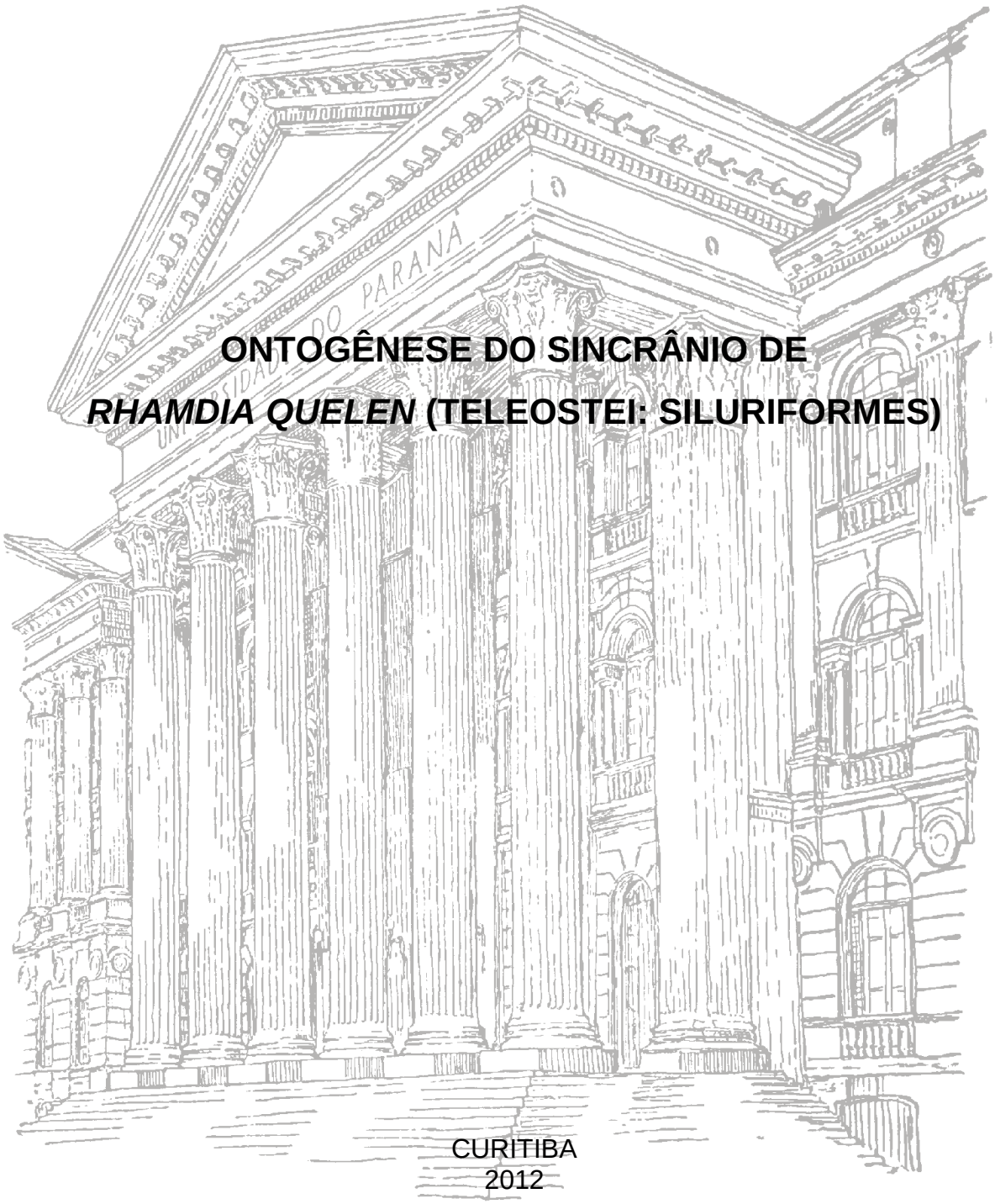
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAMILA VALENTE MAIOLINO



ONTOGÊNESE DO SINCRÂNIO DE *RHAMDIA QUELEN* (TELEOSTEI: SILURIFORMES)

CURITIBA
2012

CAMILA VALENTE MAIOLINO

Ontogênese do sincrânio de *Rhamdia quelen* (Teleostei: Siluriformes)

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

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

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Maiolino, Camila Valente
Ontogênese do sincrânio de *Rhamdia quelen* (Teleostei: siluriformes). / Camila Valente Maiolino. – Curitiba, 2012.
79 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Flavia Sant'Anna Rios

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Bagre (Peixe) 2. Esqueleto 3. Crânio I. Título II. Rios, Flavia Sant'Anna III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (20. ed.) 597.52

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 Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:

Profa. Dra. Flávia Sant'Anna Rios
Orientadora e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná (UFPR)

Profa. Dra. Cláudia Feijó Ortolani-Machado
Departamento de Biologia Celular
Universidade Federal do Paraná (UFPR)

Prof. Dr. Paulo de Tarso da Cunha Chaves
Departamento de Zoologia
Universidade Federal do Paraná (UFPR)

E tendo como suplente,

Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro
Departamento de Biologia Celular
Universidade Federal do Paraná (UFPR)

Após argüir *a mestranda* ***Camila Valente Maiolino,*** em relação ao seu trabalho intitulado: "**Ontogênese do sincrânio de *Rhamdia quelen* (Teleostei: Siluriformes)**", *são* de parecer favorável à APROVAÇÃO da acadêmica, habilitando-a ao título de MESTRE em Biologia Celular e Molecular, área de concentração Biologia Celular e Molecular.
A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora, bem como ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 30 de Março de 2012

Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular - UFPR
Matr. 185795

O mínimo que posso fazer é dedicar este trabalho a todos os peixes utilizados em nossas pesquisas e busca constante por conhecimento.

Agradeço à Flavia, por me orientar, ter paciência e confiança, além de normalmente me acalmar, em momentos de crises de desespero. Às Dras. Célia Regina Cavichiolo Franco, Claudia Feijó Ortolani-Machado, Sônia Regina Grötzner, ao técnico Herculano S. Reis Filho (Sr. Nino) e sua equipe do laboratório de histotecnologia (Departamento de Biologia Celular), e aos estudantes Victor e Gustavo, por seu esforço, apoio e auxílio em me ensinar novas técnicas ou elaborar novos protocolos, mesmo que estes não tenham saído exatamente como esperávamos. Ao programa de pós-graduação de Biologia Celular e Molecular, representado pelo Prof. Dr. Edvaldo Silva Trindade. Ao Prof. Dr. Peter G. Kirschnik e aos técnicos Jorge D. Mikos e Cesar Sary pela ajuda e pela utilização das dependências do Setor de Piscicultura (LAPEP - PUCPR) durante as desovas induzidas. À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida. Ao pesquisador Dr. Vinícius Abilhoa (Museu de História Natural Capão da Imbuia), por me ajudar com parte da bibliografia. Aos colegas do Laboratório de Biologia Adaptativa, sempre prontos para levantar o meu astral.

Acima de tudo, agradeço a minha mãe, não só por permitir que eu transformasse a sua casa num “QG da dissertação”, como também por acompanhar de perto praticamente todas as etapas deste trabalho, como minha melhor amiga; e ao meu querido noivo Bernardo, que se mostrou um verdadeiro companheiro em todos os momentos, sendo solidário ao meu isolamento “final”, além de muita ajuda no tratamento digital das ilustrações.

“Parecia um aparelho absurdamente complicado,
e esse era um dos motivos pelos quais (...) trazia a frase
NÃO ENTRE EM PÂNICO em letras grandes e amigáveis.”

Douglas Adams

RESUMO

A formação do esqueleto cefálico de *Rhamdia quelen* foi descrita com base em indivíduos diafanizados e corados, ao longo de 14 estádios nominais. O comprimento total dos indivíduos descritos variou de 3,37 mm, onde elementos esqueléticos foram vistos pela primeira vez, até 72,93 mm, quando a maior parte do sincrânio havia sido formada, tornando essa porção do esqueleto muito próxima àquela descrita em adultos. Os três primeiros estádios (condrocrânio inicial, condrocrânio médio e condrocrânio tardio) envolvem a rápida formação quase completa do condrocrânio. De maneira geral, esta formação assemelha-se ao padrão encontrado em outros Siluriformes, que apresentam crânios achatados dorso-ventralmente, com olhos pequenos e, consequentemente, um amplo espaço interobital e fenestra hipofisial. Isso resulta também na formação de uma lâmina pré-cerebral no lugar do septo nasal, normalmente encontrado em teleósteos, pois a distância entre os lados esquerdo e direito do crânio é maior; além da formação de um teto posterior cartilaginoso na região occipital apenas, ao invés de um teto sinótico unindo o teto das capsulas óticas, como descrito para a maioria dos teleósteos. Em relação aos demais Siluriformes, *R. quelen* tem uma ordem de formação dos componentes dos arcos branquiais diferenciada, sendo formados primeiramente os elementos intermediários (ceratobranquiais e epibranquiais) e a linha média ventral (copula), para posteriormente formar cartilagens hipobranquiais e faringobranquiais. Outra particularidade encontrada nesta espécie é a formação das comissuras basicapsulares anteriores antes das cartilagens paracordais, consideradas as primeiras cartilagens a serem formadas no neurocrânio dos teleósteos. Além disso, essas cartilagens não chegam a se unir contornando a extremidade anterior da notocorda como esperado em Siluriformes e demais teleósteos. A primeira ossificação observada no sincrânio de *R. quelen* corresponde aos ossos dérmicos opérculos e ocorre ainda no estádio de condrocrânio tardio. Os demais estádios descrevem a formação gradual do osteocrânio, sendo divididos de acordo com as principais inovações encontradas. Nos 3 estádios de osteocrânio inicial formam-se primeiramente ossos relacionados a alimentação (como ossos que suportam dentes ou articulam com barbilhões sensoriais), seguidos dos primeiros ossos da base do neurocrânio, tanto endocondrais, quanto dérmicos. Nos quatro estádios de osteocrânio médio, começam a ser formados primeiramente os canais dérmicos que revestem e protegem os principais canais sensoriais do crânio, sendo o primeiro deles o que reveste o canal mandibular (porção óssea esplenial da mandíbula). No último estádio de osteocrânio médio, os primeiros ossos em forma de chapa do teto craniano iniciam seu desenvolvimento. Os quatro últimos estádios descritos, de osteocrânio tardio, caracterizam-se principalmente pela formação dos ossos de revestimento externo do crânio, formando suturas entre eles, e fechando um teto dérmico sobre o neurocrânio. Apenas no último estádio de osteocrânio tardio, os canais sensoriais infraorbitais foram revestidos com ossos dérmicos (túbulos infraorbitais). De maneira geral, a formação do crânio-mandíbula de *R.quelen* é muito similar a observada em outros teleósteos, com pequenas alterações referentes às primeiras cartilagens do neurocrânio posterior, ordem de formação dos componentes dos arcos branquiais, ossos da base do neurocrânio e ponto de início da ossificação do canal sensorial mandibular, podendo ser considerado um modelo para outras espécies da família Heptapteridae.

Palavras-chave: Condrocrânio; Ossos dérmicos; Osteocrânio; *Rhamdia quelen*; Siluriformes

ABSTRACT

The formation of the head skeleton of *Rhamdia quelen* was described based on cleared and stained individuals along 14 nominal stages. The total length of the individuals described ranged from 3.37 mm where skeletal elements were first seen, to 72.93 mm, when most of the sincranium had been formed, making this region very close to that described in adults. The first three stages (early chodrocranium, middle chodrocranium, and late chodrocranium) involve the rapid and almost complete chodrocranium formation. In general, this formation resembles the pattern found in other Siluriformes, featuring skulls flattened dorso-ventrally, with small eyes, and consequently a large interorbital space and hypophysial fenestra. This results in the formation of a *lamina praecerebralis* in place of the nasal septum, typically found in teleost, because the distance between the left and right sides of the skull is larger, and the formation of a chondral *tectum posterius* only in the occipital region, instead of a *tectum synoticum* joining the roof of the otical capsules, as described for the majority of Teleost. Regarding other Siluriformes, *R. quelen* has an unique order of the gill arches components formation, forming first the intermediate elements (ceratobranchiale and epibranchiale) and the ventral midline (copula), and later the hypobranchial and pharyngobranchial cartilages. Another feature found in this species is the formation of the anterior basicapsular comissure before parachordal cartilage, considered as the first cartilage to be formed in the teleosts posterior neurocranium. Furthermore, these cartilages fail to unite round the anterior extremity of the notochord as expected in Siluriformes and other teleosts. The first ossification observed in the *R. quelen* sincranium corresponds to the operculum dermal bones, occurring in the late chodrocranium stage. The other stages describe the gradual formation of osteocranium, being divided according to the main innovations found. In the initial three osteocranium stages, primarily the bones related to feed (such as bones supporting teeth, or that articulate with sensory barbels) are formed, followed by the first bones of the neurocranium floor (both endochondral and dermal). In the four middle osteocranium stages, initially the dermal canals that cover and protect the main sensory canals of the skull are formed, being that lining the mandibular canal (esplenial bone portion of the jaw) the first of them. In the last middle osteocranium stage, the first plate-shaped bone of the skull roof developed. The last four stages described (late osteocranium) is characterized mainly by the formation of the bones externally covering skull, forming sutures between them, and closing a dermal roof on the neurocranium. Only in the last stage, the infraorbital sensory canals were covered with dermal bones (infraorbital tubules). Generally, the formation of *R.quelen* skull is very similar to those observed in other teleosts, with minor changes for the first neurocranium cartilage formation, sequential order of the gill arches components formation, first emergence bones of the neurocranium floor, and first point of ossification of the mandibular sensory canal,. So this species should be considered a model for other species of the Heptapteridae family.

Key-words: Chondrocranium; Dermal bones; Osteocranium; *Rhamdia quelen*; Siluriformes

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. Desenho esquemático de formação do neurocrânio em gnatostomados..... 2

FIGURA 2. Desenho esquemático de componentes do viscerocrânio de gnatostomados..... 3

FIGURA 3. Desenho esquemático do dermatocrânio de gnatostomados..... 3

FIGURA 4. Exemplares juvenis de *Rhamdia quelen*..... 9

FIGURA 5. Esquema comparativo da vista dorsal da parte anterior do corpo de *Pimelodella* (Pimelodidae) e *Rhamdia* (Heptapteridae)..... 10

FIGURA 6. Ilustração esquemática de tomada do comprimento total de espécime de *Rhamdia quelen* por meio de um paquímetro digital..... 14

FIGURA 7. Ilustração esquemática das principais indicações topográficas utilizadas neste estudo..... 18

GRÁFICO 1. Comparação das médias dos comprimentos totais dos indivíduos provenientes das três diferentes desovas de *Rhamdia quelen*..... 19

FIGURA 8. Exemplificação da variação do grau de desenvolvimento do crânio-mandíbula em pós-larvas de *Rhamdia quelen* da mesma idade..... 21

FIGURA 9. Exemplificação da variação do grau de desenvolvimento do crânio-mandíbula em juvenis de *Rhamdia quelen* de comprimentos próximos.. 22

FIGURA 10. Etapa de desenvolvimento do sincrânio de exemplar de *Rhamdia quelen* com CT 3,37 mm: Estádio de condrocrânio inicial……..…… 26

FIGURA 11. Etapas de desenvolvimento do sincrânio de exemplares de *Rhamdia quelen* com CT 4,03 mm (Estádio de condrocrânio médio) e CT 5,96 mm (Estádio de condrocrâniotardio)..... 28

FIGURA 12. Etapa de desenvolvimento do sincrânio de exemplar de *Rhamdia quelen* com (A) CT 6,66 mm: Estádio de osteocrânio inicial I: ossos que suportam dentes e (B-F) CT 7,06 mm: Estádio de osteocrânio inicial II: base do neurocrânio endocondral…….....…… 33

FIGURA 13. Etapa de desenvolvimento do sincrânio de exemplar de *Rhamdia quelen* com CT 9,87 mm: Estádio de osteocrânio médio I: canal sensorial mandibular……..… 39

FIGURA 14. Etapa de desenvolvimento do sincrânio de exemplar de *Rhamdia quelen* com CT 13,71 mm: Estádio de osteocrânio médio II: canais sensoriais do teto craniano…….…… 42

FIGURA 15. Etapa de desenvolvimento do sincrânio de exemplar de *Rhamdia quelen* com 19,46 mm: Estádio de osteocrânio médio III: intensificação da ossificação..... 47

FIGURA 16. Etapa de desenvolvimento do sincrânio de exemplar de *Rhamdia quelen* com 25,09 mm: Estádio de osteocrânio tardio I: narinas e região orbital 52

FIGURA 17. Etapa de desenvolvimento do sincrânio de exemplar de *Rhamdia quelen* com CT 29,93 mm: Estádio de osteocrânio tardio II: suturas da base e teto (A a D) e detalhe da ossificação interna da região esfenoidal e ótica, por meio de exemplar com parte do teto craniano retirada (CT 29,66 mm)..... 55

FIGURA 18. Etapa de desenvolvimento do sincrânio de exemplar de *Rhamdia quelen* com CT 44,56 mm: Estádio de osteocrânio tardio III: Fechamento do teto craniano…….…… 57

FIGURA 19. Etapa de desenvolvimento do sincrânio de exemplar de *Rhamdia quelen* com CT 72,93 mm: Estádio de osteocrânio tardio IV: série infraorbital... 59

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Amostras de *Rhamdia quelen* incubadas e coletadas a partir de cada uma das três desovas..... 15

TABELA 2. Comprimento total das amostras de *Rhamdia quelen* coletadas a partir de cada uma das três incubações..... 20

TABELA 3. Início de formação de cartilagens do condrocrânio em *Rhamdia quelen*, indicado por meio do comprimento total das larvas e pós-larvas..... 24

TABELA 4. Início de formação e tipo de ossos do osteocrânio de *Rhamdia quelen*, indicado pelo comprimento total de pós-larvas e juvenis..... 25

LISTA DE ABREVIATURAS

Art.M-H: articulação do arco mandibular com arco hioide
asp: asa do paraesfenóide
b.max: barbilhão maxilar
b.por: base pré-orbital
cba: comissura basicapsular anterior
cbp: comissura basicapsular posterior
c-cb 1, 2, 3, 4, 5: cartilagem ceratobranquial 1, 2, 3, 4, 5
c-ch: cartilagem cerato-hial
c-eb 1,2,3,4,5: cartilagens epibranquiais 1, 2, 3, 4, 5
c-fb 3, 4: cartilagem faringobranquial 3, 4
c-hb1,2,3: cartilagem hipobranquial 1, 2, 3
c-hh: cartilagem hipo-hial
c-hm: cartilagem hiomandibular
c-ih: cartilagem inter-hia
c-Mc: cartilagem de Meckel
co: cápsula ótica
cop.a: copula anterior
cop.p: copula posterior
c-pal: cartilagem palatina
c-pc: cartilagem paracordal
c-qu: cartilagem quadrada
csa: canal semicircular anterior
csb: canal sensorial suborbital
cs-e: comissura esfeno-etmoidal
csp: canal semicircular posterior
cs-s: comissura esfeno-septal
c-tc: trabécula *cranii*
c-tm: trabécula marginal
Dc: dentes cônicos
Es: espinhos (rastros branquiais)
f.bc: fenestra basicapsular
f.car: fissura carótida interna
f.pré: fontanela pré-pineal
fon.a: fontanela anterior
fon.p: fontanel posterior
fr.f: forâmen para o nervo facial
fr.f-pal: forâmen para o ramo palatino do nervo facial
fr.v: forâmen vago
f-sp: fenestra esfenoidal
l.on: lâmina orbitonasal
l.pc: lâmina pré-cerebral
nar: narina
neu-fr: componente neurodérmico dos ossos frontais
neuro: neuromastos
o-ang-c: complexo angulosplênio-articulo-retroarticulo
o-ant: osso antorbital
o-ap: osso autopalatino
o-apt: osso autopterótico
o-ar: complexo articulo-retroarticular
o-art: osso articular
o-asf: osso autoesfenótico
o-bo: osso basioccipital
o-cha: osso cerato-hial anterior
o-chp: osso cerato-hial posterior
o-cl: osso cleitron

o-cor: osso coronomeckeliano
o-de: osso dentário
o-den-c: complexo dento-esplênio-mentomeckelian
o-des: osso dentoesplênio
o-det: osso laterodermoetmóide
o-dm: osso dentomentomeckelian
o-dp: osso dermopterótico
o-entp: osso entopterigóide
o-etl: osso etmóide lateral
o-exo: osso exoccipital
o-fr: osso frontal
o-fr-pos: osso frontal pós-pineal
o-fr-pre: osso frontal pré-pineal
o-hhv: osso hipo-hial ventral
o-hm: osso hiomandibular
o-in: faringoinferior
o-ioIV: túbulo infraorbital IV
o-iop: osso interopercular
o-lac: osso lacrimal
o-met: osso mesetmóide
o-mm: osso mentomeckelian
o-mp: osso metapterigóide
o-mx: osso maxilar
o-ns: osso nasal
o-op: osso opérculo
o-os: orbitoesfenóide
o-pm: osso pré-maxilar
o-pop: osso pré-opercular
o-pot: osso proótico
o-ps: osso paraesfenóide
o-psu: osso parieto-supraoccipital
o-pt: osso pterótico
o-pte: osso pterigóide
o-pts: pteroesfenóide
o-ptsc: osso postemporo-supracleitron
o-pu: osso paruro-hial
o-pv: osso pré-vomeral
o-qu: osso quadrado
o-rb II,III,IV,V,VI,VII: raios branquiostegais II,III,IV,V,VI,VII
o-re: osso retroarticular
o-set: osso supraetmóide
o-sf: osso esfenótico
o-sop: osso supraopercular
o-su: faringosuperior
ot: otólito
p.cor: processo coronóide
p.ep: ponte epifisial
p.oc: pila *occipitalis*
p.op: processo opercular
p.pc: processo pré-cerebral
p.pt-qu: processo pterigoide da cartilagem quadrada
para.v3,v4: parapófises vértebras 3 e 4
pl.et: placa etmoidal
r.ep: ramo epifisial do osso frontal
r.p.ep: rudimento para a ponte epifisial
r.pl.et: rudimento para a placa etmoidal
sol.n: solo nasal
tp: teto posterior
ver 3 e 4: vértebras 3 e 4

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 1
2 OBJETIVOS 12
2.1 OBJETIVO GERAL..... 12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 12
3 MATERIAL E MÉTODOS..... 13
3.1 INCUBAÇÃO, AMOSTRAGEM, FIXAÇÃO E MEDIÇÃO DOS INDIVÍDUOS..... 13
3.2 COMPARAÇÃO DAS AMOSTRAS..... 15
3.3 DIAFANIZAÇÃO E COLORAÇÃO DO ESQUELETO..... 15
3.4 ANÁLISE, FOTODOCUMENTAÇÃO, ILUSTRAÇÃO E REPROCESSAMENTO DO MATERIAL..... 16
3.5 TERMINOLOGIAS UTILIZADAS..... 17
4 RESULTADOS..... 19
4.1 EQUIVALÊNCIA DAS AMOSTRAS COLETADAS..... 19
4.2 ANÁLISE DO PARÂMETRO PARA CLASSIFICAÇÃO DOS ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO..... 21
4.3 DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA DA FORMAÇÃO DO SINCRÂNIO DE *R. QUELEN*..... 23
4.3.1 Estádio de condrocrânio inicial……..……... 26
4.3.2 Estádio de condrocrânio médio……..…….. 27
4.3.3 Estádio de condrocrânio tardio……..…... 30
4.3.4 Estádio de osteocrânio inicial I: ossos que suportam dentes……..... 32
4.3.5 Estádio de osteocrânio inicial II: base do neurocrânio endocondral…… 36
4.3.6 Estádio de osteocrânio inicial III: base dérmica do neurocrânio……..... 37
4.3.7 Estádio de osteocrânio médio I: canal sensorial mandibular…..... 38
4.3.8 Estádio de osteocrânio médio II: canais sensoriais do teto craniano..... 41
4.3.9 Estádio de osteocrânio médio III: intensificação de ossificação…..... 46
4.3.10 Estádio de osteocrânio médio IV: teto craniano…….....…… 49
4.3.11 Estádio de osteocrânio tardio I: narinas e região orbital..... 51
4.3.12 Estádio de osteocrânio tardio II: suturas da base e teto cranianos..... 54
4.3.13 Estádio de osteocrânio tardio III: Fechamento do teto craniano…… 56

4.3.14 Estádio de osteocrânio tardio IV: série infraorbital……..…… 58
5 DISCUSSÃO…….. 62
6 CONCLUSÕES…… 73
REFERÊNCIAS…… 74
ANEXO……..….. 79

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento do esqueleto cefálico dos vertebrados é um processo complexo e um tema de pesquisa clássico (DEPEW; OLSOON, 2008). Sua complexidade se deve, em parte, ao fato de originar-se de mais de um folheto germinativo, suscitando o interesse de morfologistas e evolucionistas há séculos (de BEER, 1937; TORREY, 1978; DEPEW; OLSSON, 2008).

Nos teleósteos, como nos demais vertebrados, o desenvolvimento do crânio inicia normalmente de forma similar. Durante o desenvolvimento embrionário ou larval, formam-se algumas cartilagens isoladas na região da cabeça, as quais se desenvolvem unindo-se ou conectando-se umas às outras, formando então um pré-crânio cartilaginoso (ROMER; PARSONS, 1985; KENT, 2001) (Fig. 1). Freqüentemente este, ou porções deste, são substituídas por ossos (ossificação endocondral), além da formação de outros centros de ossificação independentes de precursores cartilaginosos (ossificação intramembranosa) (ROMER; PARSONS, 1985; KENT, 2001).

Mas, para melhor compreensão do desenvolvimento do crânio, é necessário conhecer as divisões propostas por diferentes autores, bem como a controvérsia quanto ao real significado da palavra crânio.

