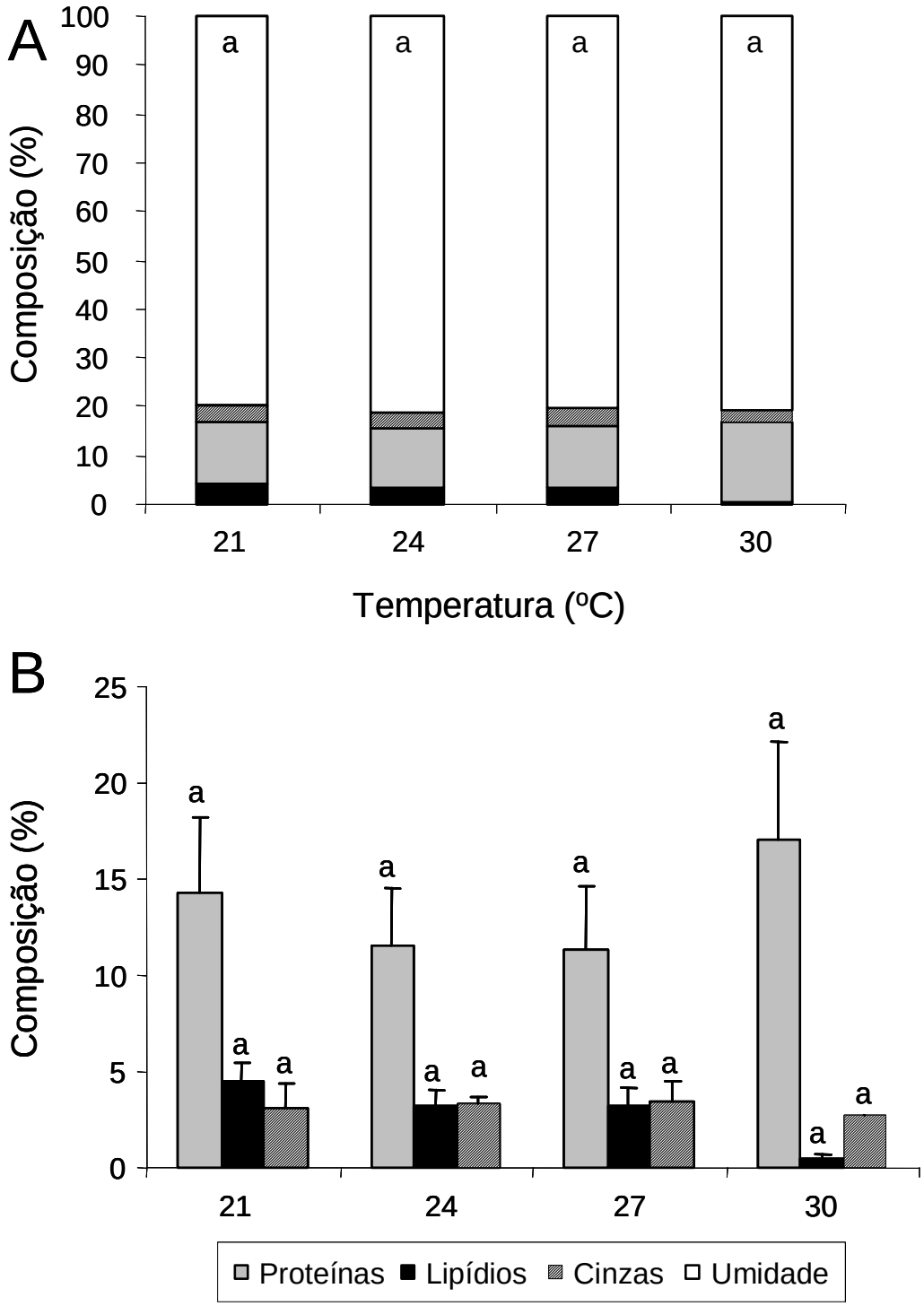


GRÁFICO 09. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DE PÓS LARVAS DE JUNDIÁ *Rhamdia quelen*
LEGENDA: (A) Porcentagem de água (umidade), proteínas, lipídios e cinzas (matéria mineral). (B) Porcentagem de proteínas, lipídios e cinzas (matéria mineral). ANOVA: $p > 0,05$. Tukey-Kramer: letras diferentes sobre as barras em A indicam diferença significativa ($P<0,05$) para umidade, e, em B, para proteínas, lipídios e cinzas

4.4 DISCUSSÃO

A qualidade da carne pode ser fortemente influenciada por fatores extrínsecos, como a composição da dieta e fatores ambientais, pois alteram as características metabólicas, modificando as propriedades bioquímicas e estruturais do tecido muscular (JONHSTON, 1999; JONHSTON et al., 2000). Durante os períodos de crescimento e engorda, as condições de cultivo podem influenciar nas características da musculatura, alterando as propriedades da carne utilizada para consumo humano. Do ponto de vista do consumidor, entre as qualidades mais importantes atribuídas aos produtos derivados de peixes estão as propriedades sensoriais, tais como coloração, textura, odor e sabor (BOGGIO et al., 1985).

O efeito das condições de cultivo, especialmente da alimentação, na qualidade, estabilidade na estocagem, rendimento de produção e propriedades físicas e sensoriais da carne dos peixes vem sendo amplamente estudado, especialmente em salmonídeos (e.g. JOHANSSON & KIESSLING, 1991; FAUCONNEAU et al., 1993; GUILLOU et al., 1995; KAUSHIK et al., 1995; WATHNE, 1995; SHEEHAN et al., 1996; BJERKENG et al., 1997; GJEDREM, 1997; EINEN & SKREDE, 1998; EINEN & THOMASSEN, 1998; CORRAZE & KAUSHIK, 1999; RASMUSSEN et al., 2000; REFSTIE et al., 2001; REGOST et al., 2001). Como exemplo, a coloração da carne de salmonídeos é um parâmetro importante para os consumidores e pode ser modificado através de alterações na dieta (TORISSEN, 1985; CHOUBERT et al., 1991 BJERKENG. et al., 1997; EINEN & ROEM, 1997; EINEN & SKREDE, 1998).

No entanto, a literatura dispõe de poucas informações sobre o efeito dos fatores ambientais na qualidade do produto final. Alguns estudos demonstraram que peixes criados intensivamente, apresentaram textura e características sensoriais mais agradáveis do que aqueles criados naturalmente (CORRAZE et al., 1996; ORBAN et al., 1996). Além disso, a piscicultura intensiva produz peixes com carne mais rica em ácidos graxos monoinsaturados, mas com menor teor de polinsaturados (ORBAN et al., 1996). Os lipídios contidos na dieta são os principais responsáveis pelas características nutricionais e sensoriais da carne de peixes. Waagabø e colaboradores (1993) mostraram que a composição de ácidos graxos acumulados no músculo altera o sabor e a textura da carne de peixe. O conteúdo de

lipídios, água e a própria geometria das fibras contribui, ainda, para a ‘suculência’ da carne nos testes organolépticos (DUNAJSKI, 1979).

No presente estudo, a incubação de *R. quelen* desde a fertilização até o período de pós-larva não causou alteração significativa no conteúdo total de proteínas, lipídios, minerais e água. Isto sugere que, nesta espécie, as propriedades nutricionais e organolépticas relacionadas à composição centesimal não seriam influenciadas pela temperatura, pelo menos neste período de vida. Entretanto, estudos especificando a natureza dos ácidos graxos e aminoácidos presentes, bem como em estádios mais avançados do desenvolvimento, seriam necessários para aprofundar estas conclusões.

Embora não tenha havido diferença significativa, verificou-se uma tendência à diminuição da densidade das fibras com o aumento da temperatura nos peixes incubados entre 21 e 27^{o}C. A tendência à menor densidade de fibras a 27^{o}C é um reflexo do aumento da área transversal das fibras musculares, indicando a maior ocorrência de hipertrofia nesta temperatura. Outros fatores, como por exemplo, o exercício físico, são conhecidos por estimular a hipertrofia muscular em peixes (JOHNSTON & MOON, 1980). As pós larvas de *R. quelen* incubadas a 24 e 30^{o}C, no entanto, apresentaram uma porcentagem menor de fibras de maior diâmetro, sugerindo um crescimento predominantemente hiperplásico nessas temperaturas.

O crescimento corporal de peixes teleósteos, avaliado através do tamanho das fibras musculares esqueléticas, pode ser afetado pela temperatura da água, como foi mostrado no presente trabalho, corroborando outros estudos, como por exemplo, com *Clupea harengus* (JONHSTON et al.,1998), *Salmo salar* (JOHNSTON et al., 2003) e *Gadus morhua* (JONHSTON & ANDERSEN, 2008). Para o bacalhau (*Gadus morhua*), não houve diferença significativa entre os dois parâmetros analisados (diâmetro e número de fibras) em larvas eclodidas a 4 e 7℃, entretanto o tratamento a 10℃ resultou em aproximadamente 14% mais fibras musculares (JONHSTON & ANDERSEN, 2008). Em *Clupea harengus*, o número de fibras musculares dos juvenis foi 23,4% maior a 12℃ que a 5℃ (JONHSTON et al., 1998), mostrando que a temperatura afeta o desenvolvimento muscular de peixes.

No presente estudo, eram esperadas maiores áreas transversais a 30^{o}C, visto que, em geral, temperaturas mais altas causam aumento na espessura das fibras musculares (STICKLAND et al., 1988; VIEIRA & JOHNSTON, 1992). No entanto, vale lembrar que, de acordo com o resultados apresentados no Capítulo III

dessa dissertação, houve intensa mortalidade e altos níveis de malformações anatômicas nesta temperatura, indicando alterações metabólicas, que, entre outras coisas, podem ter afetado o crescimento muscular.

O número e o tamanho das fibras musculares presentes está diretamente relacionado à textura do tecido. Johnston e colaboradores (2000) relacionaram a textura do filé com densidade de fibras musculares do salmão do Atlântico (*Salmo salar*) e concluíram que, a manipulação da celularidade do músculo é indicada para melhorar a qualidade da carne do peixe. A textura e, consequentemente, o valor comercial da carne, está ainda associada ao conteúdo de colágeno presente no músculo dos peixes (MONTERO & BORDERIAS, 1990). Sivakumar e colaboradores (2000) verificaram alterações fisico-químicas na estrutura e nas propriedades do colágeno dos peixes submetidos a ambientes poluídos, indicando que a qualidade da água pode influenciar nas propriedades físico-químicas do produto final e, como conseqüência, pode influenciar na qualidade da carne para o consumo humano (SIVAKUMAR et al., 2000). Em *Clupea herring* o número de fibras musculares dos juvenis foi 23,4% maior a 12℃ que a 5℃ (JONHSTON et al., 1998), mostrando que a temperatura realmente afeta o desenvolvimento muscular de peixes. Este dado corrobora o presente estudo, no qual a temperatura mais alta resulta em um número maior de fibras musculares.

Em suma, os presentes resultados demonstraram que a temperatura entre 21 e 30^{o}C não afetou a composição centesimal de pós-larvas de *R. quelen*, embora tenha afetado a celularidade muscular. A incubação de *R. quelen* a 27^{o}C, resultou em juvenis com fibras musculares mais espessas, o que pode representar um maior potencial para formação de carne sob essas condições. Esses resultados podem contribuir para melhoria da larvicultura desta importante espécie nativa de crescente interesse comercial.

4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BJERKENG, B. REFSTIE, S. FJALESTAD, K. T. STOREBAKKEN, T. RØDBOTTEN, M. ROEM, A. J. Quality parameters of the flesh of Atlantic salmon (*Salmo salar*) as affected by dietary fat content and full-fat soybean meal as a partial substitute for fish meal in the diet. *Aquaculture*, v. 157, n. 3-4, p. 297-309, 1997.

BOGGIO, S.M. HARDY, R.W. BABBITT, J.K. BRANNON, E.L. The influence of dietary lipid source and alpha-tocopheryl acetate level on product quality of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, v. 5, n.1, p. 13-24, 1985.

CARVALHO, P., THOMAZ, S.M., BINI, L.M. Effects of water levels, abiotic and abiotic factors on bacterioplankton abundance in lagoons of a tropical floodplain (Paraná River, Brazil). *Hydrobiologia.* v. 510, p.67– 74, 2003.

CHIPPARI-GOMES, A.R., GOMES, L.C., BALDISSEROTTO, B. Lethal temperatures for Silver Catfish, *Rhamdia quelen*, fingerlings. J. *Appl. Aquacult*., v.9, p.11–21, 1999.

CHOUBERT, G., DE LA NOÜE, J. BLANC, J-M. Apparent digestibility of canthaxanthin in rainbow trout: effect of dietary fat level, antibiotics and number of pyloric caeca. *Aquaculture*, v.99, p.323–329, 1991.

CORRAZE, G., KAUSHIK, S., CHOUBERT, G., ARZEL, J., GUILLAUME, J.; FAUCONNEAU, B. Nutrition of fish and nutritional and organoleptic quality. *Pisciculture Française*, 124, 22-24, 1996.

DUNAJSKI, E. Texture of fish muscle. *J. Texture Stud.*, v.10, p.301–318, 1979.

EINEN, O. SKREDE, G. Quality characteristics in raw and smoked fillets of Atlantic salmon, *Salmo salar*, fed high-energy diets. *Aquacult. Nutr*., v.4, p.99-108, 1998.

EINEN, O. ROEM, A. J. Dietary protein/energy ratios for Atlantic salmon in relation to fish size: growth, feed utilization and slaughter quality. *Aquaculture Nutrition, v.* 3, p. 115–126, 1997.

EINEN, O. THOMASSEN, M. S. Starvation prior to slaughter in Atlantic salmon (*Salmo salar*): II. White muscle composition and evaluation of freshness, texture and colour characteristics in raw and cooked fillets. *Aquaculture*, v.1, p. 37-53, 1998.

FAUCONNEAU, B.; CHMAITILLY, J.; ANDRE, S.; CARDINAL, M.; CORNET, J.; VALLET, J.L.; DUMON, J.P.; LAROCHE, M.; Caractéristiques de la chair de truite arc en ciel: II. Composantes physiques et sensorielles. *Sci. Alim*., 13, 188-199, 1993.

FINN, R.N. The physiology and toxicology of salmonid eggs and larvae in relation to water quality criteria. *Aquatic Toxicology*, 81, 337-354, 2007.

FOLCH, J. LEES, M. STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 497-509, 1957.

GABILLARD, J.C.; WEIL, C.; RESCAN, P.Y.; NAVARRO, I.; GUTIERREZ, J.; LE BAIL, P.Y. Does the GH/IGF system mediate the effect of water temperature on fish growth? *Areview Cybium*, 29, 2, 107-117, 2005.

GREER-WALKER, M., PULL, G.A. A survey of red and white muscle in marine fish. *J. Fish Biol*., 7, 295– 300, 1970.

GUILLOU, A. SOUCY, P. KHALIL, M. ADAMBOUNOU, L.. Effects of dietary vegetable and marine lipid on growth, muscle fatty acid composition and organoleptic quality of flesh of brook charr (*Salvelinus fontinalis*). *Aquaculture*, v.136, n. 3-4, p. 351-362, 1995.

HATAE, K. YOSHIMATSU, F. MATSUMOTO, J. J. Role of Muscle Fibers in Contributing Firmness of Cooked Fish. *Journal of Food Science*, v.55, p.693 – 696, 1990.

HURLING, R. RODELL, J.B. HUNT, H.D. Fiber diameter and fish texture. Journal of Texture Studies, v. 27, p. 679 – 685, 1996.

JOHANSSON, L.; KIESSLING, A. Effects of starvation on rainbow trout and eating and storage qualities of iced and frozen fish. *Acta Agriculturae Scandinavica*, v. 41, n.2, p. 207-216, 1991.

JOHNSTON, I.A. Phenotypic plasticity to temperature change in fish. In: Rankin, C., Jensen, F.B. (Eds.),Fish Ecophysyology. Chapman & Hall, London, pp. 322–340, 1993.

JOHNSTON, I.A. Genetic and environmental determinants of muscle growth patterns. In: Johnston, I.A. (Ed.), Muscle Development and Growth. *Fish Physiology Series* (San Diego), 18, 141–186, 2001.

JOHNSTON, I.A. Muscle development and growth: potential implication for flesh quality in fish. *Aquaculture,* 177, 99–115, 1999.

JOHNSTON, I. A. ANDERSEN, Ø. Number of muscle fibres in adult Atlantic cod varies with temperature during embryonic development and pantophysin (*Pan*I) genotype. *Aquatic Biology*, v. 4, p.167–173, 2008.