O termo crânio é empregado de forma muito diversa, sendo por isso muitas vezes evitado (ROMER; PARSONS, 1985). Geralmente, no senso comum, este termo equivale a quase todos os elementos do esqueleto cefálico. Para os morfologistas, no entanto, o crânio é uma estrutura segmentada, que pode ser dividida em regiões ou componentes de acordo com sua origem e/ou constituição. Alguns autores costumam dividir o crânio dos vertebrados em três componentes: neurocrânio, viscerocrânio e dermatocrânio (ROMER; PARSONS, 1985; KENT, 2001). Os dois primeiros são formados por cartilagens e ossos de substituição (ossos formados por substituição de precursores geralmente cartilaginosos), enquanto o último representa a reunião de todos os ossos intramembranosos, relacionados tanto com elementos do neuro, como do viscerocrânio (KENT, 2001).

O neurocrânio constitui a base do crânio e serve de proteção para o cérebro e alguns órgãos sensoriais. Seu desenvolvimento inicia com o

aparecimento de dois pares de cartilagens importantes: cartilagens paracordais (ao lado da extremidade anterior da notocorda) e trabéculas *cranii* (também chamadas de cartilagens pré-cordais, localizadas em região anterior às paracordais) (Fig. 1).

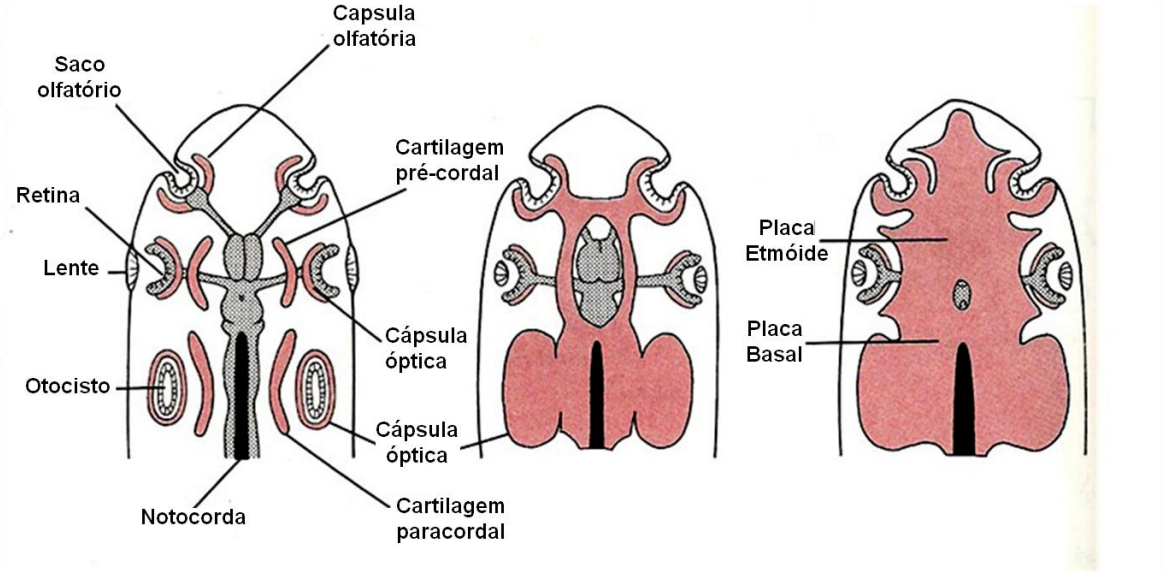


FIGURA 1. Desenho esquemático da formação do neurocrânio em gnatostomados. FONTE: Adaptado de Kent (2001), p. 224.

O viscerocrânio, também chamado esplancnocrânio (ADRIAENS; VERRAES, 1997a; DEPEW; SIMPSOM, 2006), complexo palatino (ROMER; PARSONS, 1985) ou simplesmente, esqueleto visceral (de BEER, 1937; SCHULTZE, 1993), corresponde ao esqueleto formado por elementos derivados de arcos branquiais, ou seja, o arco mandibular e arco hióide e, para alguns autores inclui também os demais arcos branquiais atuais (ROMER; PARSONS, 1985; KENT, 2001; DEPEW; SIMPSOM, 2006). O arco hióide sustenta o arco mandibular, prendendo-o ao neurocrânio, enquanto os arcos branquiais, sustentam as brânquias e por vezes, placas dérmicas com dentes (KENT, 2001). (Fig. 2).

O dermatocrânio é o conjunto de ossos dérmicos que recobrem o neurocrânio e porções da arcada inferior, constituindo grande parte da arcada superior, o primeiro palato e a série opercular (KENT, 2001) (Fig. 3). As variações encontradas entre as espécies nessa porção do crânio são extremas, contando com variações nas proporções entre os ossos, número, forma e espessura (SCHULTZE, 1993).

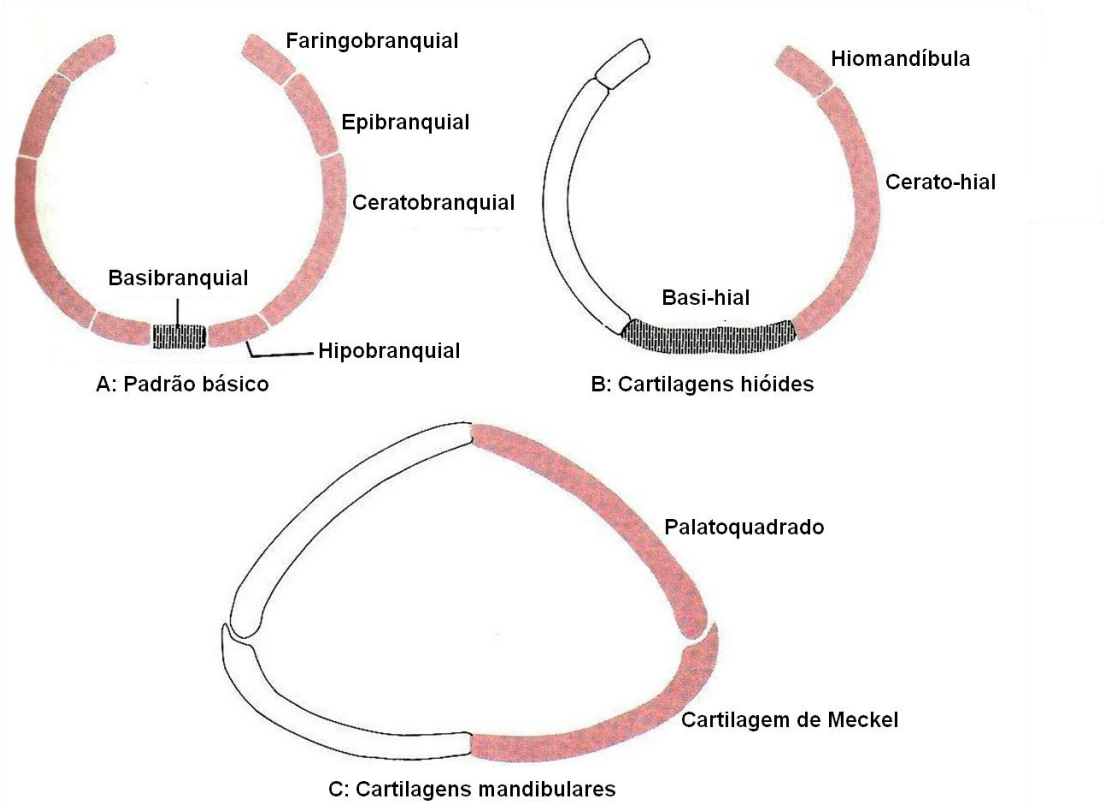


FIGURA 2. Desenho esquemático de componentes do viscerocrânio de gnatostomados. (A) Arco branquial; (B) Arco hióide; (C) Arco mandibular. FONTE: Adaptado de Kent (2001), p. 259.

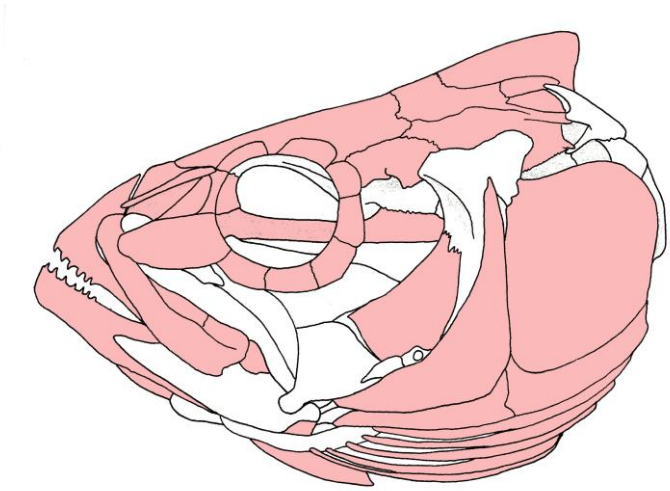


FIGURA 3. Desenho esquemático do dermatocrânio de gnatostomados. Ossos pintados de rosa representam ossos total ou parcialmente intramembranosos. FONTE: Adaptado de Gregory (1959), p. 87.

O viscerocrânio eventualmente pode não ser considerado como um componente craniano (KENT, 2001), por este ser formado por elementos derivados dos arcos branquiais, tornando o termo crânio, portanto, insuficiente para referir-se ao esqueleto cefálico completo. Por isso, freqüentemente a reunião

de todas as porções do esqueleto cefálico é denominada de sincrânio (ADRIAENS; VERRAES, 1997a; 1997b), e esta pode ser dividida também de acordo com sua constituição tecidual, sendo formada então por condrocrânio e osteocrânio. Neste caso, o condrocrânio compreende as porções cartilaginosas do neuro e viscerocrânio (DEPEW; SIMPSON, 2006), enquanto o osteocrânio inclui todos os tipos de estruturas ossificadas presentes de ambos (viscero e neurocrânio), independentes de sua origem ontogênica (ADRIAENS; VERRAES, 1997a; 1997b; 1998). O neurocrânio pode ainda ser subdivido em duas partes: uma posterior, chamada de crânio cordal e outra anterior, chamada de crânio pré-cordal (KURATANI; OTA, 2008). Esta última divisão refere-se à origem destas porções no embrião, pois ambas derivam de camadas germinativas diferentes.

Todas essas divisões didáticas do esqueleto cefálico aparecem de forma misturada na literatura, de acordo com a necessidade e o foco de cada estudo.

Quanto a sua constituição, o crânio dos vertebrados apresenta quatro tipos de tecidos esqueléticos: Ossos, cartilagens, dentina e esmalte. Os dois últimos são classificados geralmente como tecidos dentários. Porém, estes tecidos aparecem evolutivamente compondo o exoesqueleto de vertebrados ancestrais, constituindo, portanto, tecidos esqueléticos (HALL, 2005), mas não estando presentes em formas atuais como componentes do esqueleto.

A respeito de suas origens ontogênicas, esses tecidos podem desenvolver-se de diferentes folhetos germinativos do embrião. Durante anos, a teoria das camadas germinativas impôs uma única origem mesodermal para todo o esqueleto (LANGILLE; HALL, 1993). Ectoderme formaria apenas derivados da epiderme e sistema neural; endoderme formaria o canal alimentar e alguns órgãos; e mesoderme formaria outros tecidos e órgãos restantes, incluindo o esqueleto completo dos vertebrados (LANGILLE; HALL, 1993). Atualmente, sabe-se que a origem dos diferentes tecidos que compõem o sincrânio é muito mais complexa, envolvendo as três camadas germinativas. A dentina origina-se das células da crista neural (ectomesênquima), enquanto o esmalte pode originar-se tanto da ectoderme, quanto da endoderme (HALL, 2005).

Os principais tecidos que compõem o crânio, ósseo e cartilaginoso, são ambos de origem mesenquimal. No entanto, tal mesênquima pode ser derivado tanto da crista neural (ectomesênquima), como da mesoderme. A maior parte dos componentes esqueléticos do crânio facial origina-se das células da crista neural

(Le DOUARINO; KALCHEIM, 1999; GILBERT, 2006; KURATANI; OTA, 2008), enquanto o neurocrânio posterior, bem como alguns elementos do esqueleto visceral tem origem na mesoderme, sendo a indução de sua formação provavelmente relacionada à notocorda (KURATANI; OTA, 2008). Além desta origem direta, os ossos podem ser formados substituindo precursores, geralmente cartilaginosos, mas eventualmente tendões, ligamentos ou ainda porções da notocorda.

Por sua origem, os ossos são divididos classicamente em endocondrais, quando se formam substituindo outros tecidos, e intramembranosos ou dérmicos, quando formados diretamente de precursores mesenquimais. A denominação "dérmicos" relaciona-se com a possível origem evolutiva dos ossos, a qual poderia estar relacionada com placas dérmicas externas presentes no registro fóssil (TORREY, 1978). O termo endocondral, apesar de muito utilizado, parece errôneo, e vem sendo substituído por ossos "indiretos" ou "de substituição", uma vez que estes ossos não substituem apenas cartilagens (HALL, 2005). Além disso, os ossos verdadeiramente endocondrais (aqueles que substituem cartilagens) iniciam sua formação por uma substituição do pericôndrio, as margens da cartilagem, para depois desenvolverem-se em seu interior, sendo também chamados de pericondrais (HALL, 2005). Os ossos formados a partir de ligamentos e tendões são conhecidos como sesamóides e o osso formado a partir da notocorda pode ser classificado como pericordal (HALL, 2005), embora essa ossificação, por ser muito similar à pericondral, normalmente seja classificada como esta última.

Apesar da origem dos diferentes componentes do esqueleto cefálico ser variável, a relevância das células da crista neural para a formação desta estrutura é muito grande. Embora seja derivada da ectoderme, a crista neural pode ser considerada uma quarta camada germinativa, tamanha sua importância e quantidade de tipos celulares que é capaz de gerar (GILBERT, 2006; SZABO-ROGERS *et al.*, 2010). Suas células apresentam uma espantosa pluripotencialidade. Uma única célula da crista neural pode se diferenciar em muitos tipos celulares dependendo de sua localização no embrião. No entanto, apenas células da crista neural provenientes da região da cabeça são capazes de formar tecidos esqueléticos (LANGILLE; HALL, 1993).

Evolutivamente discute-se a origem de cada um dos segmentos cranianos. A teoria da derivação do arco mandibular e hióide dos primeiros arcos branquiais é bastante aceita (KURATANI; OTA, 2008). Cogita-se também a possibilidade das primeiras cartilagens formadas no neurocrânio (trabécula *cranii*) serem derivadas de porções dos primeiros arcos branquiais (de BEER, 1937; KURATANI, 2004). Acredita-se que os ossos, assim como a dentina e o esmalte tenham se originado do exoesqueleto de vertebrados ancestrais, que acabou sendo internalizado (TORREY, 1978; HALL, 2005). As cartilagens, no entanto, surgem como um novo sistema esquelético, o endoesqueleto e por serem encontradas também em invertebrados, é possível que possuam uma história evolutiva mais longa do que os ossos (HALL, 2005).

O estudo do desenvolvimento do esqueleto cefálico pode contribuir muito para a compreensão da evolução desta estrutura. Segundo Carroll (2006, p.8): “O desenvolvimento está intimamente ligado à evolução, porque a diversidade morfológica surge por meio de alterações nos embriões.” Esta idéia representa o ressurgimento de uma tendência no estudo ontogenético nas últimas décadas, relacionando a biologia do desenvolvimento ao processo evolutivo. Segundo Hanken e Hall (1993), isso se deve a diversos fatores, como o aumento de tecnologias empregadas e o grande desenvolvimento da sistemática de vertebrados. O crânio torna-se especialmente importante nesse tipo de estudo por possuir a função de proteção do cérebro e de grande parte dos órgãos sensoriais localizados na cabeça (CHAI; MAXSON, 2006). Tal função acarreta em pouca flexibilidade para mudanças evolutivas, tornando essa porção do esqueleto bastante conservada e conseqüentemente de grande importância para análises filogenéticas. Além de suas amplas funções, o crânio é composto por diversos ossos, forâmens e contornos, os quais muito podem dizer a respeito do habitat e história evolutiva de uma espécie, podendo ser comparado inclusive a registros fósseis (HILDEBRAND, 1995).

Apesar de sua grande importância, o estudo do desenvolvimento do esqueleto cefálico sofre com a dificuldade de estabelecerem-se homologias entre grupos tão diversos entre os vertebrados, o que acarreta em derivações e falta de consenso na nomenclatura e divisão craniana. Além disso, é difícil definir em que momento a formação do crânio pode ser considerada completa. O crânio está em

constante transformação, inclusive no indivíduo adulto, até sua morte (HERRING, 1993).

Para os teleósteos acrescentam-se a essas dificuldades o fato de seus embriões e larvas apresentaram tamanho reduzido, e a inexistência de um consenso quanto ao melhor parâmetro para a definição dos estádios de desenvolvimento neste tipo de estudo. Trabalhos sobre estadiamento em peixes em geral utilizam critérios morfológicos, como número de somitos ou a posição do primórdio da linha lateral, eventualmente relacionados à idade cronológica (HANNEMAN *et al.,* 1988; PEREIRA *et al.*, 2006). No estudo do desenvolvimento do crânio-mandíbula, no entanto, é comum a utilização do comprimento total do animal (ADRIAENS; VERRAES, 2002). Alguns autores criticam o uso deste parâmetro por ele por si só poder representar uma alteração morfológica do crânio, ou seja, um animal com um comprimento total maior geralmente apresenta peças maiores de seu esqueleto e essa alteração no tamanho, embora não no grau de ossificação ou formato pode ser considerada uma alteração no desenvolvimento desta estrutura (ADRIAENS; VERRAES, 2002). No entanto, o uso da idade cronológica torna-se complicado para essa descrição, uma vez que dentro de uma mesma linhagem e incubação, as larvas de peixes podem alcançar tamanhos bem diferentes com uma mesma idade e isso é bastante significativo na descrição do desenvolvimento de uma porção do esqueleto complexa e rica em detalhes como o crânio-mandíbula. Em geral, observa-se uma ampla variação do tamanho alcançado por diferentes indivíduos de mesma idade, de acordo com fatores físicos de incubação, como temperatura (OJANGUREN *et al.*, 1999; LERMEN *et al.*, 2004), luminosidade (PIAIA *et al.*, 1999; BEHR *et al.*, 1999), pH; (LOPES *et al.*, 2001), ou ainda fatores sociais, como a densidade de estocagem (GOMES *et al.*, 2000). Discute-se muito a respeito da importância dos fatores epigenéticos no desenvolvimento do sincrânio, mas acredita-se que sua influência seja maior no desenvolvimento após a eclosão (HERRING, 1993).

Além destas questões, observa-se ao longo da evolução uma tendência à redução do número de ossos da cabeça em grupos de vertebrados mais derivados, possivelmente ocorrida por perda ou fusão de ossos. Mas, nos peixes, normalmente existem muito mais estruturas para serem visualizadas, compreendidas e identificadas, aumentando a complexidade de seu estudo (GREGORY, 1965; DEPEW; SIMPSON, 2006).

Dentre os teleósteos, a Ordem Siluriformes constitui um grupo de grande sucesso evolutivo, diversidade e distribuição. Popularmente conhecidos como bagres, são em sua maioria de água doce, embora existam espécies estuarinas e mesmo oceânicas (BONE, 1995). Os peixes desta ordem possuem otólitos maiores quando comparados a outros grupos e seus ossos normalmente são largos e pesados, facilitando seu encaminhamento para o processo de fossilização (FERRARIS, 2007). Por ser um grupo bem diversificado parte de suas relações filogenéticas permanecem incertas. Compõe-se de 36 famílias, 478 gêneros e 3093 espécies válidas, dos quais 19 gêneros e 70 espécies são exclusivamente fósseis (FERRARIS, 2007). Até 2005, outras 228 espécies ainda eram consideradas incertas (FERRARIS, 2007). A grande maioria das informações encontradas na literatura acerca da osteologia de Siluriformes refere-se ao indivíduo adulto (ADRIAENS; VERRAES, 1997a).

O crânio dos Siluriformes possui algumas particularidades, resultantes da adaptação ao modo de vida de suas espécies, geralmente bentônicas e noturnas. Grande parte dos peixes desta ordem apresenta crânio achatado dorso-ventralmente e olhos pequenos, compensados pela presença de barbilhões orais e aparelho de Weber bem desenvolvido (FINK; FINK, 1981). Essas características permitem que o espaço interorbital seja maior do que nos outros grupos, e acarreta em alterações estruturais na base e teto do neurocrânio, aumentando o espaço hipofisial (entre as trabéculas *cranii*) e alterando o caminho de alguns nervos (ADRIAENS; VERRAES, 1997b). Além disso, pode ocorrer a transformação de porções relacionadas ao aparelho alimentar para articulação com os barbilhões maxilares e perda de um componente do arco hióide (inter-hial) aumentando sua mobilidade (ADRIAENS; VERRAES, 1997b).

A espécie *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824), empregada neste estudo (Fig. 4) é encontrada comumente em rios, lagos e reservatórios na América do Sul e Central (GOMES *et al.*, 2000; PERDICES *et al.*, 2002; SCHULZ; LEUCHTENBERGER, 2006). Popularmente, as espécies do gênero *Rhamdia* são chamadas de jundiá, apresentando diversos sinônimos em todo o território nacional, como jandiá, jundiá-tinga e mandi, dentre outros (BALDISSEROTTO; RADÜNZ-NETO, 2004).

A classificação deste gênero é bastante discutida (BALDISSEROTTO; RADÜNZ-NETO, 2004), sendo por muito tempo inserido na família Pimelodidae,

com quase 100 espécies descritas (SILFVERGRIP, 1996). Ao realizar uma revisão sistemática do gênero *Rhamdia*, baseada em caracteres previamente usados na literatura, Silfvergrip (1996) definiu apenas 11 espécies válidas, sendo *R. quelen* a espécie-tipo, com 48 sinônimos descritos. No entanto, muitos pesquisadores acreditam que a classificação de *R. quelen* esteja incorreta, podendo esta compreender mais de uma espécie (BALDISSEROTTO; RADÜNZ-NETO, 2004). Alguns sinônimos importantes de *R. quelen* encontrados em textos mais antigos são *R. branneri, R. sapo, R. hilarii,* e *R. sebae* (BALDISSEROTTO; RADÜNZ-NETO, 2004).

Atualmente, a família Pimelodidae foi dividida em três novas famílias: Pimelodidae, Pseudopimelodidae e Heptapteridae, sendo está última equivalente a subfamília Rhamdiinae, na qual se insere a espécie *R. quelen* (BALDISSEROTTO; RADÜNZ-NETO, 2004). Bockmann (1998) realizou uma revisão sistemática da família Heptapteridae, a qual se baseia em grande parte em morfologias internas, esqueléticas e musculares dos indivíduos adultos. Acredita-se que a família Heptapteridae seja monofilética (corroborado por BOCKMANN, 1998) contando com 24 gêneros, 189 espécies e nenhum registro fóssil (FERRARIS, 2007).

FIGURA 4 - Exemplares juvenis de *Rhamdia quelen.* FONTE: Imagem gentilmente cedida por Peter G. Kirschnik (Faculdade Católica do Tocantins-TO).

De modo geral, formas jovens de bagres facilitam estudos de desenvolvimento morfológico, uma vez que esses peixes produzem grande número de ovos, normalmente maiores do que outras espécies de teleósteos, facilitando assim seu manuseio para estudos descritivos e experimentais

(NORTHCUTT, 2003). No caso do jundiá particularmente, os ovos não se destacam pelo tamanho, medindo aproximadamente 1 mm de diâmetro, mas são produzidos em grande quantidade e não são adesivos (GOMES *et al.*, 2000), o que facilita a sua incubação e coleta.

Os principais estádios de desenvolvimento da espécie foram previamente descritos (GODINHO *et al.*, 1978[1], *apud* PEREIRA *et al.*, 2006, LUCHINI; RANCEL, 1981; PEREIRA *et al.*, 2006; RODRIGUES-GALDINO *et al*., 2009). Seus ovos são esféricos e translúcidos, com espaço perivitelínico bem definido e córion resistente. Suas larvas, quando incubadas a 27°C, eclodem com cerca de 21 horas após a fertilização (RODRIGUES-GALDINO *et al*., 2009) e parecem ter certa aversão a luz, chegando a se alimentar melhor e crescer mais rapidamente quando incubadas em ambientes escuros (PIAIA *et al.*, 1999; BEHR *et al.*, 1999). Esta característica pode ser decorrente dos hábitos da espécie, por esta ser noturna (SCHULZ; LEUCHTENBERGER, 2006).

Para a espécie *R. quelen*, existem algumas informações acerca do esqueleto adulto (SILFVERGRIP, 1996; BOCKMANN, 1998; BRISTKI *et al*., 1999) e da ontogenia de barbilhões maxilares e mecanismo palatino-maxilar (CUSSAC, MAGGESE, 1988). Podem ser consideradas autapomorfias osteológicas do gênero a presença de fontanela interrompida no nível da borda posterior do olho e o processo occipital estreito e curto, não atingindo a placa pré-dorsal (Fig. 5). A superfície superior do crânio normalmente é recoberta por uma pele fina e a cabeça é comprimida dorso-ventralmente (BRITSKI *et al.*, 1999).

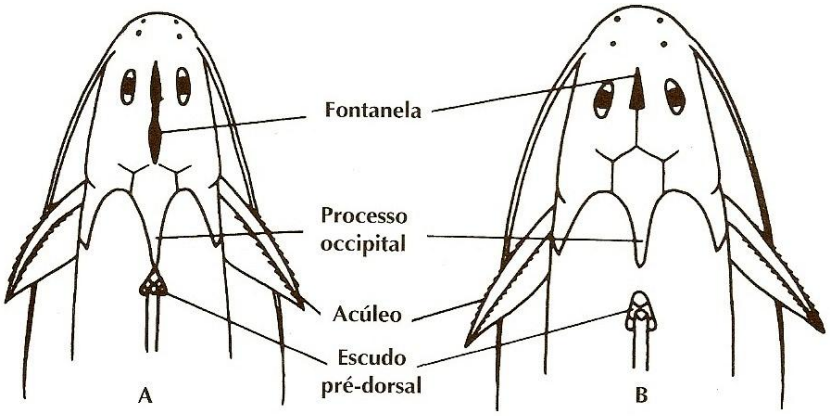


FIGURA 5 - Esquema comparativo da vista dorsal da parte anterior do corpo de (A) *Pimelodella* (Pimelodidae) e (B) *Rhamdia* (Heptapteridae). FONTE: Britski *et al.* (1999), p. 175.