JOHNSTON, I. A. AND MOON, T. W. Exercise training in skeletal muscle of the

brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *J. Exp. Biol., v.*87, p.177-194, 1980.

KAUSHIK, S. J. CRAVEDI, J. P. LALLES, J. P. SUMPTER, J. FAUCONNEAU, B. LAROCHE, M. Partial or total replacement of fish meal by soybean protein on growth, protein utilization, potential estrogenic or antigenic effects, cholesterolemia and flesh quality in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss.* *Aquaculture*, v. 133, n. 3-4, p. 257-274, 1995.

LOWRY, O.H. ROSEBROUGH, N.J. FARR, A.L. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, p. 265-275, 1951.

MOKSNESS, E., ROSENLUND, G., LIE, O. Effect of fish meal quality on growth of juvenile wolfish, *Anahichas lupus L*. *Aquac. Res*. 26, 109– 115, 1995.

MONTERO, P. BORDERIAS, J. Effect of rigor mortis and ageing on collagen in trout (*Salmo irideus*) muscle. *Journal of the Science food and Agriculture*, v. 52 n. 1, p.141 – 146, 1990.

NATHANAILIDES, C., LOPES-ALBROS, O., ABELLAN, E., VAZQUER, J.M., TYLER, D.D., ROWLERSON, A., STICKLAND, N.C. Muscle cellularity in relation to somatic growth in the European sea bass *Dicentrarchus labrax* (L). Aquac. Res. 27, 885–889, 1995

OLSON, E.N. Interplay between proliferation and differentiation within the myogenic lineage. *Dev. Biol.,* 154, 261–272, 1992.

ORBAN, E., SINESIO, F., PAOLETTI, F., NICOLI, S., CASINI, I, CAPRONI, R.; MONETA, E. NUTRITIONAL AND ORGANOLEPTIC OF SEA BREAM (*PAGRUS AURATA*) GROW IN AQUACUTURE: EFFECT OF DIFFERENT METHODS OF CULTURE ON FISH QUALITY. *RIV. DI SCIENZ. ALIMENT.*, 25, 27-36, 1996.

REFSTIEA, S. STOREBAKKEN, T. BAEVERFJORDA, G. ROEM, A. J. Long-term protein and lipid growth of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets with partial replacement of fish meal by soy protein products at medium or high lipid level. *Aquaculture*, v. 193, n.1-2, p. 91-106, 2001.

REGOST, C. ARZEL, J. CARDINAL, M. ROBIN, J. LAROCHE M. KAUSHIK, S. J. Dietary lipid level, hepatic lipogenesis and flesh quality in turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture*, v.193, p.291-309, 2001.

RASMUSSEN, R.S. OSTENFELD, T.H. RØNSHOLDT. MCLEAN. Manipulation of end-product quality of rainbow trout with finishing diets. *Aquaculture Nutrition*, v. 6, n. 1, p.17-23, 2000.

RUDNICKI, M. A. & JAENISCH, R. The MyoD family of transcription factors and skeletal myogenesis. *BioEssays, v.* 17**,** p**.**203–209, 1995.

SHEEHAN, D V; HARNETT-SHEEHAN, K; RAJ, B A. The measurement of

disability. *International Clinical Psycopharmacology*, v. 11, 1996.

SIVAKUMAR, P. ARICHANDRAN, R. SUGUNA, L. MARIAPPAN, M. CHANDRAKASAN, G. The composition and characteristics of skin and muscle collagens from a freshwater catfish grown in biologically treated tannery effuent water. *Journal of fish biology*, v. 56, n.4, p.999 – 1012, 2000.

STICKLAND, N.C., WHITE, R.N., MESCALL, P.E., CROOK, A.R., THORPE, J.E. The effect of temperature on myogenesis in embryonic development of the Atlantic salmon (*Salmo salar L*). *Anat. Embryol.,* 178, 253– 258, 1998.

STOIBER, W., SANGER, A.M. An electron microscopic investigation into the possible source of new muscle fibre in teleost fish. *Anat. Embryol.*, 194, 569– 579, 1996.

TORRISSEN, O.J. Pigmentation of salmonids: factors affecting carotenoid deposition in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, v.46, p.133–142, 1985.

VALENTE, L.M.P., ROCHA, E., GOMES, E.F.S., SILVA, M.W., OLIVEIRA, M.H., MONTEIRO, R.A.F., FAUCONNEAU, B. Growth dynamics of white and red muscles in fast and slow growing strains of rainbow trout*. J. Fish Biol*., 55, 675–691, 1999.

VEGGETTI, A., MASCARELLO, F., SCAPOLO, P.A., ROWLERSON, A. Hyperplastic and hypertrophic growth of lateral muscle in *Dicentrarchus labrax (L.).* An ultrastructural and morphometric study. *Anat. Embryol.*, 182, 1 – 10, 1990.

VIEIRA, V.L.A., JOHNSTON, I.A. Muscle development in the tambaqui, an important Amazonian food fish. *J. Fish Biol,.* 49, 842–852, 1992.

WAAGBØ, R.; SANDNES, K.; TORRISSEN, O. J.; SANDVIN, A.; LIE, Ø. Chemical and sensory evaluation of fillets from Atlantic salmon *Salmo salar* fed three levels of ny3 fatty acids at two levels of vitamin E. *Food Chem*., v.46, p.361-366, 1993.

WATHNE, E. Strategies for directing slaughter quality of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) with emphasis on diet composition and fat deposition. Dr scient. thesis, Agricultural University of Norway, Ås, Norway. 230 p, 1995.

Capítulo V – INFLUÊNCIA DO CÓRION E OBTENÇÃO DE UM PROTOCOLO PARA MELHOR FIXAÇÃO DE EMBRIÕES DE *Rhamdia quelen* PARA MICROSCOPIA DE LUZ E ELETRÔNICA DE VARREDURA NAS CONDIÇÕES PADRÃO DE DESENVOLVIMENTO (25℃ ±1℃) [‡‡]

[‡‡] O conteúdo deste capítulo é parte integrante do capítulo de livro: Ortolani-Machado, C.F., Rios, F.S.; Freitas, P.F., Okada, M.A., Rodrigues-Galdino, A.M., Maiolino, C.V., Tamada, M.H. Métodos para manipulação e preparo de embriões e larvas. In: C.A. Oliveira-Ribeiro; S.R. Grotzner & H. S. dos Reis-Filho (Eds.) Técnicas e Métodos para Utilização Prática em Microscopia,Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan (*in press*).

5.1 INTRODUÇÃO

Trabalhos prévios deste grupo de pesquisa demonstraram dificuldades na preservação da ultraestrutura dos embriões. Acredita-se que a membrana coriônica (córion) e o espaço perivitelino atuem como barreiras que dificultam a penetração do fixador. Sendo assim, este capítulo, apresentará o resultado de um teste para fixação dos embriões tanto em microscopia de luz, quanto em microscopia eletrônica de varredura, favorecendo a melhoria do material produzido doravante por este, bem como por outros grupos de pesquisa.

5.1.1 Apresentação

Embriões e larvas de peixes têm sido amplamente empregados no estudo da biologia do desenvolvimento dos vertebrados, assim como para a melhoria da produção de pescado. Os peixes representam um grupo muito amplo e diversificado, no entanto, a maioria das espécies libera grande quantidade de ovos seja por desova espontânea ou induzida. Salvo exceções, a fertilização e o desenvolvimento são externos e os embriões apresentam córion transparente, permitindo a fácil visualização de todas as fases do desenvolvimento.

Dependendo da espécie escolhida para o estudo, a manutenção das matrizes é muito simples, demandando estrutura simples e de baixo custo. A incubação dos ovos pode ser feita em larga escala ou em pequenas incubadoras, de acordo com os objetivos, e dentro de uma faixa de temperatura relativamente ampla. O desenvolvimento é rápido, sendo que, na maior parte das espécies, o período embrionário leva de 24 a 48h e o desenvolvimento larval costuma durar alguns poucos dias.

Aliados às vantagens supracitadas estão os fatos de os embriões de peixes poderem ser induzidos a mutações, manipulados geneticamente para indução de transgenia, o que, dentre outras propriedades do grupo, permite amplo estudo dos aspectos moleculares do desenvolvimento.

As principais dificuldades encontradas no processamento histológico de embriões e larvas de peixes são o tamanho reduzido e a presença do vitelo. Em procedimentos de rotina utilizando xilol, geralmente parte do vitelo é extraído e, por

este ocupar área considerável no corpo, muitas vezes danifica a amostra. Além disso, o xilol frequentemente endurece muito rapidamente estas amostras de pequeno tamanho, tornando-as quebradiças. Estas pequenas amostras, quando emblocadas em parafina ou Paraplast, são, ainda, dificilmente visualizadas dentro do bloco, o que dificulta a microtomia. Devido às dificuldades citadas acima, recomenda-se a utilização de historesina plástica para obter cortes histológicos de embriões e larvas de peixes, embora a parafina ou Paraplast também possam ser usados, dependendo dos objetivos.

5.1.2 Fixação

O fato de os embriões e larvas de peixes estarem em meio aquático e de haver uma quantidade proporcionalmente grande de água no espaço perivitelino (entre o organismo e o córion), este envoltório pode representar uma dificuldade na fixação, já que a água pode diluir e alterar a osmolaridade do fixador. É necessário, portanto, evitar ao máximo a presença de água em associação à amostra. Para tanto, recomenda-se coletar os organismos com uma pipeta, que deve ser colocada na posição vertical para que as amostras desloquem-se para a ponta por ação da gravidade e só depois, liberar o conteúdo da pipeta para uma placa de Petri. Deve-se permitir a saída dos embriões que estiverem na ponta da pipeta, impedindo a saída de toda a água. Na placa de Petri, o excesso de água pode ser retirado cuidadosamente com auxílio de uma seringa com agulha ou mesmo simplesmente inclinando levemente a placa para que a água se espalhe em sua superfície. Em seguida, com a pipeta vazia, coletar novamente os embriões e transferi-los para o tubo contendo o fixador. Com a prática, este procedimento pode ser feito diretamente para dentro do frasco com fixador. Entretanto, a vantagem de colocá-los na placa de Petri é que os embriões podem ser selecionados e contados mais facilmente.

Outro modo de fixar os embriões com o mínimo de água consiste em transferir as amostras que estão na ponta da pipeta para a parte interna da tampa de um microtubo de centrífuga contendo o fixador. Com auxílio de uma seringa com agulha, aspirar o máximo de água que esteja em contato com a amostra. Em seguida, fechar o tubo cuidadosamente tomando-se o cuidado para que nenhum

embrião fique na borda do recipiente e inverter delicadamente o microtubo, de modo que os embriões entrem em contato com a solução fixadora.

O método de fixação escolhido dependerá dos objetivos do estudo, bem como de particularidades do material biológico. Vários fixadores vem sendo utilizados para microscopia de luz de embriões e larvas de peixes, incluindo o ALFAC e o Fluido de Bouin. Nosso grupo de pesquisa tem obtido bons resultados com paraformaldeído 4% em tampão PBS 0,1M ou tampão fosfato 0,1M em amostras que posteriormente serão emblocadas em historesina. O fixador Karnovsky, normalmente utilizado para microscopia eletrônica, produz excelentes resultados quando o material é emblocado com historesina e processado rotineiramente para microscopia de luz, embora represente um aumento nos custos do processamento.

O tempo de fixação varia com o tamanho da peça e a composição do córion, sendo que o volume do fixador deve ser aproximadamente 20 vezes maior do que aquele do material a ser fixado. Embriões e larvas de peixes devem permanecer de duas a três horas imersos no fixador, ou mesmo por um período maior, porém não excedendo vinte e quatro horas. A fixação pode ocorrer em temperatura ambiente ou sob refrigeração, considerando que esta será mais lenta em temperatura baixa. Portanto, caso haja a necessidade de manter as amostras por mais tempo no fixador, estas devem permanecer a 4℃.

5.1.3 Testes de Fixação para Embriões de Peixes

Foi realizado um teste de fixação de embriões de jundiá (*Rhamdia quelen*) empregando dois tipos de tampão, dois tempos de fixação e avaliando a influência da presença do córion na fixação. O objetivo de se testar dois tipos de tampão foi o de substituir o tampão PBS, rotineiramente utilizado, pelo tampão fosfato que apresenta menor custo e maior praticidade no preparo. Hipoteticamente, o córion que reveste os embriões poderia representar uma barreira que retardaria a penetração do fixador. A fixação de embriões sem córion objetivou a obtenção de melhoria na qualidade do material fixado. O teste dos tempos de 3h e 24h de imersão no fixador teve a finalidade de verificar a possibilidade de prolongar o tempo de fixação, uma vez que, durante os experimentos com estes animais, cujo

desenvolvimento é muito rápido, muitas vezes as lavagens e trocas em curto espaço de tempo se tornam inviáveis devido à dinâmica dos experimentos.

Assim sendo, para este teste, utilizaram-se embriões de *R. quelen* de um mesmo lote no período de segmentação (estádio 16), que foram fixados em nove diferentes condições, conforme especificado na TABELA 04.

As amostras fixadas foram lavadas com o respectivo tampão e processadas conforme descrito a seguir para inclusão em historesina plástica. Cortes de aproximadamente 4 µm corados com Hematoxilina-Eosina foram analisados e não foram detectadas diferenças que pudessem ser atribuídas à fixação. Portanto, qualquer um dos métodos de fixação acima citados podem ser utilizados, obtendo-se bons resultados.

TABELA 04 - SITUAÇÕES DE FIXAÇÃO PARA MICROSCOPIA DE LUZ A QUE FORAM SUBMETIDOS EMBRIÕES DE *Rhamdia quelen* EM SEGMENTAÇÃO (ESTÁDIO 16).

Situação	**Córion**	**Solução Fixadora**	**Tempo**
1	com	Paraformaldeído 4% em Tampão PBS, pH 7,4	3h
2	sem	Paraformaldeído 4% em Tampão PBS, pH 7,4	3h
3	com	Paraformaldeído 4% em Tampão fosfato, pH 7,4	3h
4	sem	Paraformaldeído 4% em Tampão fosfato, pH 7,4	3h
5	com	Paraformaldeído 4% em Tampão PBS, pH 7,4	24h
6	com	Paraformaldeído 4% em Tampão fosfato, pH 7,4	24h
7	sem	Paraformaldeído 4% em Tampão PBS, pH 7,4	24h
8	sem	Paraformaldeído 4% em Tampão fosfato, pH 7,4	24h

NOTA: Nestas situações variou o tipo de tampão, o tempo de permanência na solução fixadora e a presença de córion ao redor do embrião.

Receitas dos fixadores utilizados no teste:

- Paraformaldeído 4% em Tampão PBS 0.1M, pH 7,4
  - Solução Paraformaldeído 8%
  - Tampão PBS 1M
  - Água Destilada qsp
- Paraformaldeído 4% em Tampão fosfato 0.1M, pH 7,4
  - Solução Paraformaldeído 8%
  - Tampão Fosfato de Sódio Monobásico 0,2M
  - Tampão Fosfato de Sódio Dibásico 0,2M

5.1.4 Procedimento de Retirada do Córion dos Embriões de Peixes

Em muitas situações a retirada do córion se faz necessária antes ou após a fixação. A retirada do córion anteriormente à fixação permitiria penetração mais rápida do fixador, embora não tenham sido detectadas diferenças entre embriões fixados com e sem córion, conforme descrito acima. O córion também pode ser retirado após a fixação, permitindo melhor penetração da resina de emblocagem, não obstante não seja um procedimento obrigatório. Contudo, a retirada do córion é imperativa na microscopia eletrônica de varredura.

Embora existam técnicas de digestão enzimática do córion, na maioria das espécies de peixes é possível retirar-se manualmente o córion, especialmente nas espécies que apresentam amplo espaço perivitelino. O espaço perivitelino é aquele compreendido entre o córion e o corpo do embrião (FIGURA 14). O fato de o córion ser transparente permite que o corpo do embrião seja preservado durante a manipulação. A retirada manual do córion após a fixação é mais simples em amostras já fixadas devido à mudança de consistência da amostra.