[1] GODINHO, H. M., FENERICH, N. A., NARAHARA, M. Y. (1978) Desenvolvimento embrionário e larval de *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) (Siluriformes, Pimelodidae). **Revista Brasileira de Biologia**, 38 (1): 151-156.

Embora o desenvolvimento do crânio-mandíbula dos teleósteos seja um tema bastante estudado, existem poucos trabalhos focados na ordem Siluriformes (ADRIAENS; VERRAES, 1997a; ADRIAENS; VERRAES, 1998) fazendo com que a compreensão do desenvolvimento esquelético cefálico deste grupo tão diverso ainda apresente várias lacunas. Não existem trabalhos publicados acerca do desenvolvimento do sincrânio da espécie *Rhamdia quelen*, tão pouco de outras espécies do gênero *Rhamdia* ou até mesmo da família Heptapteridae. No presente estudo, a formação do esqueleto cefálico de *R. quelen* é descrita em 14 estádios a partir da eclosão até 50 dias pós-eclosão, com variação do comprimento total de 3,46 mm a 72,93 mm, visando não apenas contribuir com o acúmulo de informações acerca da espécie, mas também descrevendo o desenvolvimento de esqueleto cefálico de uma espécie da família Heptapteridae, para que este possa servir de modelo para demais espécies do grupo. Por ser uma espécie de posição taxonômica discutível, o estudo ontogenético do crânio também pode fornecer grande número de características que possibilitem o melhor posicionamento taxonômico e filogenético da espécie.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Descrever o desenvolvimento do esqueleto da região cefálica da espécie *Rhamdia quelen* sob o ponto de vista morfológico, do momento da eclosão até 50 dias após este.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever a ontogenia do sincrânio de uma espécie pertencente a família Heptapteridae;
- Descrever a morfologia geral e a sequência de formação de cada região do condrocrânio de *R.quelen*.
- Descrever a morfologia geral e a sequência de formação do osteocrânio de *R. quelen*, identificando seus principais centros de ossificação.
- Identificar o tipo de ossificação (endocondral ou intramembranosa) de cada componente do osteocrânio em *R. quelen*, facilitando a proposição e compreensão de homologias.
- Avaliar a equivalência de amostras coletadas a partir de incubações em diferentes datas e em condições similares, a fim de verificar o melhor parâmetro para definir o estádio de desenvolvimento craniano, entre idade cronológica e comprimento total.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 INCUBAÇÃO, AMOSTRAGEM, FIXAÇÃO E MEDIÇÃO DOS INDIVÍDUOS

Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Paraná (certificado nº 316, Processo 23075.019887/2008-05; Anexo 1).

Em geral, o período reprodutivo de *R. quelen* restringe-se aos meses mais quentes do ano, podendo-se obter boas desovas geralmente entre novembro e março, dependendo das condições climáticas da região (BALDISSEROTTO; RADÜNZ-NETO, 2004). Sendo assim, foram induzidas três desovas para incubação e amostragem de larvas, pós-larvas e juvenis de *R. quelen* nos períodos de: março de 2009 (incubados durante 25 dias); fevereiro de 2010 (incubados durante 50 dias) e novembro de 2010 (incubados durante 7 dias).

Em todas as desovas, os ovos foram obtidos através de fertilização *in vitro* no Laboratório de Pesquisas em Piscicultura (LAPEP) da PUC-PR (São José dos Pinhais – PR), sendo resultado de mistura de gametas de diversas matrizes propiciando maior diversidade genética. Para a indução da desova, seguiu-se o protocolo de Baldisserotto e Radünz-Neto (2004), administrando extrato hipofisário de carpa diluído em soro fisiológico em fêmeas e machos adultos. Os embriões obtidos foram transportados em galões de 6 L com água filtrada em temperatura ambiente para o Laboratório de Biologia Adaptativa, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas da UFPR (Curitiba-PR).

Foram, então, incubados com água de poço artesiano, temperatura mantida a 27±1º C, pH variando entre 7,5 e 8,5 e aeração constante. Os ovos da primeira desova foram incubados em recipientes plásticos de 6 L, em ambiente claro. Os da segunda e terceira, no entanto, foram incubados em recipientes maiores (30 a 50 L) e protegidos de luz direta, possibilitando um melhor crescimento das larvas, por ser mais próximo de seu hábitat natural (PIAIA *et al.*, 1999; BEHR *et al.*, 1999). Os recipientes de incubação eram limpos diariamente com o auxílio de pipetas. Apenas na segunda incubação, a qual durou 50 dias, os

animais atingiram tamanho suficiente para a utilização de um filtro após a primeira semana de incubação.

A eclosão em todas as incubações ocorreu entre 20 e 21 horas após a fertilização. A partir do segundo dia após a eclosão, em todas as incubações, as larvas começaram a ser alimentadas de duas a três vezes ao dia, com náuplios de artêmias vivos (*Artemia* sp.), embriões de artêmia sem casca e ração comercial para alevinos. A partir dos estádios juvenis (acima de 30 dias após a eclosão), acrescentou-se à alimentação ração comercial granulada.

Durante cada incubação, os indivíduos eram amostrados periodicamente e fixados em formol 5% ou paraformaldeído 2% em tampão PBS 0,1 M (PFA 2%)[2]. A amostragem foi feita com o auxílio de pipetas nos estádios iniciais e posteriormente com o uso de redes de nylon (puçás), sendo a maioria dos animais anestesiada com uma solução alcoólica de Benzocaína 5% previamente à fixação. A Tabela 1 mostra o número de indivíduos coletados e o tempo de fixação em cada tipo de fixador utilizado em cada coleta. Após o período de fixação, as amostras fixadas em formol 5% foram transferidas para álcool 70%, no qual permaneceram até o momento do processamento. Para verificar a equivalência entre as incubações, o comprimento total de todos os indivíduos coletados foi obtido por meio de um paquímetro digital, como ilustrado na figura 6.

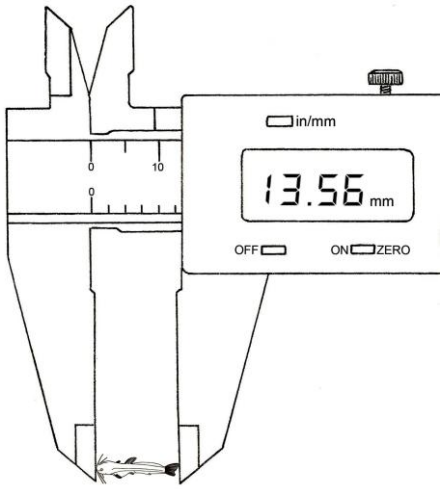


FIGURA 6. Ilustração esquemática de tomada do comprimento total de espécime de *Rhamdia quelen* por meio de um paquímetro digital. FONTE: O autor (2012).

[2] As amostras fixadas em paraformaldeído 2% em tampão PBS 0,1M foram destinadas a outros estudos não abordados neste trabalho. No entanto, o comprimento total de todos os indivíduos coletados (fixados em formol 5% ou PFA 2%) foi medido no momento da coleta e utilizado para a análise estatística da equivalência das amostras realizada neste estudo.

Além dos indivíduos incubados e coletados em laboratório, outros três indivíduos provenientes da desova realizada em março de 2009 foram coletados de tanques externos de piscicultura do LAPEP, com idade de 30 dias após a eclosão. Por serem muito maiores que os outros, esses indivíduos foram fixados em formol 5% por 2 dias e posteriormente transferidos para álcool 70%.

Tabela 1. Amostras de *Rhamdia quelen* incubadas e coletadas a partir de cada uma das três desovas.

Períodos	Fixação		Idade em dias pós eclosão																								
			0	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**10**	**11**	**13**	**14**	**16**	**17**	**19**	**21**	**22**	**23**	**25**	**30**	**35**	**40**	**45**	**50**	***30**
Mar/2009	**Formol 5%**	N	4	4	4	4	4	4	-	4	-	3	-	4	-	4	-	4	-	5	6	-	-	-	-	-	3
		T(h)	3	3	4	4	5	5	-	6	-	6	-	7	-	7	-	8	-	8	9	-	-	-	-	-	48
Fev-Abr/2010	**Formol 5%**	N	5	5	5	5	3	-	-	3	3	-	3	-	3	-	3	-	3	-	3	3	3	3	3	3	-
		T(h)	3	3	4	4	5	-	-	5	6	-	6	-	7	-	7	-	8	-	8	9	9	10	10	10	-
	PFA 2%	N	5	5	5	5	3	-	-	3	3	-	3	-	3	-	3	-	3	-	3	3	3	3	3	3	-
		T(h)	2	2	2	2	3	-	-	3	3	-	3	-	4	-	4	-	4	-	4	5	5	5	5	5	-
Nov/2010	**PFA 2%**	N	6	12	12	12	12	12	12	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		T(min)	15	17	19	21	23	25	27	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

N – número de indivíduos coletados; T – tempo de fixação em horas ou minutos; PFA2% – Paraformaldeído 2% em tampão PBS 0,1M; * indivíduos coletados em tanques externos de piscicultura.

3.2 COMPARAÇÃO DO COMPRIMENTO DOS INDIVÍDUOS DAS AMOSTRAS

Os comprimentos totais dos indivíduos de mesma idade coletados em diferentes datas foram comparados estatisticamente no software *GraphPad Prism* (5.01). Após a verificação de normalidade (teste Kolmogorov-Smirnov) foi aplicado o teste não paramétrico Mann Whitney. O objetivo desta comparação foi verificar se as amostras obtidas a partir de diferentes desovas são equivalentes. Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão da média e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3.3 DIAFANIZAÇÃO E COLORAÇÃO DO ESQUELETO

As amostras fixadas em formol 5% foram diafanizadas e coradas de acordo com Ortolani-Machado e colaboradores (2012). Como solução diafanizadora, utilizou-se hidróxido de potássio na concentração de 6 e 12%, dependendo do tamanho da amostra. Para a coloração de cartilagens, utilizou-se uma solução alcoólica de Azul de Alcian 8GX 0,2 mg/mL, modificada a partir de

Dingerkus e Uhler (1977), contendo 1 ml de Azul de Alcian 8GX para 4 ml de álcool 95% (P.A.) e 1 ml de ácido acético glacial. A coloração de cartilagens é a primeira etapa do processo, sendo realizada antes da diafanização propriamente dita. Para a coloração de estruturas mineralizadas (ossos) utilizou-se uma solução supersaturada do indicador Vermelho de Alizarina S em ácido acético glacial (modificado a partir de Wassersug, 1976). Esta solução foi adicionada em pequena quantidade (algumas gotas) aos exemplares ainda imersos na solução diafanizadora, quando estivessem quase completamente clarificados, permanecendo nesta solução diafanizadora/corante por, pelo menos, 1 hora, até overnight nos exemplares maiores. Após a coloração de estruturas mineralizadas, o excesso de corante foi retirado por trocas diárias de glicerina pura ou misturada a hidróxido de potássio em diferentes concentrações e proporções, de acordo com a necessidade de diafanizar-se um pouco mais cada exemplar. Exemplares diafanizados e corados foram mantidos em glicerina pura (P.A.) para análise. Nos exemplares maiores, a partir de 25 dias após a eclosão, os olhos foram retirados para facilitar a visualização de estruturas internas. Esse procedimento foi feito com o auxílio de uma pinça de ponta fina e tiras de acetato, antes do início da diafanização.

O tempo de imersão em cada solução (corantes ou diafanizadoras) foi bastante variável, tendo levado de horas a dias, dependendo do tamanho das amostras e do volume utilizado para cada solução. Sendo assim, o tempo de processamento completo de cada exemplar foi definido sempre por observações freqüentes sob estereomicroscópio ao longo do procedimento, variando de uma semana a três meses.

3.4 ANÁLISE, FOTODOCUMENTAÇÃO, ILUSTRAÇÃO E REPROCESSAMENTO DO MATERIAL

As amostras diafanizadas e coradas foram analisadas sob estereomicroscópio e fotografadas por meio de uma câmera digital acoplada a este. Para facilitar a compreensão e exposição do trabalho, os principais estádios quanto a alterações nos componentes cranianos foram retratados em ilustrações a nanquim. Tanto para preparação das ilustrações quanto para a obtenção das fotomicrografias foram utilizadas placas de Petri preenchidas com uma fina

camada de parafina na base, possibilitando o uso de alfinetes que permitiam a imobilização do exemplar na posição desejada. O uso de pouca glicerina nesta etapa (apenas o suficiente para cobrir o exemplar) é recomendado para reduzir o reflexo na obtenção das fotomicrografias.

Ao longo de todo este processo (fotodocumentção, análise e ilustração) as amostras processadas foram constantemente expostas à luz do microscópio estereoscópico. No período de análise das primeiras amostras processadas, notou-se que de acordo com essa exposição, a coloração dos ossos (Vermelho de Alizarina S) era perdida gradualmente nos exemplares de menor tamanho (abaixo de 20 mm) algumas semanas após seu processamento. Por isso, as amostras passaram a ser armazenadas protegidas de luz, a fim de que sua coloração máxima durasse mais. Logo após o processamento completo, as amostras foram primeiramente fotografadas em câmara de automontagem, para registro da intensidade da coloração óssea. Depois, ao longo de sua análise, as amostras foram constantemente comparadas com suas fotomicrografias e quando necessário, sua coloração óssea foi recuperada seguindo uma adaptação do processamento original, utilizando o diafanizador hidróxido de potássio em concentrações mais baixas (1 a 3%), diluído em uma mistura de água e glicerina na proporção 1:1. Os espécimes permaneciam nesta solução por 1 a 2 dias, para, então, receberem novas gotas da solução supersaturada de Vermelho de Alizarina em ácido acético glacial e repetir as etapas seguintes do procedimento original. Este cuidado foi tomado devido à relevância de colorações fracas no início de uma ossificação, podendo estas não serem identificadas quando o exemplar processado encontra-se desbotado e produzindo, assim, resultados falhos.

3.5 TERMINOLOGIAS UTILIZADAS

As indicações topográficas “dorsal” e “ ventral”, “anterior” e “posterior”, “medial” e “lateral” e “rostral” e “caudal” indicam posições opostas (Figura 7). Salvo quando mencionado situação diferente, estas indicações referem-se à posição de determinada estrutura em relação ao corpo do animal. A nomenclatura dos componentes do esqueleto cefálico segue principalmente de Beer (1937),

com atualizações de trabalhos específicos sobre a morfologia craniana da ordem Siluriformes (BOCKMANN, 1998; ADRIAENS e VERRAES, 1998; 2002).

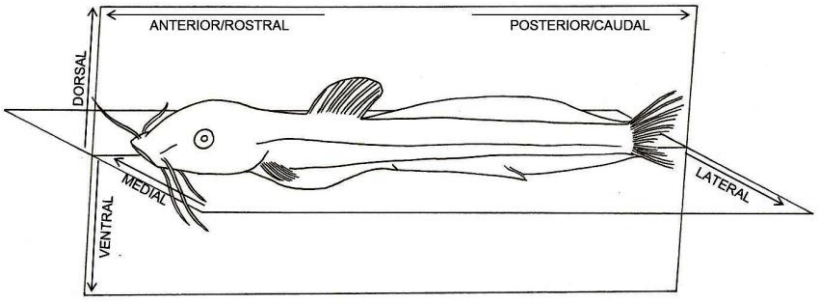


FIGURA 7: Ilustração esquemática das principais indicações topográficas utilizadas neste estudo. FONTE: O autor (2012).

4. RESULTADOS

4.1 EQUIVALÊNCIA DAS AMOSTRAS COLETADAS

O comprimento total dos indivíduos da mesma idade coletados em diferentes datas mostrou diferenças significativas ($p<0,05$) entre as coletas na maioria das idades (Gráfico 1, Tabela 2). Com exceção das amostras com idade de 2 e 3 dias após a eclosão (dpe), coletadas durante a segunda e a terceira incubações, todos os demais indivíduos mostraram diferenças significativas ($p<0,05$) de comprimento com relação aos organismos da mesma idade coletados em datas diferentes, incluindo aqueles coletados no momento da eclosão (idade = 0 dpe).

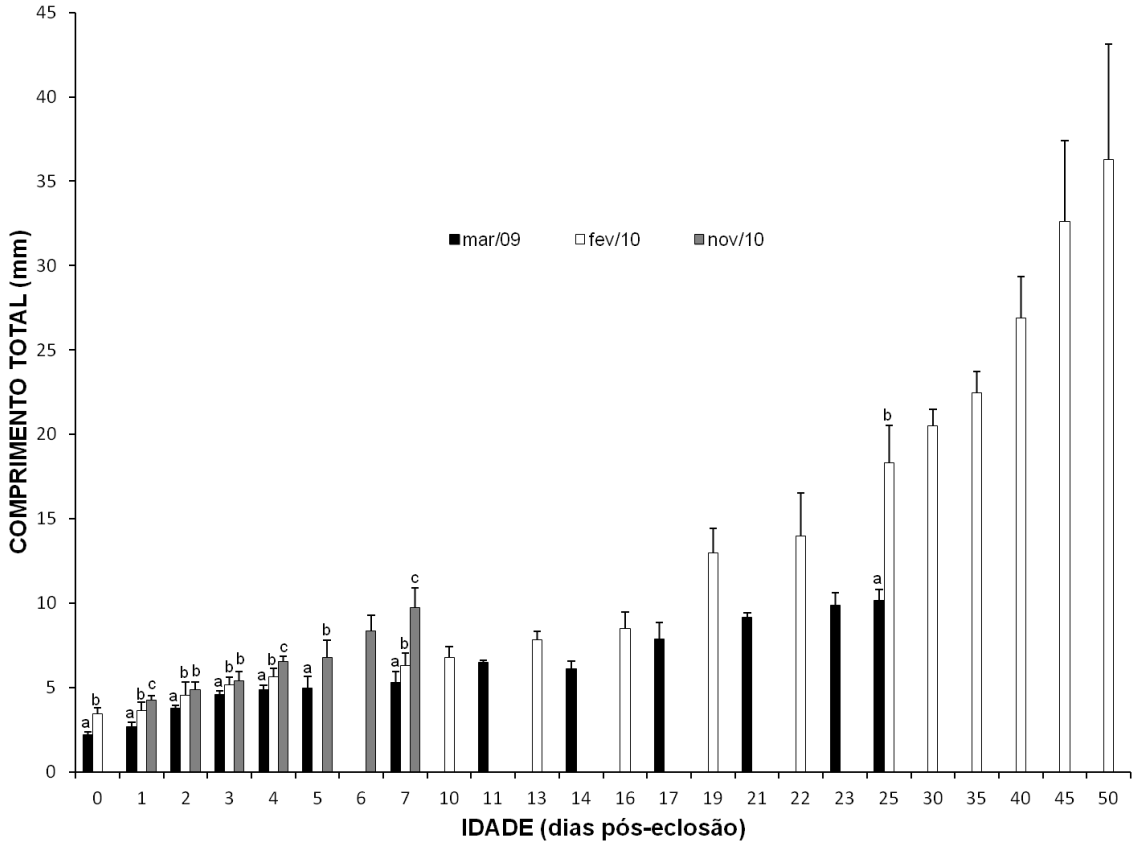


GRÁFICO 1. Comparação das médias dos comprimentos totais dos indivíduos provenientes das três diferentes desovas de *Rhamdia quelen*. Letras diferentes sobre as barras representando as médias dos indivíduos com a mesma idade indicam amostras significativamente diferentes. Para algumas idades, foram coletados indivíduos provenientes de apenas uma incubação, não tendo sido feito teste estatístico nestes casos. Os valores são médias ± desvio padrão.

TABELA 2. Comprimento total das amostras de *Rhamdia quelen* coletadas a partir de cada uma das três incubações e indicação dos indivíduos utilizados para cada análise. .

dpe	Comprimento Total (mm) Março/2009						Comprimento Total (mm) Fevereiro – Abril/2010										Comprimento Total (mm) Novembro/2010												MF
0	2,01	2,39	2,20	2,22	-	-	3,24	2,75	3,31	3,37	3,07	3,90	4,00	3,40	3,75	3,45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,07
1	3,00	2,45	2,53	2,80	-	-	3,83	3,73	3,56	3,87	3,37	4,20	2,85	3,40	4,45	3,15	3,76	4,06	4,32	4,10	4,30	4,57	4,40	4,56	4,49	4,35	3,87	4,42	3,78
2	3,49	3,86	3,85	3,87	-	-	4,03	3,60	4,19	3,36	5,21	4,05	5,00	5,80	5,34	4,80	4,97	5,48	4,88	4,46	5,18	4,94	4,80	4,19	4,09	5,14	5,15	5,26	4,58
3	4,23	4,54	4,68	4,81	-	-	5,46	4,61	5,57	4,27	5,86	5,45	5,30	5,00	4,87	4,99	5,80	6,15	5,38	6,11	4,59	4,77	4,76	5,29	5,41	6,14	5,33	5,03	5,17
4	4,69	5,06	5,13	4,68	-	-	5,94	5,86	5,56	5,46	5,26	6,35	6,25	5,70	5,23	4,70	6,23	6,79	6,32	6,47	6,85	6,30	6,57	6,13	6,17	7,13	6,79	6,57	5,93
5	3,92	5,46	5,40	5,05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,82	6,06	4,98	6,46	7,96	7,43	7,75	6,82	7,79	5,02	6,79	7,57	6,33
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9,86	7,68	8,04	6,88	-	-	8,58	7,62	8,83	9,19	-	-	8,30
7	4,68	6,03	5,62	4,80	-	-	6,60	6,00	6,51	5,61	7,60	5,90	6,80	5,40	-	-	10,67	7,62	10,01	9,25	-	-	10,79	11,05	9,50	9,16	-	-	7,48
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,75	7,45	6,20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,80
11	-	6,44	6,64	6,38	-	-	-	-	-	-	-				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,48
13	-	-	-	-	-	-	7,89	7,71	8,22	-	-	8,40	7,00	7,65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,81
14	6,52	5,56	6,25	6,20	-	-	-	-	-	-	-				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,13
16	-	-	-	-	-	-	9,50	7,34	9,87	-	-	7,95	8,00	8,30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,49
17	9,10	7,60	8,00	6,80	-	-	-	-	-	-	-				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,87
19	-	-	-	-	-	-	11,70	10,91	13,71	-	-	14,50	13,00	14,10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12,83
21	8,87	9,31	9,47	8,94	-	-	-	-	-	-	-				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9,14
22	-	-	-	-	-	-	-	10,27	14,44	-	-	17,45	14,30	14,50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14,19
23	10,24	9,59	9,66	9,00	10,96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9,89
25	10,10	9,98	10,61	9,79	9,20	11,17	14,91	18,25	19,46	-	-	17,25	18,50	21,50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14,23
30	-	-	-	-	-	-	18,69	20,59	20,28	-	-	20,9	20,85	21,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20,48
35	-	-	-	-	-	-	19,90	23,31	22,66	-	-	23,20	23,00	22,65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	22,45
40	-	-	-	-	-	-	25,09	26,79	29,66	-	-	26,25	23,70	29,80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	26,88
45	-	-	-	-	-	-	-	29,93	36,83	-	-	36,80	33,85	25,70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	32,62
50	-	-	-	-	-	-	29,55	44,20	38,44	-	-	34,00	43,40	28,20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	36,29
30*	72,93	44,56	47,32																										

dpe: dias após a eclosão; MF: Média Final; * amostras criadas em tanque externo; = amostras diafanizadas e coradas; = amostras utilizadas como base para a descrição de estádios. Todas as amostras cuja mesma idade foi amostrada em diferentes datas foram utilizadas para a análise estatística do comprimento.

4.2 ANÁLISE DOS PARÂMETROS PARA CLASSIFICAÇÃO DOS ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO

O nível de desenvolvimento craniano entre amostras de mesma idade, incubadas sob condições semelhantes variou, tanto entre amostras coletadas em datas diferentes, quanto na mesma data. De forma geral, indivíduos maiores (comprimento total maior) apresentaram um nível de desenvolvimento mais avançado que indivíduos menores com a mesma idade. Como exemplo, a figura 8 apresenta dois indivíduos com 7 dpe coletados no mesmo dia (provenientes da mesma incubação), porém com tamanhos diferentes, sendo o desenvolvimento do crânio-mandíbula mais avançado no indivíduo de maior tamanho.

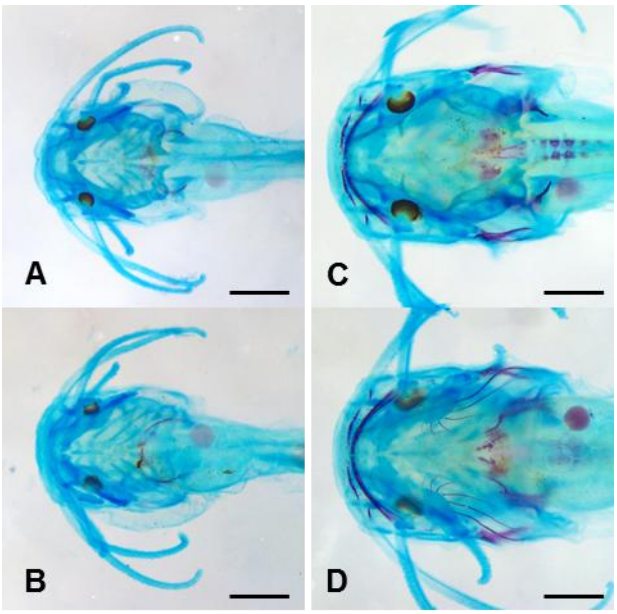


FIGURA 8. Exemplificação da variação do grau de desenvolvimento do crânio-mandíbula em pós-larvas de *Rhamdia quelen* da mesma idade (7 dias pós-eclosão), ambas coletadas a partir da mesma desova e incubação. Vistas: (A e C) dorsais; (B e D) ventrais. (A) e (B) Comprimento total de 6,51 mm; (C) e (D) 7,6 mm. Exemplares diafanizados e corados com Azul de Alcian e Vermelho de Alizarina. A coloração rosa indica tecido ósseo e a coloração azul mais intensa indica cartilagens. Escala: 0,5 mm.