Os embriões devem ser colocados em uma placa de Petri plástica, pois estas apresentam maior atrito que as de vidro, facilitando o procedimento. Durante o procedimento, o embrião deve permanecer coberto por líquido, seja água da incubadora no caso de embriões não fixados, ou o tampão utilizado no fixador ou ainda álcool 70% se o procedimento for realizado após a fixação. Sob o microscópio convencional ou estereoscópico e com o auxílio de duas agulhas de acupuntura deve-se perfurar o córion, tomado o cuidado de não danificar o embrião. Com uma das agulhas então, deve-se segurar o córion e, com a outra deve-se rasgá-lo, permitindo a saída do embrião de dentro do mesmo. Em seguida, deve-se prosseguir com o processamento normalmente.

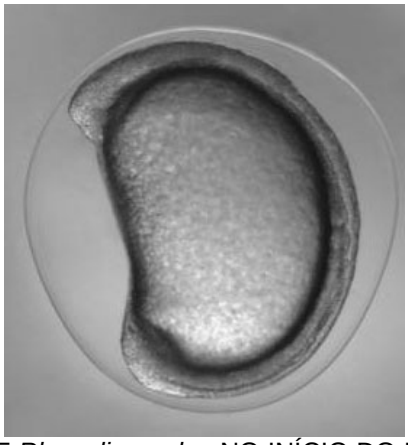


FIGURA 14. EMBRIÃO VIVO DE *Rhamdia quelen* NO INÍCIO DO PERÍODO DE SEGMENTAÇÃO. LEGENDA: (Estádio 16), mostrando a membrana coriônica (córion) envolvendo-o e o amplo espaço perivitelino.

5.1.5 Lavagem e Desidratação

Decorrido o tempo de fixação, as amostras devem ser lavadas pelo menos três vezes com o mesmo tipo de tampão utilizado no fixador ou com água caso o fixador não seja tamponado. Para embriões e larvas, cada lavagem deve durar de 10 a 15 min. Independente da solução de lavagem utilizada, deve-se manter as amostras em álcool 50% por 10 min antes de prosseguir com o processamento. Caso não seja possível proceder a emblocagem no mesmo dia, recomenda-se armazenar as amostras em álcool 70% pelo mínimo de tempo possível. Embora um tempo maior seja viável, é aconselhável não exceder três dias.

A desidratação de embriões e larvas de peixes deve ser rápida, devido ao tamanho reduzido das amostras. Utiliza-se o protocolo de desidratação em série alcoólica crescente, permanecendo, não mais que 10 minutos em cada solução alcoólica. Em seguida procede-se o protocolo de infiltração e emblocagem em historesina plástica, parafina ou Paraplast.

5.1.6 Infiltração e Emblocagem em Historesina Plástica

Para embriões e larvas de peixes, recomenda-se o uso de historesina em detrimento da parafina ou Paraplast devido ao tamanho reduzido e grande quantidade de substâncias presentes no vitelo que são danificadas pelo xilol.

Várias marcas de historesina estão disponíveis no mercado. Em geral, parte dos componentes do kit da historesina são tóxicos, devendo ser manuseados com luvas, máscaras e sob capela de exaustão. O protocolo a seguir foi testado com o Kit de Historesina Leica® (FIGURA 15). Os kits de historesina costumam ser compostos por:

- Solução A (resina básica)
- Solução B (endurecedor)
- Pó ativador

Deve-se preparar a Solução de Infiltração, misturando-se a solução A ao pó ativador em proporção adequada, conforme instruções do fabricante. Esta solução pode ser armazenada por longo período sob refrigeração e será utilizada para a infiltração das amostras. A emblocagem será feita com uma mistura da Solução de Infiltração e a solução B. Após a mistura destas soluções, a resina solidifica-se rapidamente, de modo que a emblocagem deve ser feita rapidamente e em baixa temperatura para retardar o processo.

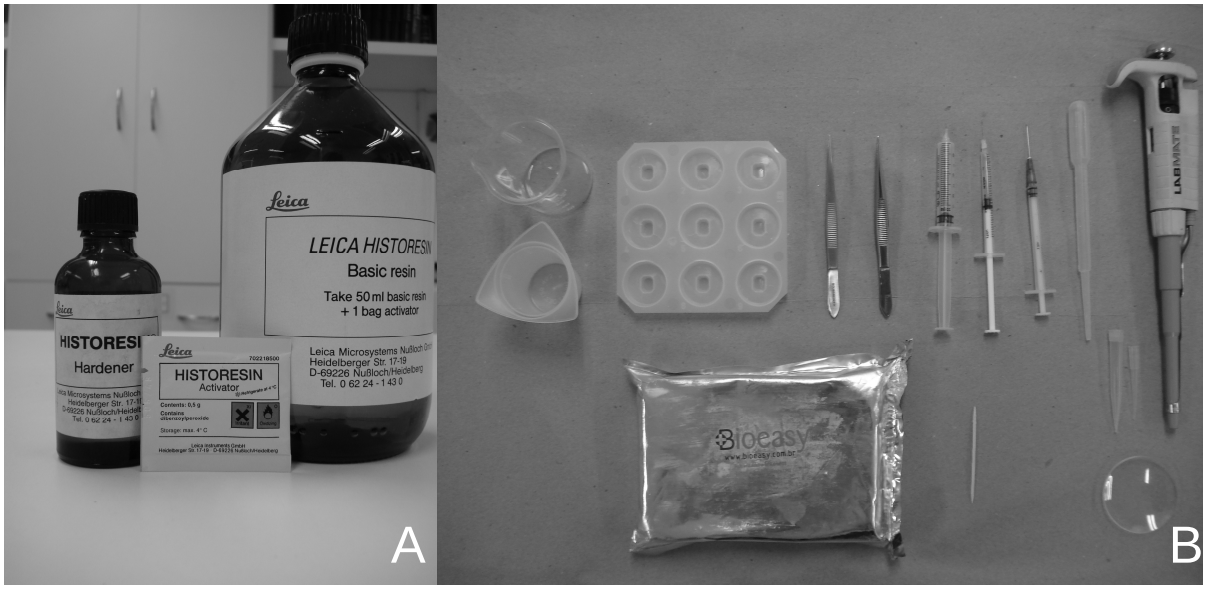


FIGURA 15. MATERIAIS PARA EMBLOCAGEM.
LEGENDA: (A) Kit comercial de historesina Leica® e (B) instrumentos necessários para emblocagem utilizando esta historesina (bequers, moldes, pinças de ponta fina, pipeta plástica, ponteiras e micropipeta, vidro de relógio, palito de dente e almofada de gelo.

Após a desidratação total, deve-se manter as amostras por 4 a 12h em uma mistura de solução de infiltração e etanol absoluto na proporção de 1:1 (vol:vol) em temperatura ambiente. A seguir, a mistura alcoólica deve ser substituída pela

solução de infiltração pura. Embora as amostras de embriões e larvas de peixes sejam pequenas, a penetração da resina não é rápida, possivelmente devido à presença do córion. Assim sendo, recomenda-se que as amostras permaneçam na solução de infiltração por, no mínimo, 7 dias. Foram testados até 3 semanas de infiltração, obtendo-se bons resultados. No meio do período, a solução de infiltração deve ser substituída por uma nova.

Quando bem infiltrados, os embriões ou as larvas devem se apresentar rígidos ao toque. A resina de emblocagem deve ser preparada instantes antes de sua utilização, pois ao se misturar a solução de infiltração à solução B (conforme instruções do fabricante), esta endurecerá rapidamente. Todo procedimento deve ser realizado sobre almofada de gelo para retardar o endurecimento da resina. Recomenda-se preparar a resina suficiente para confeccionar no máximo três ou quatro blocos de cada vez.

A emblocagem deve ser feita em moldes apropriados preenchidos com a resina de emblocagem, sendo que, se desejado, este procedimento pode ser feito sob microscópio estereoscópico para melhor visualização das amostras. A acomodação das amostras nos moldes pode ser feita com auxílio de um palito de madeira com a ponta levemente dobrada, formando uma pequena espátula. A polimerização se dá em temperatura ambiente sob vácuo.

Terminada a emblocagem, os moldes contendo as amostras devem ser mantidos em vácuo (FIGURA 16 A), em temperatura ambiente por no mínimo 24h. Após este procedimento os blocos devem apresentar consistência rígida, podendo ser retirados dos moldes, pressionando-se a base dos mesmos. Caso a consistência dos blocos não esteja rígida o suficiente, pode-se colocá-los em estufa a 60 ℃ por cerca de 24 horas para que sequem completamente.