Contudo, em alguns casos menos frequentes, indivíduos com comprimento total menor apresentaram-se mais desenvolvidos que outros maiores, tanto provenientes do mesmo período de incubação, quanto de períodos diferentes. A figura 9 ilustra muito bem essa situação, em que o crânio do indivíduo menor (Fig. 9 B) apresenta um grau de ossificação (regiões com coloração rosa) muito maior que

o do indivíduo maior (Fig. 9 A), o que não seria esperado mesmo que esses indivíduos tivessem comprimentos iguais.

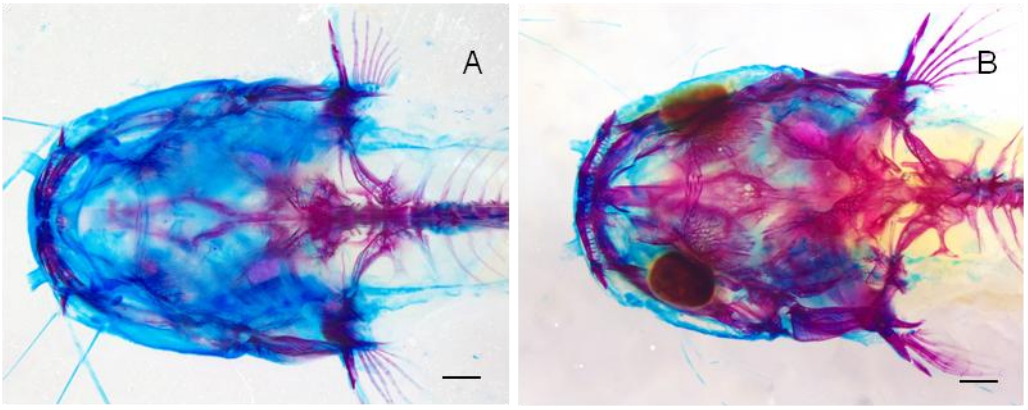


FIGURA 9. Exemplificação da variação do grau de desenvolvimento do crânio-mandíbula em juvenis de *Rhamdia quelen* de comprimentos próximos coletados a partir da mesma desova e incubação, sendo o mais desenvolvido o de tamanho menor. Vistas dorsais. (A) Comprimento total de 20,59 mm; (B) 18,69 mm. Exemplares diafanizados e corados com Azul de Alcian e Vermelho de Alizarina. A coloração rosa indica tecido ósseo e a coloração azul mais intensa indica cartilagens. Escala: 0,5 mm. Obs.: os olhos do indivíduo em A foram retirados.

Tanto idade cronológica, como comprimento total se mostraram medidas inadequadas para caracterização de estádios de desenvolvimento do crânio-mandíbula de *R. quelen*. No entanto, verificou-se que a variação no grau de desenvolvimento foi mais frequente entre indivíduos de mesma idade e menos freqüente entre indivíduos de comprimentos totais próximos.

Propõe-se, então, um sistema de estadiamento de acordo com as principais alterações observadas no desenvolvimento do crânio-mandíbula ao longo dos diferentes comprimentos totais coletados. Tomou-se como base para descrição alguns indivíduos representativos destas alterações, evitando utilizar aqueles que apresentavam um grau de desenvolvimento muito diferente (maior ou menor) dos demais com comprimentos totais similares. Os outros indivíduos processados auxiliam no esclarecimento de dúvidas a respeito de qual estrutura se forma primeiro quando ambas apresentam-se formadas entre dois estádios. A preocupação desta descrição será, portanto, com a ordem de formação e morfologia das estruturas e não exatamente com o tamanho ou idade de cada larva ou pós-larva, uma vez que esses dados podem se alterar por diferentes fatores e produzir resultados extremamente específicos para uma única situação. A idade dos espécimes descritos também é informada ao longo da descrição.

4.3 DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA DA FORMAÇÃO DO SINCRÂNIO DE *R.quelen*[3]

A descrição da formação do sincrânio foi feita dividindo-o didaticamente de acordo com sua origem e constituição, ao longo de várias etapas de desenvolvimento. Assim, foram analisadas separadamente regiões do neurocrânio e do viscerocrânio. Para facilitar a compreensão, os componentes do dermatocrânio, e outros tipos de ossificação não dependente de precursores cartilaginosos, quando presentes, foram descritos ao final de cada região do neuro ou viscerocrânio e destacados como "ossos intramembranosos" dessas regiões. Ossos maxilares (pré-maxilares e maxilares), assim como a cartilagem palatina e osso autopalatino, ainda são de origem incerta na literatura, e por isso foram descritos juntamente com o arco mandibular. Os ossos dérmicos da série opercular e o paruro-hial, embora não pertençam aos arcos branquiais, foram descritos juntamente com estes por sua proximidade anatômica e funcional.

O comprimento total dos exemplares de *R. quelen* descritos em que verificou-se o início da formação de cada estrutura do sincrânio encontra-se resumido nas Tabelas 3 (estruturas cartilaginosas) e 4 (estruturas ósseas e tipos de ossificação).

É importante deixar claro que muitas vezes estruturas, principalmente ósseas, quando visualizadas pela primeira vez, geralmente estão começando seu desenvolvimento, sendo, por isso, ainda muito pequenas e/ou fracamente coradas. Em alguns casos, as alterações apresentadas num estádio são visíveis apenas com o auxílio do micrométrico. Isso dificulta sua observação em fotomicrografias e nem sempre torna possível indicá-las nas imagens do estádio em questão. Nestes casos, é mais prático observar a inovação na figura equivalente ao estádio seguinte, onde ela já pode ser melhor visualizada. Além disso, conforme indivíduos aumentam de tamanho, torna-se mais difícil focar todas os planos de interesse numa

[3]De forma geral, a descrição morfológica da formação do esqueleto cefálico de *R.quelen* foi baseada nos indivíduos coletados a partir da segunda incubação (ver Tabela 2), por esta ter se estendido por um período mais longo e porque seus indivíduos apresentaram tamanhos mais próximos aos obtidos em pisciculturas (GOMES, 2000). Os indivíduos da primeira incubação, por terem alcançado um menor tamanho até 25 dias de incubação pós-eclosão, desenvolveram-se de um modo geral de forma mais lenta. Dessa forma,o desenvolvimento de seu esqueleto cefálico pode ser acompanhado com maior frequência, uma vez que num período maior de tempo, o desenvolvimento final alcançado foi menor. Por isso, os indivíduos coletados a partir do primeiro período de incubação foram utilizados para confirmação da ordem de formação entre duas estruturas quando ambas surgem em um mesmo estádio na segunda incubação.

mesma foto, fazendo com que muitas vezes, algumas estruturas, embora presentes, não possam ser visualizadas por questões de foco.

No momento da eclosão, nenhum componente do esqueleto cefálico iniciou sua formação.

TABELA 3. Início de formação de cartilagens do condrocrânio em *Rhamdia quelen*, indicado por meio do comprimento total das larvas e pós-larvas.

Região	Cartilagem	Iniciação	Região	Cartilagem	Iniciação
Neurocrânio			***Viscerocrânio***		
Etmóide	Trabéculas *cranii*(p)	3,37	Arco mandibular	Cartilagens de Meckel(p)	3,37
	Solos nasais (p)	4,03		Quadradas (p)	3,37
	Placa etmoidal (i)	4,03		Processo pterigoide (p)	4,03
	Comissuras esfeno-septal (p)	4,03		Palatina (p)	4,03
	Processos pré-cerebrais (p)	5,46		Processo coronóide (p)	4,03
	Lâmina pré-cerebral (i)	9,87			
			Arco hióide	Hiomandibulares (p)	3,37
Orbital	Trabéculas marginal (p)	4,03		Inter-hiais (p)	3,37
	Ponte epifisial (i*)	4,03		Cerato-hiais (p)	3,37
	Comissuras esfeno-etmoidais (p)	4,03		Hipo-hiais (p)	5,46
	Lâminas orbitonasais (p)	5,46			
	Bases pré-orbitais (p)	5,46	Arco Branquial	Ceratobranquial1-5 (p)	4,03
				Epibranquial1-4 (p)	4,03
Ótica	Comissuras basicapsulares anteriores(p)	3,37		Copula anterior (i)	4,03
	Comissuras basicapsulares posteriores(p)	4,03		Copula posterior (i)	5,46
	Comissuras basicapsulares laterais (p)	4,03		Hipobranquial 1-3 (p)	5,46
	Paracordais (p)	4,03		Epibranquial5 (p)	5,96
	Canais semicirculares anteriores (p)	4,03			
	Canais semicirculares posteriores (p)	4,03			
	Teto das cápsulas óticas (p)	7,60			
Occipital	Pila occipitalis (p)	4,03			
	Teto posterior (p)	9,87			

*"Iniciação" refere-se ao comprimento total do indivíduo em mm no qual a estrutura foi observada pela primeira vez, independente da idade. (i) = cartilagens ímpares; (p) = cartilagens pares; * no caso da ponte epifisial, esta estrutura em si é ímpar, mas os rudimentos que a formam originam-se tanto do lado esquerdo quanto direito, permanecendo por um longo período como rudimentos separados, antes da completa formação da ponte epifisial.*

TABELA 4. Início de formação e tipo de ossos do osteocrânio de *Rhamdia quelen*, indicado pelo comprimento total de pós-larvas e juvenis.

Região	Osso	Iniciação	Tipo
Neurocrânio			
Etmóide	Supraetmóide (i)	13,71	EC
	Hipoetmóide (i)	13,71	EC
	Laterodermoetmóide (i)	13,71	D
	Nasal (p)	19,46	CD
	Etmóide lateral (p)	25,09	EC
	Pré-vomeral (i)	13,71	D
Orbital	Frontal (p)	13,71	CD+D
	Orbitoesfenóide (p)	25,09	EC
	Pteroesfenóide (p)	19,46	EC
	Paraesfenóide (i)	8,22	D
	Antorbital (p)	19,46	CD
	Lacrimal (p)	22,66	CD
	Infraorbital1-4 (p)	72,93	CD
Ótica	Dermoesfenótico (p)	13,71	CD
	Autoesfenótico (p)	19,46	EC
	Proótico (p)	13,71	EC
	Dermopterótico (p)	13,71	CD
	Autopterótico (p)	22,66	EC
	Postemporal-supracleitron(p)	13,71	CD+D
Occipital	Parieto-supraoccipital (i)	13,71	D+EC
	Exoccipital(p)	9,87	EC
	Basioccipital (i)	7,60	EC
Viscerocrânio			
Arco mandibular	Pré-maxilares (p)	6,60	D
	Maxilares (p)	6,60	D
	Autopalatino (p)	7,60	EC
	Dentário (p)	6,51	D
	Mentomeckelian (p)	6,60	EC
	Esplenial (dentário) (p)	9,87	CD
	Angular (p)	22,66	D
	Articular (p)	7,60	EC
	Retroarticular (p)	8,22	EC
	Esplenial (angular) (p)	22,66	CD
	Esplenial (inter-articular)(p)	25,09	CD
	Quadrado (p)	7,60	EC
	Metapterigóide (p)	22,66	EC
	Entopterigóide (p)	22,66	S
	Coronomeckeliano (p)	13,71	S
Arco hióide	Hipo-hial ventral (p)	9,87	EC
	Hipo-hial dorsal (p)	22,66	EC
	Cerato-hial anterior (p)	9,87	EC
	Cerato-hial posterior (p)	13,71	EC
	Hiomandíbula (p)	13,71	EC
Arco Branquial	Hipobranquial1-2 (p)	29,93	EC
	Ceratobranquial5 (p)	7,60	EC
	Ceratobranquial4 (p)	9,87	EC
	Epibranquial3 e 4 (p)	9,87	EC
	Ceratobranquial2 e 3 (p)	13,71	EC
	Epibranquial2 (p)	13,71	EC
	Ceratobranquial1 (p)	19,46	EC
	Epibranquial1 (p)	19,46	EC
	Faringobranquial3 (p)	19,46	EC
	Faringosuperior (p)	6,51	D
	Faringoinferior (p)	6,51	D
	Paruro-hial* (i)	7,60	D
	Opercular* (p)	5,96	D
	Pré-opercular*(p)	13,71	CD
	Interopercular* (p)	9,87	D
	Supraopercular* (p)	13,71	CD
	Raio branquiostegal VII*(p)	6,51	D
	Raio branquiostegal II-VI*(p)	6,60	D
	Raio branquiostegal I*(p)	13,71	D

*"Iniciação" refere-se ao comprimento total do indivíduo em mm no qual a estrutura iniciou sua ossificação independente da idade. CD – osso canal dérmico; D – osso dérmico; EC – osso endocondral; S – sesamóide; (i) = estruturas ímpares; (p) = estruturas pares. * Não pertencentes aos arcos branquiais, mas descritos junto a estes neste trabalho.*

4.3.1 Estádio de condrocrânio inicial - Comprimento total (CT) 3,37 mm – 1 dia pós-eclosão (dpe) (Fig. 10)

Entre o momento da eclosão e o primeiro dia pós-eclosão, as larvas iniciam o desenvolvimento dos primeiros elementos cartilaginosos do neurocrânio e do viscerocrânio, embora estes se apresentem ainda bastante rudimentares.

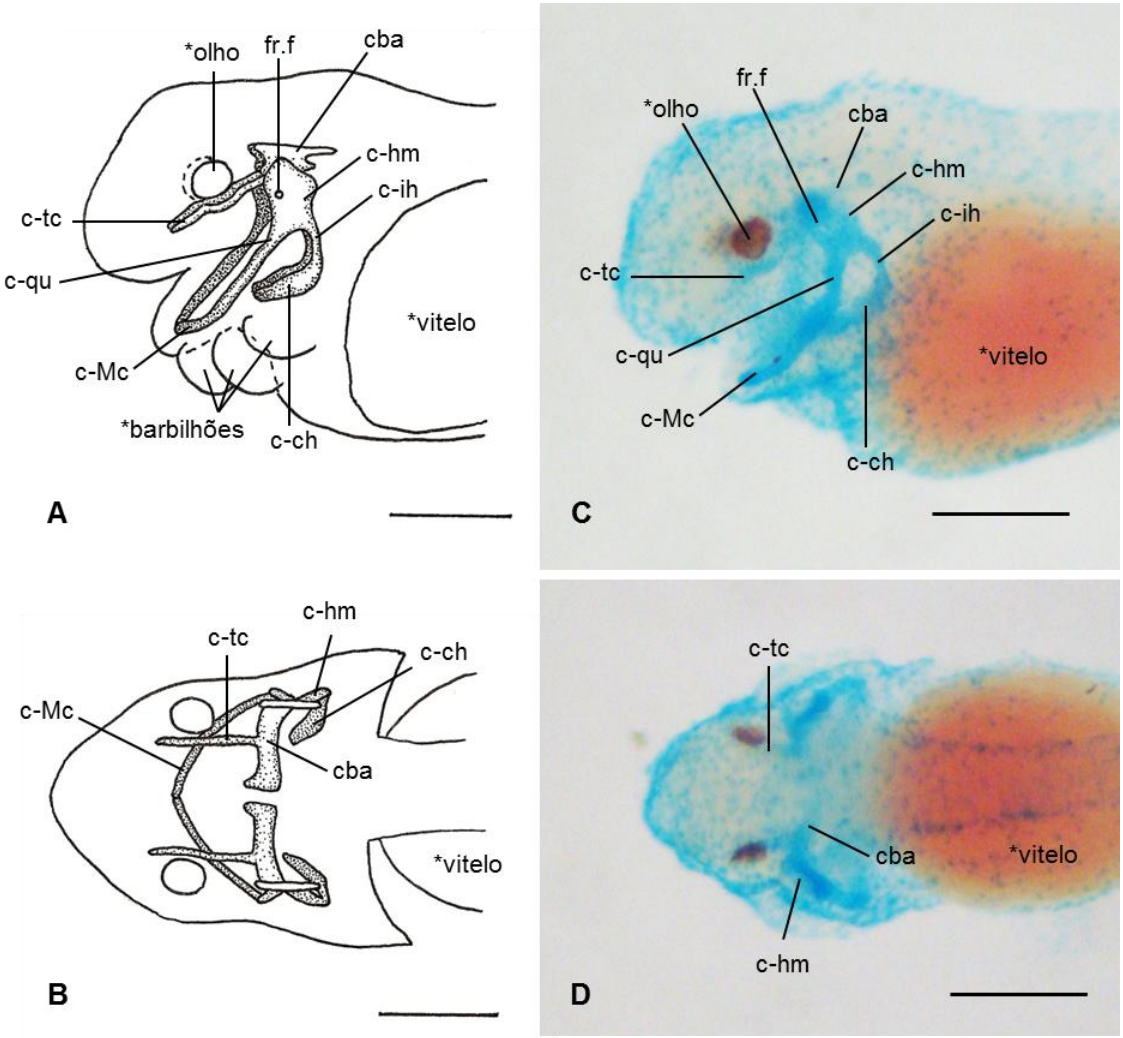


FIGURA 10. Etapa de desenvolvimento do sincrânio de exemplar de *Rhamdia quelen* com CT 3,37 mm: Estádio de condrocrânio inicial. Ilustrações (A e B) e fotomicrografias (C e D) de exemplar diafanizado e corado com Azul de Alcian e Vermelho de Alizarina. Vistas: (A e C) laterais; (B e D): dorsais. Em C e D, a coloração rosa indica tecido ósseo e a coloração azul mais intensa indica cartilagens. **Símbolos:** *cba*: comissura basicapsular anterior; *c-ch*: cartilagem cerato-hial; *c-hm*: cartilagem hiomandibular; *c-ih*: cartilagem inter-hial; *c-Mc*: cartilagem de Meckel; *c-qu*: cartilagem quadrada; *c-tc*: trabéculas *cranii*; *fr.f*: forâmen para o nervo facial; *estruturas não pertencentes ao crânio-mandíbula. Escala: 0,2 mm.

Neurocrânio

Região etmoidal e orbital: As trabéculas *cranii* se formam, apresentando-se como duas barras cartilaginosas paralelas, ventrais aos olhos se estendendo da região posterior a estes até a parte posterior das narinas.

Região ótica e occipital: Neste estádio são visíveis apenas dois pequenos fragmentos cartilaginosos localizados num plano imediatamente acima das cartilagens hiomandibulares do viscerocrânio, entre o nível destas e da extremidade anterior da notocorda. Por sua localização, correspondem às comissuras basicapsulares anteriores, iniciando, portanto, a formação das cápsulas óticas.

Viscerocrânio

Arcos mandibular e hióide: As larvas apresentam as cartilagens de Meckel já formadas e fusionadas rostralmente, cartilagens hiomandibulares com o forâmen para o nervo facial bem definido, cartilagens quadradas e inter-hiais, conectadas respectivamente à cartilagem de Meckel e à cartilagem cerato-hial em formação. Na porção ventral da cartilagem inter-hial, sob vista lateral, observa-se uma expansão no sentido ventro-medial, a qual constitui a cartilagem cerato-hial em formação. As cartilagens inter-hiais e cerato-hiais não parecem articuladas, mas sim continuamente conectadas, bem como as cartilagens quadradas e inter-hiais em relação às cartilagens hiomandibulares.

Nenhum componente esquelético dos arcos branquiais foi formado até este estádio.

4.3.2 Estádio de condrocrânio médio - CT 4,03 mm – 2 dpe (Fig. 11A e B, podendo o viscerocrânio ser acompanhado em Fig. 11C e F)

Neste estádio, as larvas têm um acentuado desenvolvimento do condrocrânio em relação ao estádio anterior, completando a formação da base e iniciando a formação do teto do neurocrânio, bem como os principais componentes funcionais dos arcos branquiais e arco hióide.

Neurocrânio

Região etmoidal e orbital: As trabéculas *cranii* se tornam mais alongadas e expandem-se lateralmente em sua porção anterior, formando uma plataforma lateral como base para a narina, o solo nasal. Simultaneamente, uma expansão mais fina, também na porção anterior, porém no sentido medial, começa a ser formada, quase unindo as duas trabéculas *cranii* para formar uma estreita placa etmoidal. As trabéculas marginais começaram a se formar, originando-se de prolongamentos

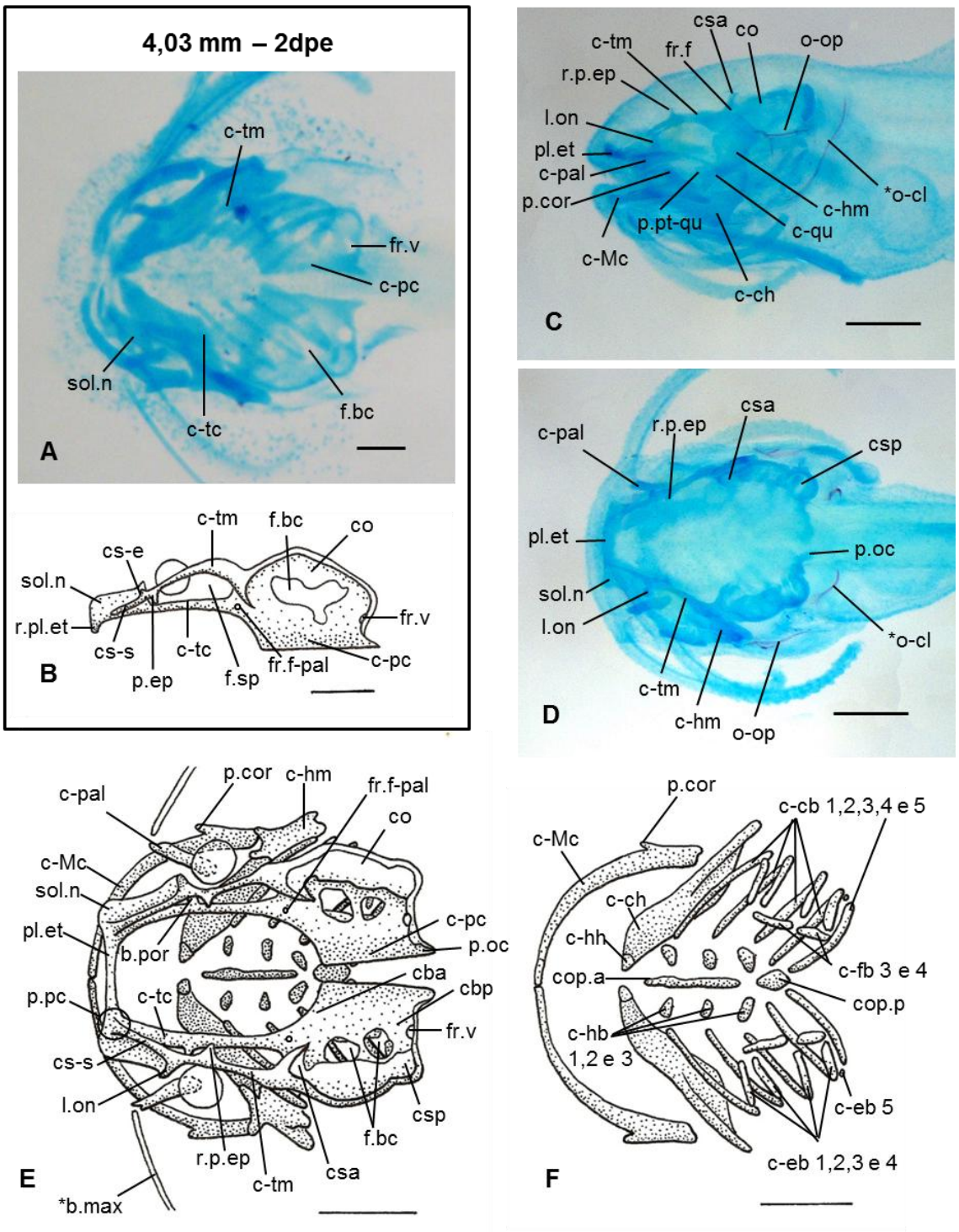


FIGURA 11. Etapa de desenvolvimento do sincrânio de *Rhamdia quelen* com (A e B) CT 4,03 mm - Estádio de condrocrânio médio e (C a F) CT 5,96 mm - Estádio de condrocrânio tardio. Fotomicrografias (A, C e D) e ilustrações (B, E e F) de exemplares diafanizados e corados com Azul de Alcian e Vermelho de Alizarina. Vistas: (A, D e E) dorsais gerais; (B) dorsal da metade direita do neurocrânio; (C) lateral e (F) dorsal do viscerocrânio. Nesta última, as cartilagens palatinas e hiomandibulares foram omitidas, de forma que apenas os elementos do viscerocrânio ocultos pelo neurocrânio pudessem ser visualizados. Em A, C e D a coloração rosa indica tecido ósseo e a coloração azul mais intensa indica cartilagens. **Símbolos:** *b.max*: barbilhão maxilar; *b.por*: base pré-orbital; *cbp*: comissura basicapsular posterior; *c-cb 1, 2, 3, 4, 5*: cartilagem ceratobranquial 1, 2, 3, 4, 5; *c-ch*: cartilagem cerato-hial; *c-fb 3, 4*: cartilagem faringobranquial 3, 4; *c-hb 1, 2, 3*: cartilagem hipobranquial 1, 2, 3; *c-hh*: cartilagem hipo-hial; *c-hm*: cartilagem hiomandibular; *c-Mc*: cartilagem de Meckel; *co*: cápsula ótica; *cop.a*: copula anterior; *cop.p*: copula posterior; *c-pal*: cartilagem palatina; *c-pc*: cartilagem paracordal; *c-qu*: cartilagem quadrada; *csa:* canal semicircular anterior; *cs-e*: comissura

esfeno-etmoidal; *csp*: canal semicircular posterior; *cs-s*: comissura esfeno-septal; *c-tc*: trabécula *cranii;* c*-tm*: trabécula marginal; *f.bc*: fenestra basicapsular; *fr.f:* forâmen para o nervo facial; *fr.f-pal*: forâmen para o ramo palatino do nervo facial; *fr.v*: forâmen vago*; f-sp*: fenestra esfenoidal; *l.on*: lâmina orbito-nasal; *o-cl*: cleitron; *o-op*: osso opercular; *p.cor*: processo coronóide; *p.oc*: pila *occipitalis*; *p.pc*: processo pré-cerebral; *p.pt-qu*: processe pterigoide da cartilagem quadrada; *pl.et*: placa etmoidal; *r.p.ep*: rudimento para a ponte epifisial; *r.pl.et*: rudimento para a placa etmoidal; *sol.n*: solo nasal; *estruturas não pertencentes ao crânio-mandíbula. Escala: 0,1 mm (A e B) e 0,3 mm (C, D, E e F).

rostrais dos canais semicirculares (descritos no item abaixo) anteriores das cápsulas óticas. Essas trabéculas dividem-se em três ramos no nível da região orbital. O primeiro ramo aparece como um pequeno processo, posterior ao nível dos olhos, desenvolvendo-se na direção dorso-medial, constituindo o rudimento da ponte epifisial. O segundo e o terceiro ramo separam-se em nível anterior aos olhos, sendo o segundo direcionado para a região ventro-lateral, constituindo a comissura esfeno-etmóide e o terceiro permanecendo no sentido rostral, constituindo a comissura esfeno-septal. Este segundo e terceiro ramos direcionam-se, respectivamente, a região posterior do solo nasal e a futura placa etmoidal, onde formarão nos estádios seguintes a lâmina orbitonasal e processo pré-cerebral.