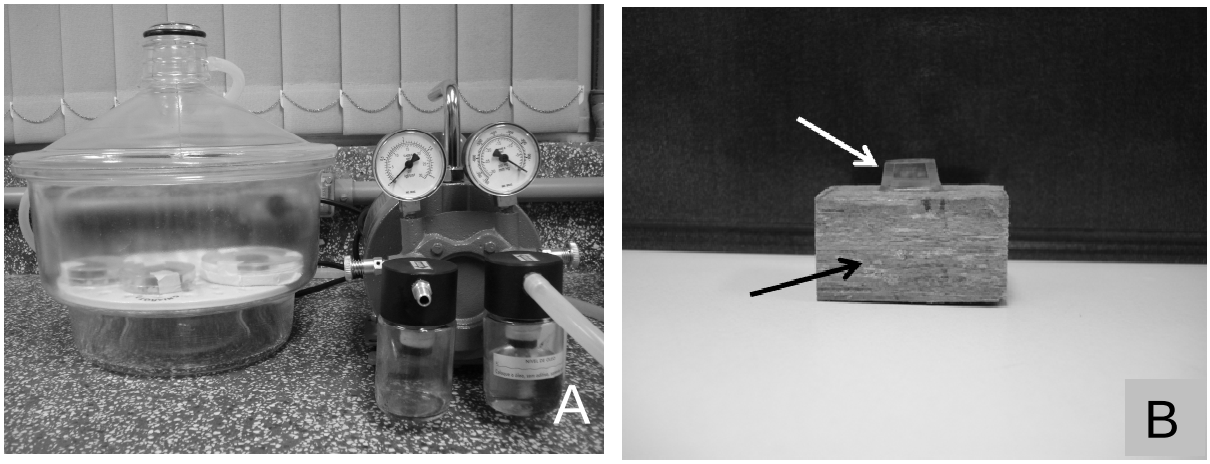


FIGURA 16. PROCEDIMENTO PARA EMBLOCAGEM.
LEGENDA:(A) Dessecador e bomba de vácuo e (B) taquinhos de madeira de 2,5cm com bloco de historesina.Seta branca indica o bloco de historesina e a preta o taquinho de madeira.

Cada bloco deve ser individualmente colado em suportes de tamanho adequado ao porta espécime do micrótomo a ser utilizado e devidamente identificados. Como suportes, podem-se utilizar pequenos paralelepípedos de madeira nos quais os blocos de historesina são fixados com cola Superbonder ou similar (FIGURA 16 B).

Os blocos fixados aos suportes podem ser armazenados dentro do dessecador sob vácuo ou em frascos bem vedados mergulhados em pastilhas de sílica gel. Recomenda-se que os blocos não sejam armazenados por tempo prolongado, devendo-se seccionar o material o quanto antes.

A microtomia é feita em micrótomo rotativo convencional, utilizando navalhas de aço especiais para historesina ou de tungstênio, ou ainda em ultramicrótomo com navalhas de vidro.

Os cortes devem ser apanhados com o auxilio da pinça ou uma agulha bem fina e colocados em uma lâmina de vidro, já preparada com uma gota de água destilda para cada corte. Em seguida, a lâmina deve ser colocada sobre placa aquecedora pré aquecida por 2 ou 3 minutos, no máximo, para que a água evapore e, desta forma, os cortes se estendam e se fixem na lâmina. Após completamente secas as lâminas estão prontas para serem coradas. O processo de secagem pode se dar em temperatura ambiente ou em estufa, recomendando-se que a coloração não seja feita antes de 12h após a microtomia.

5.1.7 Infiltração e Emblocagem em Parafina ou Paraplast

Embora a emblocagem em historesina apresente uma série de vantagens, a literatura apresenta resultados satisfatórios de embriões e larvas de peixes emblocados com Paraplast. Um dos maiores problemas enfrentados durante a emblocagem de embriões e larvas em Paraplast é a própria visualização das amostras, uma vez que apresentam tamanho reduzido e muitas vezes são despigmentadas. Durante a emblocagem, normalmente o Paraplast começa a esfriar, tornando-se esbranquiçado, e é comum perder-se a amostra dentro do bloco, dificultando o correto posicionamento da mesma. Após a solidificação do bloco, geralmente não é possível visualizar a amostra, dificultando grandemente a trimagem e a microtomia. Uma alternativa para minimizar este problema é acrescentar 1 gota de Eosina 1% à amostra quando esta estiver no álcool 80% da série alcoólica de desidratação. Por outro lado, a emblocagem de pós-larvas e alevinos em parafina ou Paraplast representa um método eficiente e de menor custo que a historesina.

O tamanho reduzido das amostras também exige uma passagem rápida pelo xilol. Após a desidratação, deve-se transferir as amostras para uma mistura de etanol absoluto e xilol na proporção de 1:1 (vol:vol), na qual as amostras devem permanecer por cerca de 5 min. Em seguida, substituir a mistura por xilol puro, fazendo dois banhos, que, conjuntamente não excedam 10 min em embriões e larvas iniciais, 15 min para larvas tardias e pós larvas e até 20 min para alevinos. Retirar as amostras do xilol e transferir diretamente para frascos contendo Paraplast derretido (58^{o}C). Manter as amostras desta forma na estufa por aproximadamente uma hora e, em seguida, emblocar conforme procedimento de rotina. Realizar a emblocagem sobre uma placa aquecedora e emblocar um grande número de embriões em um mesmo bloco também são procedimentos que podem auxiliar a minimizar as dificuldades de emblocar estas pequenas amostras por este método. Deve-se proceder a microtomia em micrótomo rotativo convencional com navalhas de aço permanentes ou descartáveis, não havendo particularidades na secção de embriões e larvas.

5.1.8 Coloração

Cortes de embriões e larvas de peixes emblocados com Paraplast podem ser corados como de rotina, sendo que o tempo de permanência nos corantes deve ser testado para cada material. Podem ainda ser empregados em procedimentos de histoquímica e imuno-histoquímica.

Embora diversas colorações sejam possíveis em cortes de blocos de historesina, as mais comumente utilizadas são Hematoxilina e Eosina e Azul de Toluidina (FIGURA 17). Deve-se ter em mente que, ao contrário da parafina e do Paraplast, a resina plástica não é retirada do corte antes da coloração, o que dificulta um pouco a penetração do corante.

O procedimento para coloração utilizando resina plástica é diferente do protocolo de rotina utilizando Paraplast ou parafina e segue o seguinte roteiro: colocar as lâminas em suportes na água por cinco minutos, deixar escorrer delicadamente, inserir a Hematoxilina e esperar três minutos; lavar as lâminas em água corrente delicadamente por dez minutos, deixar escorrer e adicionar a Eosina, deixar por apenas um minuto, retirar o corante e lavar em água para retirar o excesso. Deixar as lâminas secarem em temperatura ambiente e proceder a montagem apenas adicionando uma gota de permount como selante e colocando a lamínula por cima. Para o corante Azul de Toluidina basta hidratar os cortes em água por cinco minutos, deixar escorrer, colocar o corante e esperar vinte minutos. Após este tempo, lavar com água corrente por cinco minutos, escorrer, deixar as lâminas secarem em temperatura ambiente e proceder da mesma maneira descrita anteriormente para a montagem.

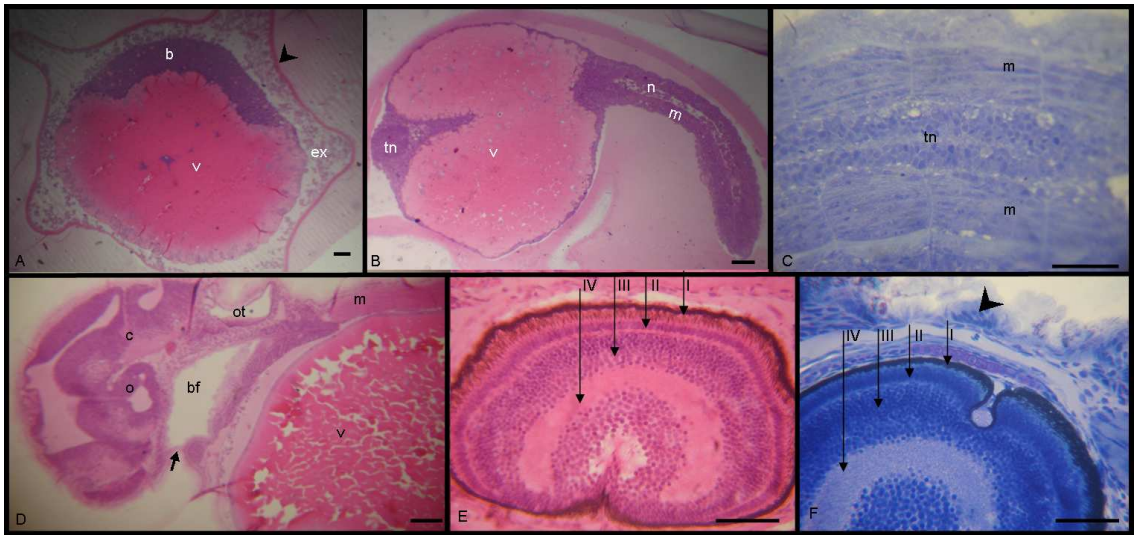


FIGURA 17 - CORTES HISTOLÓGICOS DE EMBRIÕES E LARVAS DE PEIXES.
LEGENDA: Embriões de tambaqui (*Colossoma macropomum*) fixados em Karnovski e emblocados em historesina em estádio de (A) Blástula e (B-C) Faríngula. (A e B) Imagens panorâmicas de embriões inteiros em corte longitudinal e (C) detalhe do tronco. Larvas de carpa (*Cyprinus carpio*) fixados em Paraformaldeído 4% em tampão PBS 0,1M e emblocados em historesina: (D) Região cefálica e (E-F) detalhes do olho. Coloração: (A,B, D, E) Hematoxilina-Eosina e (C,F) Azul de Toluidina. Símbolos: b, blastoderme; bf, cavidade bucofaríngea; c, cérebro;; ex, espaço perivitelino; m, fibras musculares; n, notocorda; o, olho; ot, cápsula ótica; tn, tubo neural (medula espinhal); v, vesícula vitelina; seta, fenda oral; cabeça de seta, córion. Os números romanos em E e F representam as camadas da retina. Escala: 100 µm.

5.1.9 Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma técnica muito utilizada no estudo de embriões e larvas de peixes, uma vez que muitas estruturas importantes no estudo do desenvolvimento posicionam-se externamente, podendo, portanto, ser visualizadas por esta técnica. A metodologia empregada não difere da técnica de rotina empregada para visualização da maioria dos materiais biológicos. Nesta seção, são apresentadas algumas particularidades no manuseio de embriões e larvas de peixes.

Embriões de peixes analisados sob MEV precisam ser retirados do córion que os reveste, caso contrário apenas o próprio córion seria visualizado por esta técnica. A retirada do córion pode ser feita antes ou após a fixação.

Para se obter um material de qualidade para o estudo, deve-se fixá-los com rapidez, por tempo determinado e em solução fixadora de qualidade. Existem vários fixadores que podem ser utilizados em microscopia eletrônica, e, por este motivo, é necessário escolher o que melhor atende as necessidades de cada material, incluindo a espécie de peixe com qual se irá trabalhar e os objetivos do estudo. Uma das soluções fixadoras mais utilizadas no estudo de embriões e larvas de peixes é o Karnovsky, composto por uma mistura tamponada de paraformaldeído e glutaraldeído.

É comum que as preparações de embriões de peixes para MEV apresentarem muitos artefatos, especialmente rachaduras. Com o intuito de se tentar diminuir estes artefatos foram testadas três formulações de Karnovsky em embriões de *R. quelen* com e sem córion. Para tanto, amostras de embriões foram coletadas no estádio de segmentação. Uma alíquota destes embriões seguiu para retirada manual do córion, enquanto a outra aguardou em placa de Petri recoberta com água das incubadoras até a fixação. Em seguida, espécimes dos dois grupos (com e sem córion) foram fixados em cada uma das formulações de Karnovsky preparadas previamente. As formulações testadas são apresentadas na TABELA 05 e as situações de fixação, considerando o tipo de fixador e presença do córion durante a fixação, são apresentadas na TABELA 06.

TABELA 05 - FORMULAÇÕES DE FIXADOR KARNOVSKI TESTADAS EM EMBRIÕES DE *Rhamdia quelen*.

Fixador	Paraformaldeído	Glutaraldeído	Tampão	CaCl2	pH
Karnovski 1 (K1)	2%	2,5%	cacodilato 0,1M	-	7,2
Karnovski 2 (K2)	2%	2,0%	cacodilato 0,1M	50mM	7,2
Karnovski 3 (K3)	2%	3,0%	cacodilato 0,1M	-	7,2

Todas as amostras permaneceram na solução fixadora por três horas sob refrigeração (4°C) e em seguida foram processadas de modo igual para observação ao microscópio eletrônico de varredura, sendo que aqueles embriões fixados com córion foram descorioniados manualmente antes de prosseguir o processamento. As amostras foram lavadas com tampão cacodilato 0,1M, desidratadas em série alcoólica crescente e levadas ao ponto crítico com CO_2 líquido. A seguir foram metalizadas em ouro paládio para estarem prontas para receberem o feixe de elétrons no microscópio eletrônico de varredura.

TABELA 06 - SITUAÇÕES DE FIXAÇÃO PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA A QUE FORAM SUBMETIDOS EMBRIÕES DE *Rhamdia quelen*

Situação	Retirada do Córion	Solução Fixadora
1	Após a fixação	Karnovski 1 (K1)
2	Antes da fixação	Karnovski 1 (K1)
3	Após a fixação	Karnovski 2 (K2)
4	Antes da fixação	Karnovski 2 (K2)
5	Após a fixação	Karnovski 3 (K3)
6	Antes da fixação	Karnovski 3 (K3)

NOTA: Variou a formulação do fixador e a presença de córion ao redor do embrião

Após a análise das amostras, observou-se que a preservação das estruturas celulares foi semelhante nos materiais submetidos aos seis procedimentos de fixação. No entanto, as amostras fixadas com a presença do córion apresentaram menos artefatos (rachaduras), sugerindo que a manipulação de embriões vivos para retirada da membrana coriônica possa contribuir para a formação destes artefatos. Os melhores resultados foram obtidos com embriões de jundiá fixados com a formulação 1 (Karnovsky 1) em embriões cujo córion foi retirado apenas após a fixação (FIGURA 18).

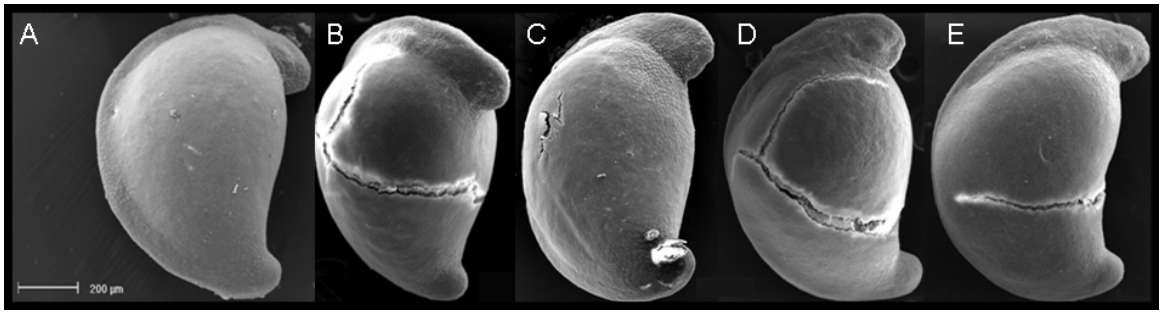


FIGURA 18 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE EMBRIÕES DE JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*).
LEGENDA: Estádio de segmentação, mostrando o resultado obtido utilizando as diferentes soluções fixadoras citadas no texto acima. (A e B) Embriões fixados com e sem membrana coriônica respectivamente em K1; (C e D) Embriões fixados com e sem membrana coriônica respectivamente em K2; e (E) Embrião fixado sem membrana coriônica em K3. Aumento no microscópio: 90x.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A temperatura da água é considerada uma das variáveis ambientais mais importantes por afetar diretamente o metabolismo, consumo de oxigênio, crescimento e sobrevivência de organismos aquáticos (JIAN et al., 2003). Portanto, o conhecimento dos efeitos da temperatura sobre organismos cultivados é fundamental para melhorar as técnicas de cultivo (ARANA, 1997).