Região ótica e occipital: A base das cápsulas óticas, as cartilagens paracordais e os processos que mais tarde gerarão o arco occipital (*pila occipitalis*) são formados. Nas cápsulas óticas, suas paredes laterais começaram a se erguer, os canais semicirculares anteriores e posteriores estão desenvolvendo e a base destas torna-se ligada às trabéculas *cranii*. No entanto, as cartilagens paracordais não se unem na porção anterior da notocorda, sem formar, portanto, a placa basal. Esta parece não se formar nesta espécie, nem mesmo nos estádios posteriores. Neste estádio, a base das cápsulas óticas possui uma única fenestra basicapsular grande. No entanto, na porção posterior começa a se formar o forâmen para o nervo vago.

Viscerocrânio

Arco mandibular e hióide: A parte superior do arco mandibular começa a se desenvolver com o aparecimento do processo pterigóide da cartilagem quadrada. Este se apresenta como um processo pequeno neste estádio, crescendo lentamente em direção rostro-medial durante os estádios seguintes. As cartilagens de Meckel tornam-se bem articuladas com a cartilagem quadrada e o processo coronóide começa a se formar. As cartilagens palatinas se formam, como cartilagens cilíndricas laterais aos solos nasais. Sua extremidade anterior é levemente dividida, formando

o que será mais tarde a articulação com o osso maxilar, enquanto sua extremidade posterior articulará no estádio seguinte à porção posterior do solo nasal. No arco hióide, as cartilagens cerato-hiais terminam de se formar, tornando-se próximas rostralmente.

Arcos branquiais: Os componentes intermediários de todos os arcos branquiais, com exceção dos epibranquiais 5, são visíveis neste estádio (ceratobranquiais 1, 2, 3, 4 e 5 e epibranquiais 1, 2, 3 e 4). Por meio de comparações com espécimes em etapa de desenvolvimento intermediária entre este estádio e o anterior, pode-se dizer que os componentes intermediários dos 3 primeiros arcos branquiais formam-se primeiro, seguidos pelos ceratobranquiais 4, depois epibranquiais 4 e, por fim, ceratobranquiais 5. A copula anterior (fusão das cartilagens basibranquiais 1, 2 e 3) forma-se neste estádio também, como uma barra horizontal entre as porções ventrais das cartilagens ceratobranquiais 1, 2 e 3.

4.3.3 Estádio de condrocrânio tardio - CT 5,46 mm a 5,96 mm – 3 a 4 dpe (Fig. 11C a F).

A maior parte do condrocrânio torna-se completa, enquanto o primeiro par de ossificações do crânio começa a ser formado, de origem intramembranosa, na região correspondente aos opérculos. Abaixo, são descritas pós-larvas com diferentes tamanhos, nas quais se verificou a formação progressiva de estruturas a medida que o crescimento ocorreu.

Neurocrânio

Região etmoidal e orbital: Em larvas com CT 5,46 mm (3dpe), as trabéculas *cranii* se unem rostralmente, formando a estreita placa etmoidal. Os três ramos originados das trabéculas marginais se desenvolvem, dois deles (comissura esfeno-septal e comissura esfeno-etmoidal) encontrando seu destino final neste estádio. As comissuras esfeno-septais das trabéculas marginais fundem-se à placa etmoidal. Esta fusão é feita com uma bifurcação de cada comissura esfeno-septal, totalizando, portanto, quatro pontos de contato rostral entre as trabéculas marginais e a placa etmoidal. Essa configuração é difícil de ser ilustrada, pois só pode ser visualizada olhando-se diretamente para a região rostral do exemplar, sendo, portanto, dificultada sua representação por meio de fotomicrografias. Nas duas regiões em que ocorre a fusão, a placa etmoidal apresenta uma elevação dorsal muito suave, a

qual corresponde aos dois processos pré-cerebrais. Em algum momento entre o estádio anterior e este, no mesmo nível da comissura esfeno-etmoidal, formam-se dois processos dorso-mediais nas trabéculas *cranii* e um na borda postero-lateral do solo nasal, em sentido dorsal. Os dois primeiros formam a base pré-orbital e neste estádio, os três processos fusionam-se à comissura esfeno-etmoidal, formando a lâmina orbitonasal. Na intersecção destes três processos distintos com a comissura esfeno-etmoidal, formam-se dois forâmens (novamente de difícil visualização nas imagens devido a sua localização). O maior, em posição ventral em relação ao outro, corresponde ao forâmen orbito-nasal, e o menor, ao forâmen do ramo oftálmico do nervo trigêmio. A fenda formada entre a comissura esfeno-septal e o solo nasal constitui a fila olfatória. Os rudimentos para a formação da ponte epifisial se desenvolvem, tornando-se mais definidos.

Região ótica e occipital: Nas pós-larvas com CT 5,96 mm (4dpe), as cápsulas óticas estão bem desenvolvidas e apresentam os otólitos, porém, antes disso, em larvas com CT 5,46 mm (3 dpe), os forâmens para os principais nervos cranianos estão definidos. Na conexão entre as trabéculas *cranii* e as bases das cápsulas óticas forma-se o forâmen para o ramo palatino do nervo facial. Próxima a este, na porção anterior lateral das cápsulas óticas forma-se o forâmen para o nervo facial, na porção posterior baso-lateral das cápsulas óticas, forma-se o forâmen para o nervo glossofaríngeo (de difícil visualização, tanto sob vista lateral, pois localiza-se praticamente na base das cápsulas óticas, quanto dorsal, pois fica oculto pelas paredes das cápsulas que estão se desenvolvendo), e na parede posterior das cápsulas forma-se o forâmen para o nervo vago.

Viscerocrânio

Arco mandibular: Não são observadas grandes alterações nesta região, comparado ao estádio anterior, com exceção da cartilagem palatina que se torna bem desenvolvida e o processo coronóide das cartilagens de Meckel que também se desenvolve.

Arco hióide: As extremidades anteriores das cartilagens cerato-hiais, anteriormente próximas, começam a se diferenciar nas cartilagens hipo-hiais, separando-se nesta etapa. Ao longo deste estádio, a cartilagem hiomandibular torna-se gradativamente mais robusta, porém sofre poucas alterações mais expressivas.

Arcos branquiais: As cartilagens hipobrânquiais 1, 2 e 3 e copula posterior tornam-se visíveis na larva com CT 5,46 mm. Duas cartilagens faringobrânquiais também são formadas, correspondendo às faringobrânquias 3 e 4. Na larva com CT 5,96 mm, começa a ser formada a quinta cartilagem epibranquial. Ela aparece como um pequeno ponto, ainda em formação, portanto fracamente corado, próxima à articulação entre as cartilagens ceratobranquial 4 e epibranquial 5.

Ossos intramembranosos: As primeiras ossificações são dérmicas e aparecem nas larvas com CT 5,96 mm (4dpe), correspondendo aos opérculos e cleitruns (estes últimos pertencentes ao esqueleto pós-craniano). Os opérculos aparecem como dois traços de ossificação finos e laterais à cabeça do animal, sendo um em direção caudal e o outro ventral. Ambos partem do nível do processo opercular da cartilagem hiomandibular.

4.3.4 Estádio de osteocrânio inicial I: ossos que suportam dentes - CT 6,51 - 6,66 mm - 7 dpe (Fig.12A)

Não existem alterações marcantes no condrocrânio a partir deste estádio, uma vez que este se torna bem desenvolvido nos estádios anteriores. Mas as primeiras ossificações do sincrânio, além dos opérculos, começam a ser formadas, sendo todas relacionadas primeiramente ao viscerocrânio. Neste estádio, pós-larvas com diferentes tamanhos com uma progressiva formação das estruturas são descritas.

Neurocrânio

Forma-se uma pequena fissura nas trabéculas *cranii,* denominada fissura carótida interna, localizada entre o nível dos processos que formarão a ponte epifisial em estádio posterior e a comissura basicapsular anterior das cápsulas óticas. Essas fissuras são voltadas para a fenestra hipofisial e correspondem às fissuras que acomodam as carótidas internas. Os canais semicirculares anterior e posterior das cápsulas óticas estão bem formados. As cartilagens paracordais permanecem separadas. Até este momento, os lados esquerdo e direito do neurocrânio estão unidos apenas rostralmente, pela estreita placa etmoidal.

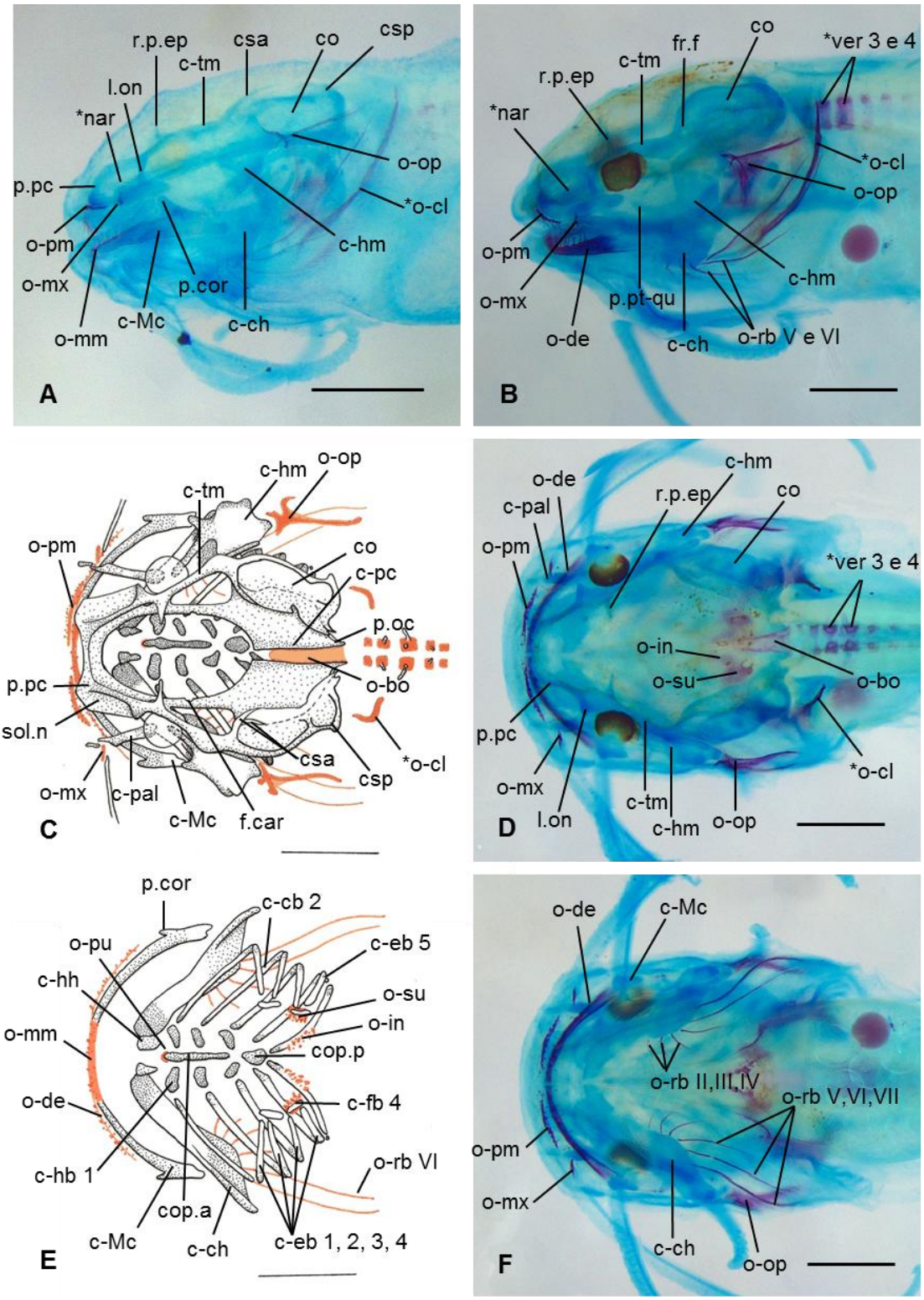


FIGURA 12: Etapa de desenvolvimento do sincrânio de exemplar de *Rhamdia quelen* com (A) CT 6,66 mm - Estádio de osteocrânio inicial I: ossos que suportam dentes e (B-F) CT 7,06 mm - Estádio de osteocrânio inicial II: base do neurocrânio endocondral. Fotomicrografias (A, B, D e F) e ilustrações (C e E) de exemplares diafanizados e corados com Azul de Alcian e Vermelho de Alizarina. Vistas: (A-B) laterais; (C-D) dorsais gerais; (E) dorsal do viscerocrânio e (F) vista ventral. Em E omitiram-se cartilagens hiomandibulares e palatinas, para que apenas as estruturas ocultadas pelo neurocrânio fossem mostradas. Em A, B, D e F a coloração rosa indica tecido ósseo e a coloração azul mais intensa indica cartilagens. Em C e E, as estruturas marcadas em laranja representam ossificações, marcadas em preto representam cartilagens ou resquícios destas e porções não preenchidas nem por cor, nem por pontos indicam regiões onde as cartilagens deixaram de corar, possivelmente por alterarem sua composição. **Símbolos:** *c-cb2*: cartilagem ceratobranquial

2; *c-ch*: cartilagem cerato-hial; *c-eb 1,2,3,4,5*: cartilagens epibranquiais 1, 2, 3, 4, 5; *c-fb 4*: cartilagem faringobranquial 4; *c-hb 1:* cartilagens hipobranquiais 1; *c-hh*: cartilagem hipo-hial; *c-hm*: cartilagem hiomandibular; *c-Mc*: cartilagem de Meckel; *co*: cápsula ótica; *cop.a*: copula anterior; *cop.p*: copula posterior; *c-pal:* cartilagem palatina; *c-tm*: trabécula marginal; *f.car*: fissura carótida interna; *fr.f*: forâmen facial; *l.on*: lâmina orbitonasal; *nar*: narina; *o-bo*: osso basioccipital; *o-cl*: osso cleitron; *o-de*: osso dentário; *o-in*: faringoinferior; *o-mm*: osso mentomeckelian; *o-mx*: osso maxilar; *o-op*: osso opérculo; *o-pm*: osso pré-maxilar; *o-pu*: osso paruro-hial; *o-rb II,III,IV,V,VI,VII*: raios branquiostegais II,III,IV,V,VI,VII; *o-su*: faringosuperior; *p.cor:* processo coronóide; *p.oc*: pila *occipitalis*; *p.pc*: processo pré-cerebral; *p.pt-qu*: processo pterigoide da cartilagem quadrada; *r.p.ep*: rudimento para a ponte epifisial; *sol.n*: solo nasal; *ver 3 e 4*: vértebras 3 e 4. * estruturas não pertencentes ao crânio-mandíbula. Escala: 0,5 mm.

Viscerocrânio

Arco mandibular: Primeiramente, as cartilagens de Meckel deixam de corar como cartilagens (com Azul de Alcian) em sua porção rostral onde se unem (pós-larvas CT 6,51 mm). Provavelmente isso acontece porque sua composição começou a ser alterada para futura substituição óssea. Logo o osso mentomeckelian começa a ser formado, repleto de dentes voltados para cima, substituindo as porções rostrais das cartilagens de Meckel. Essa ossificação ocorre das margens (pericôndrio) para o interior da cartilagem, caracterizando uma ossificação pericondral. Ao longo de sua formação o osso mentomeckelian fusiona-se em sua porção livre aos dentários (ossos dérmicos) (6,6 mm). Simultaneamente, as porções posteriores das cartilagens de Meckel também tornam-se fracamente coradas a partir deste estádio. No entanto, o processo coronóide e as porções medianas das cartilagens de Meckel, internas aos ossos dentários, permanecem bem coradas como cartilagem. O processo pterigóide da cartilagem quadrada tem um acentuado crescimento, alongando-se rostro-medialmente, em direção à cartilagem palatina e alcançando a região orbital na pós-larva com CT 6,66 mm.

Ossos intramembranosos: Ao mesmo tempo em que as porções rostrais das cartilagens de Meckel tornam-se claras, os dentários começam a se formar, repletos de dentes, aparecendo como um revestimento fino de osso dérmico ao redor das partes medianas das cartilagens de Meckel (as quais permanecem bem coradas como cartilagens). Como citado anteriormente, este osso fusiona-se ao mentomeckelian, formando uma ossificação mista chamada osso dento-mentomeckelian. Os dentes destas estruturas, bem como de todas as outras que suportam dentes descritas adiante, não são formados agregados com a estrutura em si, mas sim isolados, próximos a ela e, gradualmente, vão sendo conectados à estrutura que os servirá de base. Em pós-larva com CT 6,66 mm, os dentários prolongam-se e alcançam o processo coronóide. A parte superior do arco

mandibular também começa a ossificar, com o surgimento dos ossos dérmicos pré-maxilares e maxilares (CT 6,66 mm). Os primeiros aparecem como duas linhas finas, ventrais e anteriores à placa etmoidal, repletos de dentes voltados para baixo. Os maxilares aparecem como pequenas ossificações articuladas em um lado com a extremidade rostral das cartilagens palatinas e em outro, com os barbilhões maxilares.

Arco hióide e arcos branquiais: Neste estádio, a porção central das cartilagens hiomandibulares torna-se fracamente corada, enquanto as cartilagens inter-hiais parecem delimitar-se melhor, começando a separar-se do hiomandibular. As cartilagens quadradas começam a ossificar, pericondralmente, iniciando pela porção que articula com a cartilagem de Meckel. As cartilagens hipobranquiais, faringobranquiais, basibranquiais, ceratobranquiais, epibranquiais (com exceção da epibrânquia 5) e a parte central das cartilagens cerato-hiais possivelmente também começam a alterar sua constituição, uma vez que tornam-se fracamente coradas como cartilagens.

Ossos intramembranosos: Os opérculos já pareciam em contato com o processo opercular da cartilagem hiomandibular quando aparecem no estádio anterior. No entanto, neste estádio a articulação entre essas duas estruturas torna-se mais especializada, sendo visível três ramos ósseos na porção anterior de cada opérculo, que “abraçam” o processo opercular da cartilagem hiomandibular. No nível dos dois últimos arcos branquiais surgem dois pares de placas dérmicas repletas de dentes (CT 6,51 mm): um par dorsal (faringosuperior) e outro ventral (faringoinferior), mas ambos internos aos arcos branquiais e com dentes voltados para a faringe. O par dorsal localiza-se imediatamente abaixo das cartilagens faringobranquiais 4, enquanto o ventral, acima das porções anteriores das cartilagens ceratobranquais 5. Até pós-larva com CT 6,66 mm seis raios branquiostegais (II, III, IV, V, VI e VII) estão formados. Os raios conectam-se ao longo da margem caudal e centro-medial das cartilagens cerato-hiais e são formados gradualmente dos mais dorsais para os ventrais.

Por comparação com espécimes em etapas de desenvolvimento intermediário, pode-se dizer que a formação das placas dérmicas dentadas na faringe (faringosuperior e inferior) ocorre anteriormente à formação dos dentários e do primeiro par de raios branquiostegais, que por sua vez ocorrem antes da formação das pré-maxilas e maxilas.

4.3.5 Estádio de osteocrânio inicial II: base do neurocrânio endocondral - CT 7,60 mm – 7dpe (Fig. 12B- F)

O desenvolvimento do osteocrânio prossegue, incluindo a formação do primeiro centro de ossificação do neurocrânio, correspondente ao osso basioccipital.

Neurocrânio

Região etmoidal e orbital: Os processos para formação da ponte epifisial cresceram bastante quando comparados aos estádios anteriores e as trabéculas *cranii* tornam-se menos coradas de sua parte central a posterior, sugerindo a proximidade da substituição destas cartilagens por tecido ósseo. Os processos pré-cerebrais começam a engrossar no sentido medial, ou seja, um em direção ao outro, para formar nos estádios seguintes uma chapa vertical que constituirá a lâmina pré-cerebral.

Região ótica e occipital: As cápsulas óticas terminam seu desenvolvimento cartilaginoso, formando suas porções dorsais, embora estas não estejam unidas formando um teto sinótico. Os processos para a formação do forâmen Magnum (*pilaoccipitalis*) tornam-se mais pronunciados, mas também não chegam a se unir. As cartilagens paracordais aproximam-se na extremidade anterior da notocorda, mas não se unem. O primeiro centro de ossificação do neurocrânio aparece, iniciando a formação do osso basioccipital. Esta ossificação surge substituindo a extremidade anterior da notocorda, localizada entre as cartilagens paracordais. A ossificação ocorre no sentido posterior para anterior e inicia nas margens de contato da notocorda com as cartilagens paracordais, possivelmente caracterizando uma ossificação do tecido conjuntivo que reveste esta estrutura (ossificação pericordal). Como as trabéculas *cranii*, a base das cápsulas óticas torna-se gradativamente menos corada deste estádio em diante, tornando a maior parte da base do neurocrânio fracamente corada, e indicando a provável alteração da composição destas cartilagens.

Viscerocrânio

Arco Mandibular: A porção posterior da cartilagem de Meckel, que se articula com o osso quadrado em formação, também começa a ossificar pelas bordas, iniciando a formação do osso articular (ossificação pericondral) (Essa ossificação,

por ser muito precoce ainda neste estádio, é melhor visualizada nas imagens dos estádios seguintes). A parte central das cartilagens palatinas passa a corar fracamente neste estádio, possivelmente iniciando o processo de substituição endocondral (também melhor visualizado em imagens de estádios posteriores).

Ossos intramembranosos: Os ossos dento-mentomecklian, pré-maxilares e maxilares, bem como os seis pares de raios branquiostegais, encontram-se bem ossificados, mas os pré-maxilares, embora próximos não se unem rostralmente.

Arco Hióide e Arcos branquiais: Os ceratobranquiais 5 são os primeiros a ossificar (ossificação pericondral) e neste estádio, já se apresentam parcialmente ossificados na porção ventral às placas dérmicas faringoinferiores, mantendo-se no entanto, ainda em sua maior parte cartilaginoso.

Ossos intramembranosos: Próximo à região de fusão de cartilagens basibranquiais 1, 2 e 3 (copula anterior), começa a formação do osso paruro-hial, o qual neste estádio apresenta-se como uma linha curva de natureza óssea, acompanhando ventralmente o desenho da extremidade anterior da copula anterior. Os opérculos ossificam mais, assumindo um formato aproximadamente triangular neste estádio.

4.3.6 Estádio de osteocrânio inicial III: base dérmica do neurocrânio- CT 8,22 mm - 13 dpe

Uma importante ossificação dérmica (osso paraesfenóide) começa a ser formada, dando início à cobertura ventral da base do neurocrânio e formação do primeiro palato. (O nome das novas estruturas pode ser acompanhado pela Fig. 13 do estádio seguinte).

Neurocrânio

Embora os processos para formação do arco occipital (forâmen magnum) tenham crescido um pouco mais em relação ao estádio anterior, neste estádio, estes ainda não se encontram.

Ossos intramembranosos: O osso paraesfenóide começa a se formar, aparecendo como uma chapa, em um plano ventral, mas muito próximo à base do neurocrânio, com formato similar a um “Y” ligado ao osso basioccipital posteriormente pelo braço maior e os outros dois braços paralelos às cartilagens

trabéculas *cranii,* acompanhando às margens da fenestra hipofisial existente entre elas.

Viscerocrânio

Arco mandibular: As cartilagens de Meckel já se apresentam ossificadas ou recobertas por ossos em toda a sua porção rostral e central, pelos ossos mistos dento-mentomeckelians. Na porção posterior, em que articulam com os ossos quadrados, as cartilagens de Meckel permanecem diferenciando-se nos ossos articulares. Na extremidade posterior, além da articulação como osso quadrado, as cartilagens de Meckel começam a ossificar pericondrialmente, iniciando a formação dos ossos retroarticulares. O processo coronóide permanece com constituição cartilaginosa e descoberto de qualquer osso.

Arco Hióide e Arcos Branquiais: A extremidade posterior da cartilagem cerato-hial torna-se fracamente corada, indicando a proximidade de sua substituição. As cartilagens hipo-hiais têm seus limites bem definidos, localizando-se na extremidade antero-medial dos cerato-hiais, porém permanecendo unidas a estes. Os arcos branquiais não estão mais ossificados do que no estádio anterior, exceto pelos ceratobranquiais 5, que começaram a ossificar neste estádio. No entanto, nota-se que os hipobranquiais 1, 2 e 3 estão mais robustos e a copula posterior começa a alterar seu formato, tornando-se um pouco mais quadrada. Os ceratobranquiais 5 estão tão próximos desta última que suas extremidades anteriores parecem sobrepô-la dorsalmente.

Ossos intramembranosos: O osso paruro-hial e opérculos não apresentam grandes diferenças quando comparados ao estádio anterior.

4.3.7 Estádio de osteocrânio médio I: canal sensorial mandibular- CT 9,87 mm - 16 dpe (Fig.13)

O primeiro canal dérmico começa a ser formado ao redor de neuromastos (estruturas do sistema de linha lateral) frontais da mandíbula, iniciando a cobertura óssea do canal sensorial mandibular (embora tenha iniciado seu desenvolvimento aqui, essa ossificação, por ainda ser fracamente mineralizada, só pode ser visualizada nas fotomicrografias do estádio seguinte – Fig. 14D). Simultaneamente inicia-se a ossificação de elementos do arco hióide e a ossificação da base do neurocrânio expande com o aparecimento dos ossos exoccipitais, laterais ao basioccipital.

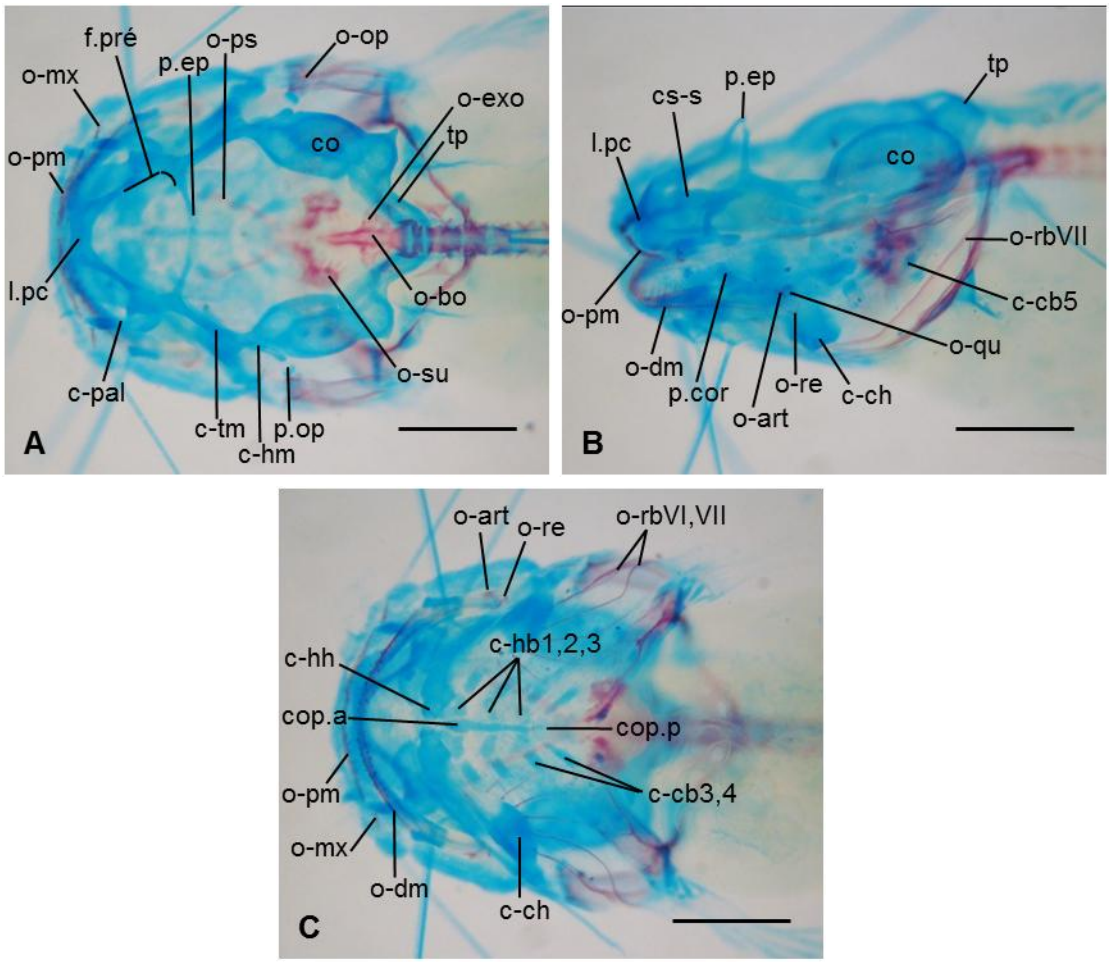


FIGURA 13: Etapa de desenvolvimento do sincrânio de exemplar de *Rhamdia quelen* com CT 9,87 mm - Estádio de osteocrânio médio I: canal sensorial mandibular. Fotomicrografias de exemplar diafanizado e corado com Azul de Alcian e Vermelho de Alizarina. Vistas: (A) dorsal; (B) lateral e (C) ventral. A coloração rosa indica tecido ósseo, e a coloração azul mais intensa indica cartilagens. **Símbolos:** *c-cb3,4,5*: cartilagem ceratobranquial 3, 4 e 5; *c-ch*: cartilagem cerato-hial; *c-hb1,2,3*: cartilagem hipobranquial 1, 2, 3; *c-hh*: cartilagem hipo-hial; *c-hm*: cartilagem hiomandibular; *co*: cápsula ótica; *cop.a*: copula anterior; *cop.p*: copula posterior; *c-pal*: cartilagem palatina; *cs-s*: comissura esfeno-septal; *c-tm*: trabécula marginal; *f.pré*: fontanela pré-pineal; *l.pc*: lâmina pré-cerebral; *o-art*: osso articular; *o-bo*: osso basioccipital; *o-dm*: osso dentomentomeckelian; *o-exo*: osso exoccipital; *o-mx*: osso maxilar; *o-op*: osso opercular; *o-ps*: osso paraesfenóide; *o-pm*: osso pré-maxilar; *o-qu*: osso quadrado; *o-rb VI,VII*: raio branquiostegal VI e VII; *o-re*: osso retroarticular; *o-su*: faringosuperior; *p.cor*: processo coronóide; *p.ep*: ponte epifisial; *p.op*: processo opercular; *tp*: teto posterior. Escala: 0,5 mm.

Neurocrânio

Região etmoidal e orbital: A ponte epifisial é formada pela fusão de seus rudimentos direito e esquerdo (os quais vem se desenvolvendo desde o estádio de condrocrânio médio - CT 4,03 mm), dividindo o grande espaço antes existente em fontanela pré-pineal e pós-pineal. A fissura para a carótida interna torna-se mais profunda nas trabéculas *cranii* (devido à fraca coloração assumida pelas trabéculas

cranii no estádio anterior, esta visualização é dificultada em fotomicrografias). A lâmina pré-cerebral está bem formada, constituindo uma parede vertical, localizada entre as porções anteriores das comissuras esfeno-septais direita e esquerda.

Ossos intramembranosos: O paraesfenóide encontra-se um pouco mais ossificado, mas mantém seu formato do estádio anterior.

Região ótica e occipital: Os processos para a formação do arco occipital unem-se dorsalmente, conectando os lados esquerdo e direito do neurocrânio cartilaginoso na região posterior. Novos centros de ossificação do neurocrânio aparecem, como expansões laterais do osso basioccipital, constituindo os ossos exoccipitais.

Viscerocrânio

Arco Mandibular: Os ossos retroarticular e articular continuam seu desenvolvimento pericondral na porção posterior da cartilagem de Meckel, sem, no entanto, apresentarem grandes alterações comparados ao estádio anterior. Contudo, embora ainda sejam rudimentares, estes ossos já estão conectados, apresentando uma continuidade ao longo da antiga margem cartilaginosa que substituem, podendo por isso ser chamados, a partir de agora, de complexo articulo-retroarticulo. A cartilagem quadrada está ossificada apenas na porção em que se articula com o complexo articulo-retroarticulo, formando o osso quadrado. No entanto, neste estádio não há sinais de ossificação de seu processo pterigóide ou conexão com o osso hiomandibular em formação.

Ossos intramembranosos: Os dentários começam a formar um sulco ventro-lateral. Na porção ventral e posterior do osso mentomeckelian, do complexo dento-mentomeckliano, começa a ser formado um osso dérmico em forma de canal, o esplenial (Fig. 14D). Este osso começa a se desenvolver ao redor de um neuromasto da região anterior do complexo dento-mentomeckelian, o qual começa a se aprofundar na mandíbula. Neste estádio é possível perceber que a formação do esplenial começa na região do osso mentomeckelian, sendo fusionado ao complexo dento-mentomeckelian à medida que se forma.

Arco Hióide: As cartilagens cerato-hiais começam a ossificar pericondralmente em sua porção central (Fig 14B e E). Embora ainda bastante rudimentar neste estádio, essa ossificação representa o início da formação do osso cerato-hial anterior. A face caudo-ventral das cartilagenshipo-hiais começa a ser

substituída por osso, iniciando a formação dos ossos hipo-hiais ventrais. A conexão entre as cartilagens inter-hiais e hiomandibulares torna-se fracamante corada.

Arcos Branquiais: Os centros das cartilagens epibranquiais 3 e 4, bem como as ceratobranquiais 4 começam a ossificar (ossificação pericondral). Os ceratobranquiais 5 estão bem ossificados neste estádio, mas suas extremidades são mantidas cartilaginosas.

Ossos intramembranosos: O osso paruro-hial começa a desenvolver duas asas em direção caudal, como duas pequenas membranas ósseas paralelas, unidas apenas anteriormente. Os raios branquiostegais tornam-se gradativamente mais robustos a partir deste estádio, iniciando pelo raio branquiostegal mais dorsal. Os primeiros sinais da ossificação dérmica interopercular aparecem (Fig.14D), no nível da articulação entre hiomandibulares e inter-hiais.

4.3.8 Estádio de osteocrânio médio II: canais sensoriais do teto craniano - CT 13,71 mm - 19 dpe (Fig. 14)

Neste estádio observa-se um grande número de mudanças, sendo a principal delas o início da formação dos canais dérmicos que recobrem os canais sensoriais principais do sistema de linha lateral no teto craniano. Além destes, são formados novos ossos na base das cápsulas óticas, região etmóide, série opercular e componentes dos arcos branquiais.

Neurocrânio

Região etimoidal e orbital: A conexão entre as trabéculas marginais e as cápsulas óticas deixa de corar como cartilagem, possivelmente iniciando seu processo de substituição. A fissura para a carótida interna abre-se até a outra margem da trabécula *cranii*, tornando a fenestra hipofisial e as fenestras esfenóticas ligadas, por meio das trabéculas *cranii* interrompidas. As primeiras porções do complexo ósseo mesetmóide começam a se formar pericondralmente, como duas chapas finas, uma dorsal, substituindo a lâmina pré-cerebral, e outra ventral, substituindo a placa etmoidal. Essas duas partes do futuro complexo ósseo mesetmóide constituem, respectivamente, os ossos supraetmóide e hipoetmóide (este último não é visível na Fig. 14 por ser ocultado pelo supraetmóide em vista dorsal), que juntamente com os laterodermoetmóides (ossificações dérmicas) formarão o complexo chamado mesetmóide.

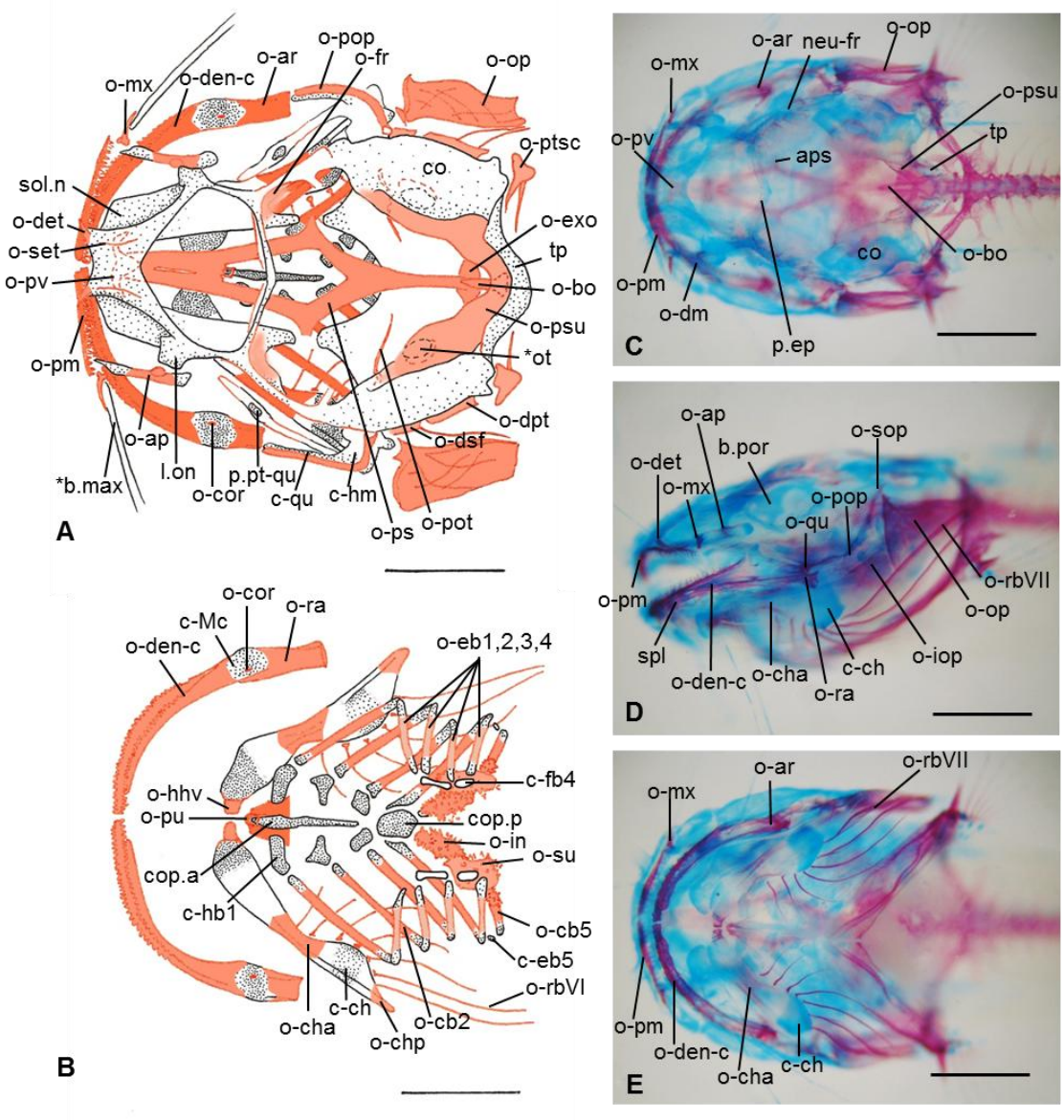


FIGURA 14: Etapa de desenvolvimento do sincrânio de exemplar de *Rhamdia quelen* com CT 13,71 mm - Estádio de osteocrânio médio II: canais sensoriais do teto craniano. Ilustrações (A e B) e fotomicrografias (C a E) de exemplar diafanizado e corado com Azul de Alcian e Vermelho de Alizarina. Vistas: (A e C) dorsais gerais; (B) dorsal do viscerocrânio; (D) lateral e (E) ventral. Em C, D e E a coloração rosa indica tecido ósseo, e a coloração azul mais intensa indica cartilagens. Em A e B estruturas marcadas em laranja representam ossificações, em preto, representam cartilagens ou resquícios destas e porções não preenchidas nem por cor, nem por pontos indicam regiões onde as cartilagens deixaram de corar, provavelmente por alterarem sua composição. Em B as cartilagens hiomandibulares e palatinas foram omitidas para que apenas as estruturas ocultas pelo neurocrânio fossem visualizadas. **Símbolos:** *asp*: asa do paraesfenóide; *b.máx*: barbilhão maxilar; *b.por*: base pré-orbital; *c-ch*: cartilagem cerato-hial; *c-eb5*: cartilagem epibranquial 5; *c-fb4*: cartilagem faringobranquial 4; *c-hb1*: cartilagem hipobranquial 1; *c-hm*: cartilagem hiomandibular; *co*: cápsula ótica; *cop.a*: copula anterior; *cop.p*: copula posterior; *c-qu*: cartilagem quadrada; *l.on*: lâmina orbitonasal; *neu-fr*: componente neurodérmico dos ossos frontais; *o-ap:* osso autopalatino; *o-ar*: complexo articulo-retroarticulo; *o-bo*: osso basioccipital; *o-cb2,5*: osso ceratobranquial 2 e 5; *o-cha*: osso cerato-hial anterior; *o-chp*: osso cerato-hial posterior; *o-cor*: osso coronóide; *o-des*: osso dentoesplênio; *o-det*: osso laterodermoetmóide; *o-dm:* osso dentomentomeckelian; *o-dp*: osso dermopterótico; *o-ds*: osso dermoesfenótico; *o-eb1,2,3,4*: osso epibranquial 1,2,3 e 4; *o-exo*: osso exoccipital; *o-fr:* osso frontal; *o-hhv*: osso hipo-hial ventral; *o-in*: faringoinferior; *o-iop*: osso interopercular; *o-mx*: osso maxilar; *o-op*: osso opercular; *o-ps*: osso paraesfenóide; *o-pm*: osso pré-maxilar; *o-po:* osso pré-ótico; *o-pop*: osso pré-opercular; *o-psu*: osso parieto-supraoccipital; *o-ptsc*: osso pós-temporo-supracletron; *o-pu*: osso paruro-hial; *o-pv*: osso pré-vomeral; *o-rbVI,VII:* raio branquiostegal VI e VII; *o-set*: osso supraetmóide; *o-sop*: osso supraopercular; *o-su*: faringosuperior; *ot*: otólito; *p.ep*: ponte epifisial; *p.pt-qu*: processo pterigoide da cartilagem quadrada; *sol.n*: solo nasal; *tp*: teto posterior. Escala: 0,8 mm.

Ossos intramembranosos: Os ramos anteriores do paraesfenóide crescem em direção à região etmoidal e se encontram, fazendo com que este osso altere seu formato anterior de “Y” para um losango de extremidades alongadas, vazado em sua porção central. Na altura da interrupção das trabéculas *cranii* devido à abertura das fissuras para as carótidas internas, o paraesfenóide desenvolve duas asas laterais, que preenchem este espaço, chegando às fenestras esfenoidais. Na extremidade anterior do paraesfenóide, ventral à base cartilaginosa do neurocrânio, e posterior ao nível da lâmina pré-cerebral, forma-se o osso pré-vomeral. Acima dos ossos pré-maxilares, formam-se os laterodermoetmóides, um par de ossos dérmicos estreitos, paralelos aos pré-maxilares na maior parte de sua extensão, que crescem dorso-posteriormente em sua extremidade medial, acompanhando a lâmina pré-cerebral. Dois grandes centros de ossificação dérmica começam a ser formados neste estádio, desenvolvendo-se das laterais para o centro do teto craniano. Essas ossificações darão origem aos ossos frontais, mas desenvolvem primeiramente seus componentes neurodermais, ou seja, aqueles que revestem a porção do canal sensorial cefálico que atravessa estes ossos, sendo, por isso, em forma de canal. O componente neurodérmico dos frontais reveste o canal sensorial supraorbital, acompanhando a porção anterior das trabéculas marginais, posterior das comissuras esfeno-septais, e a ponte epifisial (ramo epifisial do canal supraorbital).

Região ótica e occipital: A base das cápsulas óticas começa a ser substituída por osso em sua região central e anterior, iniciando a formação dos ossos proóticos. Estes são planos levemente côncavos, de formato circular, com sua margem anterior um pouco mais ossificada que o restante e formando um processo em direção latero-dorsal. Esse processo alcança menos da metade da altura das cápsulas óticas neste estádio e substitui parcialmente a parede anterior destas, enquanto o restante da ossificação acomoda o otólito. Os ossos exoccipitais estão bem desenvolvidos e sustentam a entrada do sistema nervoso central na região cefálica, formando uma base para esta, acima do osso basioccipital. Na parte posterior dos exoccipitais, define-se um forâmen ao longo de sua ossificação, possivelmente o forâmen para o nervo vago (não visualizado pela Fig.14, por localizar-se na região posterior das cápsulas óticas). Neste estádio, o par de *pilaoccipitalis* encontra-se ossificado. Os otólitos estão começando a mineralizar, aparecendo a partir deste estádio como estruturas esbranquiçadas.

Ossos intramembranosos: O complexo ósseo parieto-supraoccipital constitui uma ossificação mista, que inicia seu desenvolvimento neste estádio com a formação de um osso dérmico à frente do teto posterior (componente supraoccipital do complexo), o qual se expande em direção à porção medial do teto das cápsulas óticas (componente parietal do complexo). A porção lateral do teto das cápsulas óticas começa a ser recoberta por dois ossos dérmicos em forma de canais. Estes representam o início da formação dos ossos esfenóticos (anteriores) e pteróticos (posteriores), porém neste estádio apenas suas porções neurodermais começaram a se desenvolver, chamadas, portanto dermoesfenótico e dermopterótico. Embora ainda bastante rudimentares, os dermoesfenóticos já estão conectados aos componentes neurodermais dos frontais, mas ainda não se conectam aos dermopteróticos. Na porção caudal das cápsulas óticas, começam a ser formados os ossos postemporo-supracleitrons, sendo cada um destes constituído de um processo fino e alongado, no sentido ventro-medial (componente supracleitron) e de uma parte plana dorsal com um canal dérmico central, o qual reveste a continuação do canal temporal, que deixa o osso dermopterótico (componente pós-temporal).

Viscerocrânio

Arco mandibular: O osso quadrado começa a se desenvolver em direção ao processo pterigóide, substituindo este gradualmente. Neste estádio, o osso quadrado forma dois processos finos, sendo um ventral maior e um dorsal, que substituem as margens de seu processo pterigóide (ossificação pericondral). A cartilagem palatina é substituída em sua porção central por osso (ossificação endocondral), começando a formação do osso autopalatino. No arco mandibular inferior, os complexos ósseos retroarticular-articulares se desenvolvem em direção aos processos coronóides, sendo estes as únicas porções da mandíbula ainda não envoltas ou substituídas por ossos.

Ossos intramembranosos: Os ossos espleniais desenvolvem-se por toda a extensão ventral dos dentários, fusionando-se a eles, formando os ossos dento-espleniais. Estes ossos ainda não são canais completos, sendo que a porção em formação destes corresponde à parede medial do canal durante este estádio. Sobre o processo coronóide, surge uma ossificação sesamóide, o osso coronomeckeliano. Este osso aparece como uma pequena pontuação, medial a base do processo

coronóide, em posição central. Os ossos maxilares estão mais desenvolvidos que no estádio anterior.

Arco Hióide: A cartilagem hiomandibular começa a ser substituída por osso em sua porção central, próxima ao processo opercular. Os ossos hipo-hiais ventrais encontram-se bem ossificados. Os ossos cerato-hiais anteriores crescem um pouco mais e as antigas cartilagens cerato-hiais começam a ser substituídas por ossos também em suas porções posteriores neste estádio, próximo à articulação com as cartilagens inter-hiais, iniciando a formação dos cerato-hiais posteriores, também chamados epi-hiais.

Arcos branquiais: Os elementos intermediários dos arcos branquiais que ainda não haviam começado a ossificar (ceratobranquiais 1, 2 e 3 e epibranquiais 1 e 2) iniciam sua ossificação endocondral em suas porções centrais.

Ossos intramembranosos: As placas dérmicas faringosuperiores e faringoinferiores, localizadas internamente aos últimos arcos branquiais, começam a aumentar gradualmente a partir deste estádio, em tamanho da placa e número de dentes. O par ventral de placas dérmicas faringoinferiores alonga-se cobrindo dorsalmente praticamente toda a extensão das ceratobrânquias 5. O par dorsal de placas dérmicas faringosuperiores, por sua vez, cresce permanecendo em formato circular. Forma-se um novo raio branquiostegal neste estádio, totalizando sete raios branquiostegais ossificados, que se tornam mais robustos gradativamente. As duas asas do osso paruro-hial crescem na direção caudal, mantendo suas margens mediais paralelas entre si. A porção que une as duas asasna porção anterior deste osso se desenvolve em sentido dorsal, abraçando parcialmente a porção anterior da copula cartilaginosa. Os quatro ossos dérmicos da série opercular estão presentes neste estádio (pré-operculares, interoperculares, supraoperculares e operculares). Os pré-operculares aparecem como ossos em forma de canal, estendendo-se do nível da margem caudo-ventral da cartilagem hiomandibular até o processo opercular desta. Os interoperculares tornam-se mais distinguíveis neste estádio, como ossos dérmicos em forma de chapa, localizados sobre a articulação entre cerato-hiais e inter-hiais. Os supraoperculares formam-se um pouco a cima do processo opercular da cartilagem hiomandibular, alinhados à margem dorsal-caudal desta. Apresentam-se em forma de chapa, porém com um canal em sua porção central, o qual reveste um canal sensorial cefálico na continuação dos pré-operculares.