No presente estudo, verificou-se que a temperatura de incubação afetou o tempo de desenvolvimento, a sobrevivência, o metabolismo, a taxa de síntese protéica o crescimento e a formação do tecido muscular do jundiá (*R. quelen*).

A velocidade de desenvolvimento foi maior nas temperaturas mais elevadas, levando cerca de 19h para completar o desenvolvimento embrionário a 30^{o}C, e 43h a 21^{o}C. A despeito do tempo e da ocorrência de malformações, as características morfológicas típicas dos estádios iniciais do desenvolvimento foram mantidas, permitindo o estadiamento da espécie.

A freqüência cardíaca das larvas e pós-larvas foi diretamente proporcional à temperatura, sugerindo maior taxa metabólica à medida que a temperatura se eleva. O mesmo se verificou em relação à taxa de síntese protéica, indicada pela razão RNA:proteína. Com isto, poder-se-ia esperar uma maior taxa de crescimento relativo a 30^{o}C, que, entretanto, ocorreu nos organismos incubados a 24 e 27℃. A temperatura de 30^{o}C parece ter alterado o metabolismo de tal modo a prejudicar o desenvolvimento e o funcionamento de uma série de estruturas.

As temperaturas mais extremas (18 e 30^{o}C) levaram a alta taxa de mortalidade, assim como altos índices de defeitos anatômicos, o que se pode levar a concluir que as malformações poderiam ser um dos fatores que causaram a mortalidade nestes espécimes. Por outro lado, os espécimes de jundiá incubados nas temperaturas de 21, 24 e 27℃ apresentaram a ma ior taxa de sobrevivência e o menor índice de malformações anatômicas, quando comparados a 18 e 30^{o}C.

A massa muscular produzida e a velocidade de crescimento dependem do número de fibras musculares (hiperplasia) que compõe um músculo e do diâmetro de cada fibra (hipertrofia) (MACQUEEN, 2008). É interessante notar que, em algumas espécies, ocorrem mudanças marcantes no fenótipo muscular associadas à alteração térmica sazonal, incluindo modificações das propriedades contráteis e características metabólicas do músculo (JOHNSTON, 1993).

As elevadas taxas de crescimento e aparentemente adequadas condições metabólicas, permitiram que os peixes incubados a 27℃ desenvolvessem fibras

musculares hipertrofiadas em relação àquelas obtidas nas demais temperaturas. Embora estudos adicionais sejam necessários, estes resultados apontam para um melhor potencial para formação de carne nestas condições térmicas de incubação.

Os resultados permitem concluir que, 27ºC é a melhor temperatura para incubação de embriões e larvas de *R. quelen*, uma vez que resulta em tempo de desenvolvimento relativamente rápido, boas taxas de sobrevivência e de crescimento, elevada síntese protéica, baixa incidência de malformações e formação de fibras musculares hipertrofiadas. As temperaturas de 18 e 30^{o}C não são adequadas à incubação desta espécie.

Os resultados deste estudo elucidaram das particularidades das fases iniciais do desenvolvimento desta espécie, trazendo subsídios para melhorar os resultados na larvicultura e, conseqüentemente a produção destes peixes. Além disso, permitirão a comparação dos processos de desenvolvimento entre a espécie modelo e a espécie em estudo para revelar mecanismos subjacentes de mudanças evolutivas entre elas.

O presente estudo terá continuidade pelo desenvolvimento de tese de doutorado a respeito do efeito da temperatura nos principais fatores de proliferação e diferenciação das células musculares. Com isso, serão elucidados os principais mecanismos que levam às alterações aqui verificadas.

TABELA 07: MAIORES TAXAS OBTIDAS EM CADA ANÁLISE NAS CINCO TEMPERATURAS DE INCUBAÇÃO EM ESPÉCIMES DE JUNDIÁ.

Análise Realizada	18℃	21℃	24℃	27℃	30℃
Taxa de Sobrevivência			x		
Índice da Malformações Anatômicas	x				x
Crescimento Relativo (Peso Seco)			x	x	
Taxa de Crescimento Protéico Específico				x	x
Concentração de DNA			x		
Concentração de RNA				x	
RNA:DNA (Transcrição)				x	
Concentração de Proteínas				x	x
RNA: Proteínas (Tradução)				x	x
Frequência Cardíaca				x	x
Maior Área das Fibras Musculares				x	
Maior Densidade de Fibras Musculares		x			
Composição Centesimal	*	*	*	*	*

*Não houve diferença significativa entre as temperaturas analisadas.

6.1 Conclusões

No presente estudo foi possível obter as seguintes conclusões:

- A temperatura de incubação afetou o tempo de desenvolvimento, a sobrevivência, o metabolismo, a taxa de síntese protéica o crescimento e a formação do tecido muscular do jundiá (*R. quelen*).
- A velocidade de desenvolvimento foi maior nas temperaturas mais elevadas.
- A freqüência cardíaca das larvas e pós-larvas foi diretamente proporcional à temperatura, o que pode indicar uma maior taxa metabólica à medida que a temperatura se eleva.
- A taxa de síntese protéica, indicada pela razão RNA:proteína aumentou com o aumento da temperatura de incubação.
- As temperaturas de 18 e 30^{o}C levaram a alta taxa de mortalidade e altos índices de malformações. Pode-se concluir que as malformações poderiam ser um dos fatores que causaram a mortalidade nestes espécimes.
- Espécimes de jundiá incubados nas temperaturas de 21, 24 e 27℃ apresentaram a maior taxa de sobrevivência e o menor índice de malformações anatômicas.
- *R. quelen* incubados a 27℃ desenvolveram fibras musculares h ipertrofiadas em relação às demais temperaturas. Este resultado sugere que esta temperatura é a mais indicada para um melhor potencial para formação de carne nestas condições térmicas de incubação.
- Propriedades nutricionais e organolépticas relacionadas à composição centesimal não sofreram influência da temperatura, uma vez que não houve alteração significativa do conteúdo total de proteínas, lipídios, umidade e matéria mineral dos espécimes incubados nas diferentes temperaturas experimentais.
- As temperaturas de 18 e 30^{o}C não são adequadas à incubação desta espécie.
- A partir destes resultados foi possível concluir que, 27ºC é a melhor temperatura para incubação de embriões e larvas de *R. quelen*, uma vez que resulta em tempo de desenvolvimento relativamente rápido, boas taxas de sobrevivência e de crescimento, elevada síntese protéica, baixa incidência de malformações e formação de fibras musculares hipertrofiadas.

- Não houve diferença na preservação de estruturas, assim como da ultraestrutura, dos embriões em segmentação fixadas com os diferentes fixadores ou em diferentes tempos, tanto em historesina quanto em parafina ou paraplast.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARANA, LV. Princípios químicos da qualidade da água em aqüicultura. Florianopolis, Editora da UFSC. 166p, 1997.

JIAN, C-Y, S-Y CHENG & J-C CHEN. Temperature and salinity tolerances of yellowfin sea bream, Acanthopagrus lotus, at different salinity and temperature levels. *Aquaculture Research*, v.34, p.175-185, 2003.

JOHNSTON, I.A.. Phenotypic plasticity to temperature change in fish. In: Rankin, C., Jensen, F.B. (Eds.),*Fish Ecophysyology.* Chapman & Hall, London, p.322– 340, 1993.

MACQUEEN, D. J. Temperature influences the coordinated expression of myogenic regulatory factors during embryonic myogenesis in Atlantic salmon (*Salmo salar L*). *Journal of Experimental Biology*, v.210, p.2781-2794, 2008.

ANEXOS

Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comitê de Ética em Experimentação Animal
(CEEA)

Nº 316

CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEEA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "*Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)*".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEEA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

PROCESSO: 23075.019887/2008-05 **APROVADO:** 17/06/2008 – R.O. 05/2008

TÍTULO: Desenvolvimento embrionário e pós-embrionário de peixes: descrição morfológica e estudo dos efeitos das condições ambientais no desenvolvimento de peixes

AUTORES: Flavia Sant´Anna Rios, Lucélia Donatti, Alana Marielle R. Galdino, Paulo César F. Carneiro, Peter Kirschnik, Lúcia Elvira Álvares, Mariana Forgati, Camila Valente Maiolino

DEPARTAMENTO:
Biologia Celular

Prof.ª Dr.ª Ana Maria C. Filadelfi
Coordenadora do CEEA