4.3.9 Estádio de osteocrânio médio III: intensificação de ossificação - CT 19,46 mm - 25 dpe (Fig. 15)

Os ossos que iniciaram sua formação no estádio anterior começam a aumentar seu grau de ossificação, sem, no entanto, haver grandes alterações em seus formatos. Poucos ossos iniciam sua formação neste estádio, mas o grande número de inovações ocorridas no estádio anterior desenvolvem-se um pouco mais, tornando-se agora mais evidentes.

Neurocrânio

Região etmoidal e orbital: A porção anterior das bases pré-orbitais, bem como a porção central das trabéculas *cranii* deixam de corar como cartilagem neste estádio. Próximo à margem posterior da órbita ocular, começa a ser formado o osso pteroesfenóide. Este aparece como uma ossificação fraca neste estádio, que se desenvolve tanto no sentido medial, em direção às asas laterais do paraesfenóide quanto lateral, em direção à margem anterior do osso hiomandibular. Por meio da análise dos espécimes diafanizados e corados, não é possível afirmar o tipo desta ossificação (de substituição ou dérmica). No entanto, ela parece substituir porções posteriores das trabéculas marginais e possivelmente porções das paredes frontais das cápsulas óticas, o que caracterizaria, portanto, ossos de substituição.

Ossos intramembranosos: Os ossos pré-maxilares começam a assumir uma forma achatada, de duas chapas estreitas, alargando-se no sentido antero-posterior. Essa alteração parece iniciar-se neste estádio, mas segue de maneira gradual ao longo dos estádios seguintes. Os ossos nasais começam a ser formados por sua porção anterior, como duas canaletas laterais à lâmina pré-cerebral (não visualizados na Fig. 15 devido ao seu grau ainda fraco de ossificação nesse estádio). Em um nível anterior e dorsal aos autopalatinos, um par de ossos dérmicos em forma de canal começa a se desenvolver como duas linhas finas paralelas aos autopalatinos, constituindo os ossos antorbitais. O osso paraesfenóide ossifica em sua parte central, tornando-se um osso plano e contínuo e suas asas laterais começam a expandir na fenestra esfenoidal. A partir deste estádio o paraesfenóide torna-se gradativamente mais robusto. Embora permaneça como um osso em forma de chapa, sua largura aumenta ao longo dos próximos estádios em direção as laterais do crânio. Os frontais desenvolvem-se um pouco mais, iniciando a formação

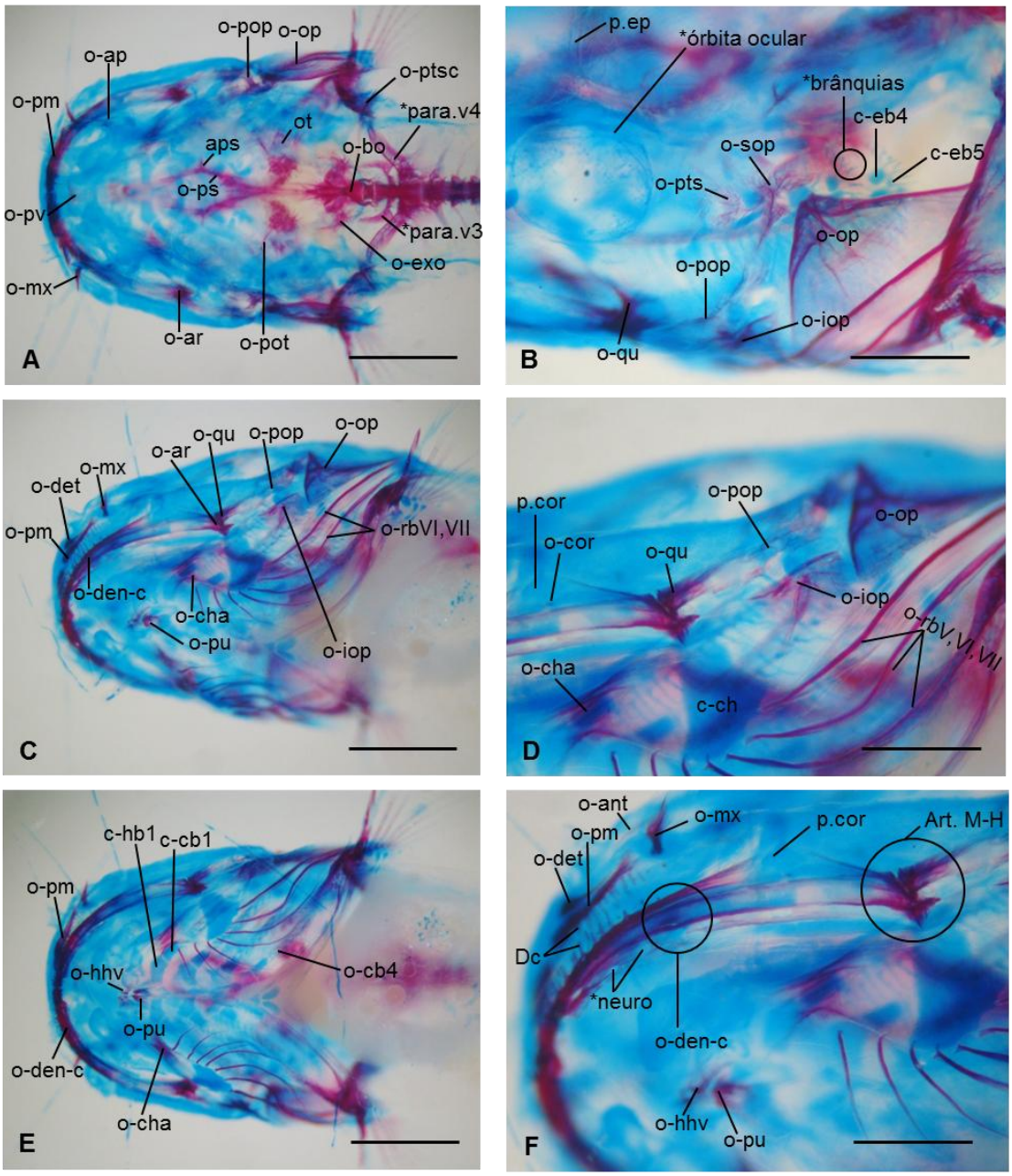


FIGURA 15. Etapa de desenvolvimento do sincrânio de exemplar de *Rhamdia quelen* com CT 19,46 mm - Estádio de osteocrânio médio III: Intensificação da ossificação. Fotomicrografias de exemplar diafaizado e corado com Azul de Alcian e Vermelho de Alizarina. Vistas: (A) dorsal; (B) dorso-lateral; (C, D e F) ventro-lateral e (E) ventral. A coloração rosa indica tecido ósseo, e a coloração azul mais intensa indica cartilagens. **Símbolos:** *aps*: asa do paraesfenóide; *Art.M-H*: Articulação do arco mandibular com arco hioide; *c-cb1,4*: cartilagem ceratobranquial 1 e 4; *c-ch*: cartilagem cerato-hial; *c-eb4,5*: cartilagem epibranquial 4 e 5; *c-hb1*: cartilagem hipobranquial 1; *Dc*: dentes cônicos; *neuro*: neuromastos; *o-ant*: osso antorbital; *o-ap*: osso autopalatino; *o-ar*: complexo articulo-retroarticular; *o-bo*: osso basioccipital; *o-cha*: osso cerato-hial anterior; *o-cor*: osso coronomeckeliano; *o-den-c:* complexo dento-esplênio-mentomeckelian; *o-det*: osso dermolateroetmóide; *o-exo*: osso exoccipital; *o-hhv*: osso hipo-hial ventral; *o-iop*: osso interopercular; *o-mx*: osso maxilar; *o-op:* osso opérculo; *o-ps*: osso paraesfenóide; *o-pm*: osso pré-maxilar; *o-pop*: osso pré-opercular; *o-pot*: osso proótico; *o-ptsc*: osso pós-temporo-supracleitron; *o-pu*: osso paruro-hial; *o-pv*: osso pré-vomeral; *o-qu*: osso quadrado; *o-rbVI,VII*: radii branchiosteghi; *o-sop*: osso supraopercular; *ot*: otólito; *p.cor*: processo coronóide; *p.ep*: ponte epifisial; *para.v3,v4*: parapófises vértebras 3 e 4; *estruturas não pertencentes ao crânio-mandíbula. Escala: 1 mm (A,C e E) e 0,5 mm (B, D e F).

de seus componentes membranodérmicos (fracamente visualizado posteriormente a ponte epifisial na Fig. 15B, embora não indicado nesta, devido ao seu fraco grau de ossificação), principalmente na região que recobre a fenestra pós-pineal.

Região ótica e occipital: Apenas algumas porções do teto das cápsulas óticas permanecem coradas como cartilagens neste estádio. Os prooticos aumentam o grau de ossificação, mas não sofrem alterações em seu formato, com exceção de seu processo anterior em direção dorsal, o qual aumenta alcançando metade da altura das cápsulas óticas. Os ossos exoccipitais expandem-se, começam a substituir a parte posterior das cápsulas óticas (comissura basicapsular posterior e parede traseira) e desenvolvem um processo fino na base das cápsulas óticas direcionado para os prooticos. O teto posterior cartilaginoso, bem como o teto das cápsulas óticas são substituídos pelo osso parieto-supraoccipital (não visualizados na Fig. 15 devido ao foco da imagem a fim de mostrar outras estruturas internas em relação a este osso), que apesar de sua origem inicial dérmica, neste momento substitui essas cartilagens com seu crescimento em direção caudal e antero-lateral, respectivamente. O componente membranodérmico do esfenótico (autoesfenótico) (também não visualizado na Fig. 15 por questões de foco) começa a se formar, substituindo a porção onde ocorre a conexão entre as trabéculas marginais e as cápsulas óticas parte da porção anterior dessas cápsulas. Desde o início de sua formação, essa porção parece ligada ao componente neurodérmico, o osso dermoesfenótico (ossificação dérmica).

Viscerocrânio

Arco mandibular: Os processos ósseos do osso quadrado em direção ao processo pterigóide desenvolvem-se pouco, quando comparados ao estádio anterior. Tanto o complexo de ossificação mista dento-esplênio-mentomeckelian, quanto o articulo-retroarticulo avançam em direção ao processo coronóide unindo-se ventralmente a este.

Ossos intramembranosos: A parede medial dos canais ósseos espleniais torna-se mais ossificada, sendo distinguíveis, ao longo desta, seis fenestras para neuromastos (Fig. 15F). O osso coronomeckeliano permanece como uma pontuação pequena.

Arco Hióide: O osso hiomandibular encontra-se ossificado em sua porção central e posterior (processo opercular), com o forâmen para o nervo fácil delimitado

(pode ser bem visualizado em estádios seguintes devido ao seu baixo grau de mineralização neste estádio). Os demais ossos endocondrais do arco hióide, hipo-hiais ventrais, cerato-hiais anteriores e posteriores, bem como os ossos quadrados, embora aparentemente não tenham alterado seu tamanho, apresentam um grau de ossificação um pouco maior comparado ao estádio anterior.

Arcos Branquiais: As cartilagens ceratobranquiais 1 e epibranquiais 1reforçam sua substituição óssea, corando mais intensamente e, consequentemente, tornando-se mais mineralizadas. Os demais ceratobranquiais e epibranquiais 2, 3 e 4 encontram-se bem ossificados comparados aos seus equivalentes do primeiro arco branquial. O processo uncinado das epibrânquias 3 é formado neste estádio. As epibrânquias 5 não ossificam, mas crescem um pouco neste estádio, assumindo uma forma oval. A faringobrânquia 3, também começa a ossificar, enquanto a quarta faringobrânquia não cora mais como cartilagem, mas também não apresenta sinais de ossificação. Os basibranquiais 2 e 3 (até agora visualizado na fusão de basibranquiais 2, 3 e 4 ou copula anterior) deixam de corar como cartilagens, provavelmente iniciando seu processo de substituição óssea, mas permanecem intercalados por fragmentos de cartilagem do restante da copula anterior.

Ossos intramembranosos: As duas asas do osso paruro-hial se unem, deixando entre elas apenas um forâmen elíptico próximo a suas margens anteriores (não visível na Fig. 15 devido ao ângulo em que os indivíduos foram fotomicrografados). Este forâmen constitui o forâmen paruro-hial. Os ossos da série opercular apresentam um grau de ossificação um pouco maior do que no estádio anterior, mas variam pouco em relação a sua forma.

4.3.10 Estádio de osteocrânio médio IV: teto craniano - CT 22,66 - 35 dpe

Neste estádio as chapas dérmicas que formam o teto craniano começam a se expandir. Estas correspondem a porções membranodérmicas dos ossos do teto craniano, que se desenvolvem na maioria dos casos ligadas às porções neurodérmicas (que revestem os canais sensoriais) (O nome da maioria das estruturas pode ser acompanhado por meio da Fig. 16, referente ao estádio seguinte).

Neurocrânio

Região etimoidal e orbital: Os ossos hipo e supraetmóide crescem no sentido posterior e se unem em sua porção anterior aos ossos dérmicos laterodermetmóides, formando o osso misto mesetmóide. A porção central do solo nasal torna-se fracamente corada como cartilagem a partir deste estádio.

Ossos intramembranosos: A porção membranodérmica dos frontais desenvolve-se também sobre a fenestra pré-pineal neste estádio. Túbulos antorbitais tornam-se um pouco mais alongados na direção caudal, acompanhando o canal sensorial infraorbital. Medial a estes ossos começa a se formar, ainda que dificilmente visualizado devido ao baixo grau de ossificação, um novo par de ossificações dérmicas, também em formato tubular, iniciando a formação dos lacrimais. Neste estádio, apenas a parede posterior destes tubos começou a ossificar, sendo, portanto discerníveis apenas como traços leves de ossificação próximos aos antorbitais (visíveis com a movimentação do micrométrico apenas). Os nasais tornam-se mais aparentes neste estádio e crescem em direção aos frontais, embora ainda apresentem-se como canais rudimentares.

Região ótica e occipital: Os autoesfenóticos expandem-se um pouco mais sobre a lateral das cápsulas óticas. Estes ossos formam também neste estádio uma expansão ventral, como uma aba localizada dorsalmente aos hiomandibulares. Os autopteróticos começam a se desenvolver na lateral dos dermopteróticos (ossos dérmicos).

Viscerocrânio

Arco mandibular: A parte superior do arco mandibular se desenvolve com a formação do osso metapterigóide. Este aparece substituindo pericondralmente a extremidade anterior do processo pterigóide da cartilagem quadrada. Os finos processos do osso quadrado que ossificam as margens de seu processo cartilaginoso pterigóide desenvolvem-se, tornando-se próximos do osso metapterigóide em formação. Os autopalatinos aumentam em tamanho, restando apenas as extremidades da cartilagem palatina não substituídas por osso.

Ossos intramembranosos: Juntamente com o osso metapterigóide em formação, forma-se uma expansão óssea, em forma de uma chapa trapezoidal, a partir da extremidade anterior do metapterigóide na direção medial, formando uma base para os olhos. Essa ossificação corresponde ao osso sesamóide

entopterigóide, que começa a se desenvolver. Sobre o processo coronóide da cartilagem de Meckel, numa região dorso-caudal deste, surge uma nova ossificação dérmica, como uma pequena placa esférica, constituindo o osso angular. O osso coronomeckeliano, embora continue pequeno, modifica-se deixando de ser uma ossificação em forma de ponto e passando a assumir a forma de um pequeno risco. Os ossos espleniais ultrapassam o nível dos processos coronóides, começando a formar suas porções angulares e intrarticulares (relacionadas ao complexo articulo-retroarticulo). Suas porções anteriores, ligadas aos dentários (ossos dento-espleniais) começam a formar as paredes laterais que recobrem o canal sensorial mandibular. Neste estádio as fenestrações que acomodam os seis neuromastos em cada mandíbula estão sendo definidas nestas novas paredes do tubo esplenial recém formadas.

Arco Hióide: Os ossos hiomandibulares já estão bem ossificados e os cerato-hiais anteriores e posteriores expandem-se. Neste estádio, a parte dorsal dos hipo-hiais começa a ossificar.

Arcos Branquiais: Na superfície das ceratobrânquias dos quatro primeiros arcos branquiais, começam a se formar espinhos (dentículos dos rastros branquiais), aparecendo neste estádio na metade posterior dorsal destas estruturas.

Ossos intramembranosos: Os ossos da série opercular encontram-se bem ossificados e os raios branquiostegais mais dorsais tornaram-se mais espessos. As asas do osso paruro-hial crescem um pouco mais e o forâmen paruro-hial começa a reduzir seu tamanho.

4.3.11 Estádio de osteocrânio tardio I: narinas e região orbital - CT 25,09 – 40 dpe (Fig. 16)

A região etmoidal desenvolve-se com o início da formação endocondral do osso etmóide lateral. Este se relaciona tanto às narinas, quanto às órbitas oculares, participando ainda da cobertura dorsal do neurocrânio anterior.

Neurocrânio

Região etmoidal e orbital (esta região pode ser melhor visualizada na Fig. 17D a F referente ao estádio seguinte, devido ao baixo grau de ossificação que suas estruturas apresentam nesse estádio): A porção ventral da lâmina orbitonasal, bem como a porção anterior da base pré-orbital, começam a ser substituídas por uma

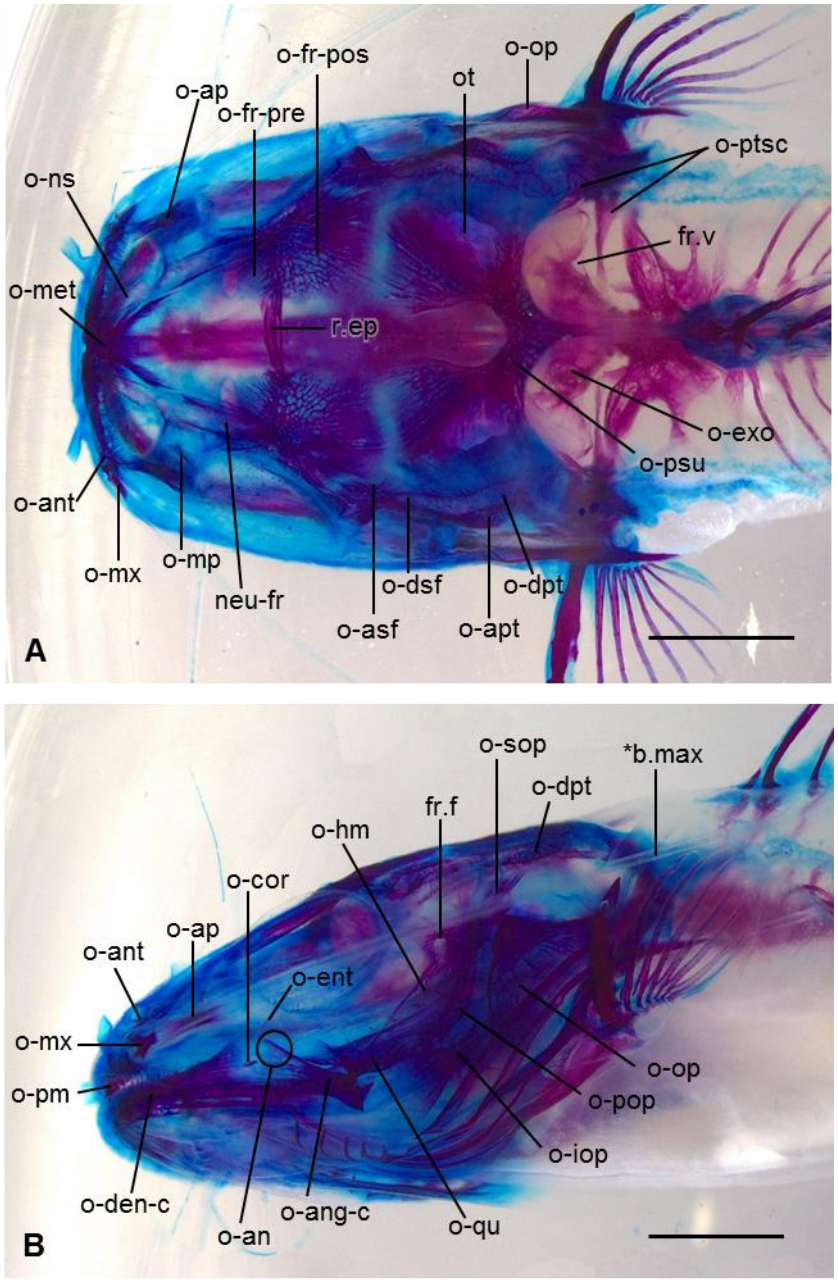


FIGURA 16. Etapa de desenvolvimento do sincrânio de exemplar de *Rhamdia quelen* com CT 25,09 mm - Estádio de osteocrânio tardio I: narinas e região orbital. Fotomicrografias de exemplar diafanizado e corado com Azul de Alcian e Vermelho de Alizarina. Vistas: (A) dorsal e (B) lateral. A coloração rosa indica tecido ósseo, e a coloração azul mais intensa indica cartilagens. **Símbolos:** *b.max:* barbilhão maxilar; *fr.f*: forâmen para o nervo facial; *fr.v*: foramen vago; *neu-fr*: componente neurodérmico dos ossos frontais; *o-ang-c*: complexo anguloarticulo-retroarticulo; *o-ant*: osso antorbital; *o-ap*: osso autopalatino; *o-apt*: osso autopterótico; *o-asf*: osso autoesfenótico; *o-cor*: osso coronóide; *o-den-c*: complexo dento-esplenio-mentomeckelian; *o-dpt:* osso dermopterótico; *o-dsf*: osso dermoesfenótico; *o-exo*: osso exoccipital; *o-fr-pos*: osso frontal pós-pineal; *o-fr-pre:* osso frontal pré-pineal; *o-hm*: osso hiomandibular; *o-iop*: osso interopercular; *o-met*: osso mesetmóide; *o-mp*: osso metapterigóide; *o-mx*: osso maxilar; *o-ns*: osso nasal; *o-op*: osso opercular; *o-pm*: osso pré-maxilar; *o-pop*: osso pré-opercular; *o-psu*: osso parieto-supraoccipital; *o-ptsc*: osso pos-temporo-supracleitron; *o-qu*: osso quadrado; *o-sop*: osso supraoccipital; *ot*: otólito; *r.ep*: ramo epifisial do osso frontal; * estrutura não pertencente ao esqueleto cefálico. Escala: 2 mm.

nova ossificação desta região, correspondente aos etmóides laterais. Estes aparecem cobrindo a região posterior das narinas e formando processos cujas

extremidades alcançam a curvatura da porção anterior da órbita ocular. Os ossos pteroesfenóides entram em contato com a margem anterior dos hiomandibulares, mas ainda não articulam com as asas laterais do paraesfenóide.

Ossos intramembranosos: As asas laterais do paraesfenóide se desenvolvem, crescendo de forma achatada, mas levemente curvada em direção dorsal, alcançando a região orbital. Com as asas laterais expandidas dessa forma, o osso paraesfenóide passa a assumir uma forma côncava voltada para o teto craniano. O osso pré-vomeral cresce em suas expansões laterais, em direção à base das narinas. Os entopterigóides crescem na região anterior da base ocular. A porção membranodérmica dos frontais se desenvolve e estes se tornam próximos do parieto-supraoccipital. As porções neurodérmicas dos frontais aproximam-se dos nasais anteriormente e conectam-se aos dermoesfenóticos posteriormente. Os ramos epifiseais dos frontais começam a formar interdigitações, iniciando a formação de uma sutura entre eles.

Região ótica e occipital: Os ossos proóticos e exoccipitais tornam-se bastante próximos na base das cápsulas óticas.

Ossos intramembranosos: Os ossos dermoesfenóticos e dermopteróticos estão ligados entre si, enquanto os dermopteróticos encontram-se muito próximos aos postemporo-supracleitron. Neste estádio, estes últimos começam a formar um processo em direção caudal correspondente ao ligamento transcapsular.

Viscerocrânio

Arco Mandibular: O osso quadrado desenvolve-se em relação ao estádio anterior, iniciando a formação de uma membrana óssea entre seus dois processos que vinham ossificando as margens do antigo processo pterigóide da cartilagem quadrada (ossificação pericondral). Essa membrana desenvolve-se na direção do osso metapterigóide, unindo esses processos. O complexo articulo-retroarticulo se desenvolve e fusiona-se ao osso dérmico angular formado no estádio anterior, bem como às porções do osso dérmico esplenial próximas, formando um novo complexo anguloarticulo-esplenial-retroarticulo. Agora a mandíbula caracteriza-se por dois complexos ósseos mistos, dento-esplenio-mentomeckelian, em sua porção anterior, recobrindo parcialmente a parte da cartilagem de Meckel que ainda persiste, e anguloarticulo-esplenio-retroarticulo em sua porção posterior, unidos na região

ventral do processo coronóide (cartilaginoso) sobre o qual se formou medialmente o osso sesamóide coronomeckeliano.

O restante do viscerocrânio sofre poucas alterações quando comparado ao estádio anterior, mas as cartilagens hipobranquiais 1 e 2 passam a corar como cartilagens apenas parcialmente e os ossos hipo-hiais dorsais aumentam.

4.3.12 Estádio de osteocrânio tardio II: Suturas da base e teto craniano - CT 29,93 - 45 dpe (Fig. 17)

Neste estádio a maioria das suturas e articulações entre os ossos da base e teto cranianos começam a ser estabelecidas, por isso as ossificações intramembranosas, endocrondrais e mistas são referidas juntas a partir de agora.

Neurocrânio

Região etmoidal e orbital: A porção supraetmóide do complexo mesetmóide alcança o osso frontal com um processo fino na direção deste último. Os ossos orbitoesfenóides começam a se formar, como duas ossificações coradas fracamente nos centros das margens mediais aos olhos. Essas ossificações ocorrem na região central das trabéculas *cranii*, sendo provavelmente endocondrais. Os nasais se desenvolvem um pouco mais, e neste estádio levantam laterais ósseas aos canais sensoriais que revestem. No entanto, não se ligam aos frontais. As laterais do osso pré-vomeral crescem e entre ela e o metapterigóide, mas no mesmo nível de ambas, aparece uma nova porção chata do osso etmóide lateral. Essa porção tem formato de um plano circular e em sua margem posterior está ligada a porção ventral do restante do osso etmóide lateral, que havia aparecido no estádio anterior. No entanto, os etmóides laterais ainda apresentam-se bem rudimentares. A porção dos frontais que recobre a ponte epifiseal começa a engrossar gradualmente a partir deste estádio, tornando-se mais robusta e reduzindo a fenestra pós-pineal. As porções distais das asas laterais do paraesfenóide começam a formar interdigitações com os ossos pteroesfenóides, iniciando a formação de uma sutura entre esses ossos.

Região ótica e occipital: As interdigitações para a formação de sutura entre os ossos frontais e parieto-supraoccipital começam a se formar. Os ossos esfenóticos e frontais encontram-se bem próximos, mas ainda não conectados. Os ossos esfenóticos e pteróticos encontram-se bem unidos neste estádio, tanto pela

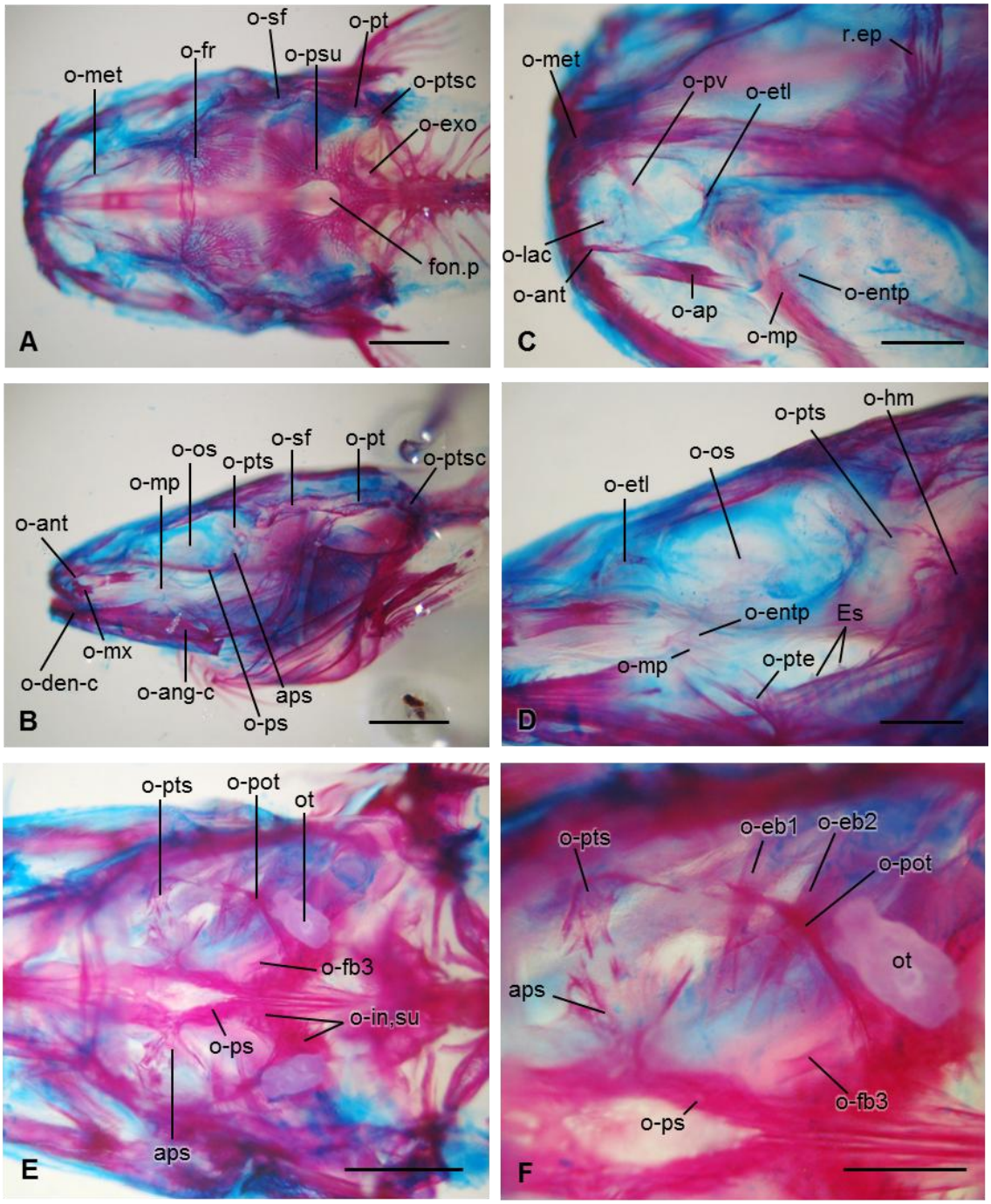


FIGURA 17. Etapa de desenvolvimento do sincrânio de exemplar de *Rhamdia quelen* com CT 29,93 mm - Estádio de osteocrânio tardio II: suturas da base e teto craniano (A a D) e detalhe da ossificação interna da região esfenoidal e ótica, por meio de exemplar com parte do teto craniano retirada (E e F) (CT 29,66 mm). Fotomicrografias de exemplares diafanizados e corados com Azul de Alcian e Vermelho de Alizarina. Vistas: (A, E e F) dorsal; (B) dorso-lateral; (C e D) lateral. A coloração rosa indica tecido ósseo, e a coloração azul mais intensa indica cartilagens. **Símbolos:** *aps:* asa do paraesfenóide; *Es*: espinhos (rastros branquiais); *fon-p:* fontanela posterior; *o-ang-c*: complexo angulosplênio-articulo-retroarticulo; *o-ant*: osso antorbital; *o-ap*: osso autopalatino; *o-den-c:* complexo dento-esplênio-mentomeckelian*; o-eb1,2:* osso epibranquial 1 e 2; *o-entp*: osso entopterigóide; *o-etl*: osso etmóide lateral; *o-exo*: osso exoccipital; *o-fb3*: osso faringobranquial 3; *o-fr*: osso frontal; *o-hm*: osso hiomandibular; *o-in*: ossos fariongoinferior;; *o-lac*: osso lacrimal; *o-met:* osso mesetmóide; *o-mp:* osso metapterigóide; *o-mx:* osso maxilar; *o-os*: orbitoesfenóide; *o-pot:* proótico; *o-ps*: osso paraesfenóide; *o-psu*: osso parieto-supraoccipital; *o-pt:* osso pterótico; *o-pte:* osso pterigóide; *o-pts*: pteroesfenóide; *o-ptsc*: pos-temporo-supracleitron; *o-pv*: osso prévomeral; *o-sf*: osso esfenótico; *o-su:* faringosuperior; *ot*: otólito; *r.ep:* ramo epifisial do osso frontal. Escala: 1 mm (A, C e E) e 0,5 mm (B, D e F).

continuidade de seus componentes neurodérmicos, como membranodérmicos. Os dermopteróticos estão completos e fusionam-se também aos postemporo-supracleitrons (porção postemporal). Os esfenóticos formam um processo fino ventral, direcionado ao processo dorsal dos proóticos. Estes ossos por sua vez encontram-se muito próximos aos exoccipitais, na região central da base das cápsulas óticas.

Viscerocrânio

Arco mandibular: O arco mandibular sofre poucas alterações quando comparado ao estádio anterior, apenas os ossos dérmicos coronomeckelianos alteram seu formato, apresentando um fino processo em direção dorsal.

Arcos Branquiais: Aparecem mais alguns espinhos (dentículos dos rastros branquiais) nos ossos ceratobranquiais, enquanto os raios branquiostegais IV e V (ossos dérmicos) tornam-se mais espessos neste estádio.

4.3.13 Estádio de osteocrânio tardio III: Fechamento do teto craniano – CT 44,56 mm – 50 dpe (Fig.18)

O crânio encontra-se bem desenvolvido e em estado avançado de ossificação, com a maioria das conexões entre seus ossos estabelecidas.

Neurocrânio

Região etmoidal e orbital: A porção supraetmóide do complexo mesetmóide cresce bastante na direção posterior, mantendo uma fenda larga em sua região central correspondente as margens anteriores da futura fontanela anterior. Os pré-maxilares são estruturas alongadas, próximas uma da outra rostralmente, porém não conectadas e bastante achatadas, repletas de dentes em sua face ventral. Os etmóides laterais estão bem desenvolvidos, sendo facilmente discerníveis agora. Eles possuem duas regiões planas ligadas, sendo uma delas horizontal, no nível dos frontais, com os quais começam a formar interdigitações suturais neste estádio, e outra relativamente inclinada, alcançando o nível entre o pré-vomeral e metapterigóide, mas sem formar sutura com nenhum deles até o momento. Com seu desenvolvimento os etmóides laterais tornam-se muito próximos da margem antero-dorsal da órbita ocular. Os ossos nasais estão bem formados ao redor do canal sensorial principal que sai do componente neurodérmico dos frontais, sem, contudo

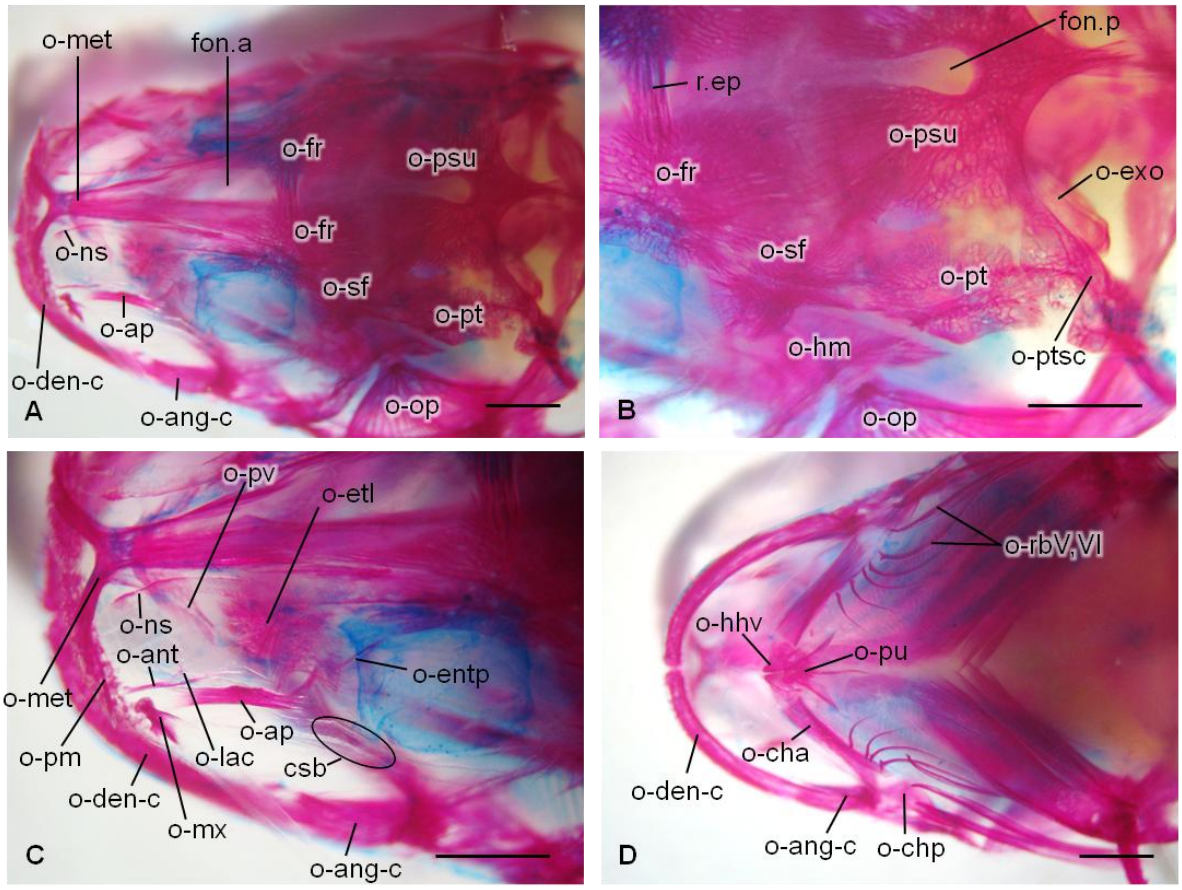


FIGURA 18. Etapa de desenvolvimento do sincrânio de exemplar de *Rhamdia quelen* com CT 44,56 mm - Estádio de osteocrânio tardio III: Fechamento do teto craniano. Fotomicrografias de exemplar diafanizado e corado com Azul de Alcian e Vermelho de Alizarina. Vistas: (A, B e C) dorsal e (D) ventral. A coloração rosa indica tecido ósseo, e a coloração azul mais intensa indica cartilagem ou resquícios destas. **Símbolos**: *csb:* canal sensorial suborbital; *fon.a*: fontanela anterior; *fon.p*: fontanela posterior; *o-ang-c:* complexo ângulo-esplênio-articulo-retroarticulo; *o-ant*: osso antorbital; *o-ap*: osso autopalatino; *o-chp*: osso cerato-hial posterior; *o-den-c:* complexo dento-esplênio-mentomeckelian; *o-entp*: osso entopterigóide; *o-etl*: osso etmóide lateral; *o-exo*: osso exoccipital; *o-fr*: osso frontal; *o-hhv*: osso hipo-hial ventral; *o-hm*: osso hiomandibular; *o-lac*: osso lacrimal; *o-met*: osso mesetmóide; *o-mx*: osso maxilar; *o-ns*: osso nasal; *o-op*: osso opercular; *o-pm*: osso pré-maxilar; *o-psu*: osso parieto-supraoccipital; *o-pt*: osso pterótico; *o-ptsc*: osso pos-temporo-supracleitron; *o-pu*: osso paruro-hial; *o-pv*: osso pré-vomeral; *o-rbV,VI*: raio branchiostegal V e VI; *o-sf*: osso esfenótico; *r.ep:* ramo epifisial do osso frontal. Escala: 1 mm.

ligar-se a eles. Os frontais desenvolvem um pouco mais em direção medial, reduzindo o espaço entre si. As suturas entre frontais e esfenóticos já estão formadas neste estádio, sem interdigitações. Uma porção postero-medial dos esfenóticos começa a formar interdigitações com o parieto-supraoccipital.

Região ótica e occipital: As suturas entre frontais e parieto-supraoccipital ainda estão sendo formadas. Os pteróticos crescem um pouco mais, mas ainda não chegam ao parieto-supraoccipital medialmente. A fontanela posterior começa a se definir no osso parieto-supraoccipital a medida que este osso cresce em tamanho e reduz o espaço central não ossificado. Neste começa a ser formada também uma aba ventral próximo a sua margem posterior. O ligamento transcapsular

desenvolvido ventro-posteriormente aos postemporo-supracleitrons continua se desenvolvendo e neste estádio começa a formar suturas simples com a aba ventral do parieto-supraoccipitial.

Viscerocrânio

Arco mandibular: Os metapterigóides e entopterigóides encontram-se um pouco mais desenvolvidos. Da mesma forma que o osso quadrado no estádio anterior, o metapterigóide começa a ossificar entre suas margens previamente ossificadas, em direção ao osso quadrado. Os complexos ósseos da mandíbula se unem cada vez mais, do sentido ventral para dorsal sobre o lado distal dos processos coronóides, enquanto os espleniais crescem, tornando-se muito próximos do nível dos retroarticulares.

Arco Hióide: Os ossos cerato-hiais anteriores e posteriores crescem, restando espaços cartilaginosos entre ambos e entre os anteriores e ossos hipo-hiais. Os ossos hipo-hiais ventrais e dorsais estão unidos por suas porções posteriores. Os hiomandibulares se desenvolvem e a conexão entre estes e os ossos quadrados começa a ossificar.

Arcos Branquiais: Os ossos hipobranquiais 1 e 2 continuam aparentemente do mesmo tamanho que no estádio anterior, ocupando apenas uma pequena região anterior dos hipobranquiais cartilaginosos. Já os espinhos dorsais (dentículos dos rastros branquiais) desenvolvidos nos ceratobranquiais 1, 2, 3 e 4 nos estádios anteriores agora estão maiores, sendo que quanto mais distal sua localização sobre o ceratobranquial, mais comprido o espinho.

4.3.14 Estádio de osteocrânio tardio IV: série infraorbital – CT 72,93 mm – Juvenil coletado em tanques externos de piscicultura com aproximadamente 1 mês de vida (Fig. 19)

Muitas estruturas parecem ter se desenvolvido por completo. A série de ossos infraorbitais começa a ossificar ao redor do ramo sensorial infraorbital apenas neste estádio.

Neurocrânio

Região naso-etimoidal: O mesetmóide desenvolveu-se por completo formando suturas com os ossos frontais. Os etmóides laterais terminam seu

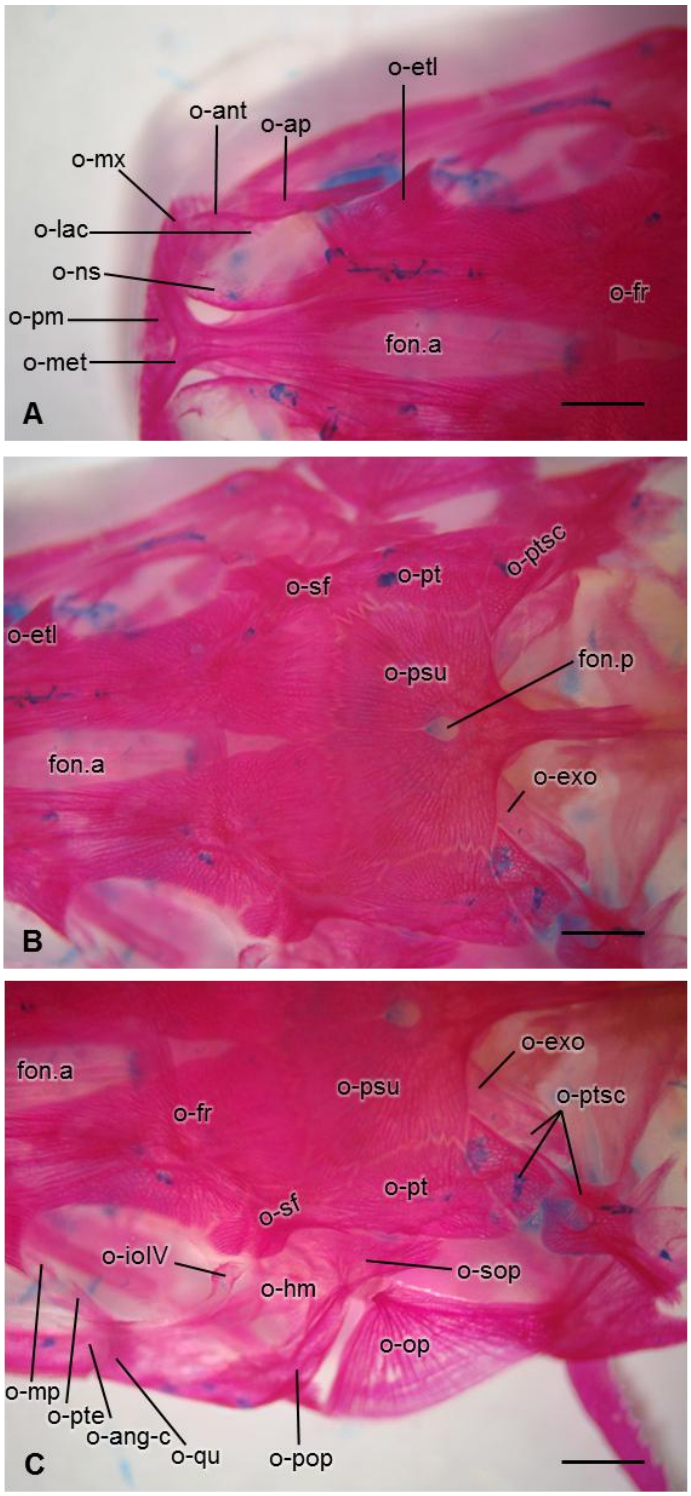


FIGURA 19. Etapa de desenvolvimento do sincrânio de exemplar de *Rhamdia quelen* com CT 72,93 mm - Estádio de osteocrânio tardio IV: série infraorbital. Exemplar diafanizado e corado com Azul de Alcian e Vermelho de Alizarina. Vistas dorsais. A coloração rosa indica ossificações, enquanto a coloração azul indica resquícios de cartilagens. No entanto, a cartilagem, por ser mais frágil, aparece fragmentada nesta etapa devido ao processo de diafanização. **Símbolos:** *fon.a*: fontanela anterior; *fon.p*: fontanela posterior; *o-ang-c*: complexo angulosplênio-articulo-retroarticulo; *o-ant*: osso antorbital; *o-ap*: osso autopalatino; *o-etl*: osso etmóide lateral; *o-exo*: osso exoccipital; *o-fr*: osso frontal; *o-hm:* osso hiomandibular; *o-ioIV*: túbulo infraorbital IV; *o-lac*: osso lacrimal; *o-met:* osso mesetmóide; *o-mp*; osso metapterigóide; *o-mx*: osso maxilar; *o-ns*: osso nasal; *o-op:* osso opercular; *o-pm:* osso pré-maxilar; *o-pop:* osso pré-opercular; *o-psu:* osso parieto-supraoccipital; *o-pt*: osso pterótico; *o-pte:* osso pterigóide; *o-ptsc*: osso postemporo-supracleitron; *o-qu*: osso quadrado; *o-sf*: osso esfenótico; *o-sop*: osso supraopercular. Escala: 1 mm.

desenvolvimento, ossificando a margem anterior da órbita ocular e formando suturas com ossos frontais em sua porção óssea mais dorsal e posterior, bem como com as asas laterais do osso pré-vomeral em sua porção mais ventral e anterior, e com o paraesfenóide em sua margem ventral medial. Além disso, esses ossos formam uma articulação com os metapterigóides em sua porção ventral posterior. As asas do osso pré-vomeral também se desenvolveram promovendo a sutura com os etmóides-laterais, no entanto este não desenvolve dentes em sua superfície.

Região orbital: Os ossos frontais crescem, formando suturas com diversos ossos do teto craniano e uma nova sutura entre si em suas porções posteriores, reduzindo a fontanela pós-pineal. Com o crescimento do mesetmóide e dos frontais, a fontanela anterior definiu-se quase completamente no que restou da fontanela pré-pineal que não foi coberta por osso. Os ossos orbitoesfenóides se desenvolvem em forma de chapas estreitas completando a base do neurocrânio entre o paraesfenóide e a orbita ocular e formando uma parede medial a cápsula óptica, na metade dorsal desta. Este osso ainda não está ligado ao pteroesfenóide, mas ambos estão muito próximos, dando continuidade à concavidade do paraesfenóide. Os ossos lacrimais crescem e aumentam seu grau de ossificação formando uma membrana óssea posterior aos canais sensoriais que estes ossos revestem. Os primeiros túbulos infraorbitais começam a se desenvolver conectados aos ossos lacrimais. Além dos primeiros túbulos infraorbitais os outros três pares de túbulos da série infraorbital começam a se desenvolver neste estádio por suas paredes mediais. O túbulo infraorbital IV é o mais ossificado dentre todos e localiza-se próximo a saída do ramo infraorbital do dermoesfenótico.

Região ótica e occipital: Os ossos do teto da região ótica e occipital estão completos neste estádio, bem como as suturas entre eles. A sutura entre os ossos frontais e parieto-supraoccipital está completamente formada, e a fontanela posterior, no centro deste último, torna-se bem reduzida. Os esfenóticos formaram interdigitações suturais com os frontais em suas porções mediais anteriores, com os pteróticos em suas margens posteriores e entre essas regiões, com o osso parieto-supraoccipital. Os pteróticos também formam suturas deste tipo com o osso parieto-supraoccipital, no entanto com os ossos postemporo-supracleitrons, formam suturas simples, sem interdigitações. Os processos transcapsulares dos postemporo-supracleitrons formam interdigitações nas laterais do processo ventral do parieto-

supraoccipital. Na sequência dos canais sensoriais cefálicos que atravessam os postemporo-supracleitrons, formam-se os ossículos da linha lateral.

Viscerocrânio

Arco mandibular: Os ossos metapterigóides e quadrados estão bem ossificados e muito próximos separados por uma pequena porção cartilaginosa. A mandíbula está quase completamente recoberta/substituída por osso. Os complexos dento-esplenio-mentomeckelian e anguloarticulo-esplenio-retroarticulo cobrem quase completamente o processo coronóide e a porção da cartilagem de Meckel não substituída por osso, sendo estes visíveis apenas sob vista medial. O osso coronomeckelian encaixa-se na altura da base do processo coronóide com o complexo anguloarticulo-retroarticulo.

Arco Hióide: A conexão óssea entre os ossos hiomandibulares e os quadrados torna-se bem ossificada. Os ossos hiomandibulares estão completos, conectados ao neurocrânio por uma aba ventral dos ossos esfenóticos. Isso representa a ossificação da articulação principal do viscerocrânio com o neurocrânio. Os cerato-hiais anteriores e posteriores crescem bastante, substituindo praticamente toda a antiga cartilagem cerato-hial, restando apenas duas pequenas regiões cartilaginosas, uma entre os cerato-hiais anteriores e posteriores e outra entre os anteriores e hipoiais.

Arcos Branquiais: Os ossos da série opercular estão completos. Até este estádio, os basibranquiais e faringobranquiais 4 não ossificam. As pequenas epibrânquias 5 e hipobrânquias 3, bem como a fusão de hipobrânquias 4-5 permanecem cartilaginosas.

5 DISCUSSÃO

O estudo ontogenético, de forma geral, consiste em comparações de diferentes níveis de desenvolvimento, a fim de definir quando e onde ocorrem as alterações que resultam na formação da estrutura em questão. Para estudar estes níveis, é necessário categorizá-los de acordo com um parâmetro comum. E para promover comparações do desenvolvimento em diferentes áreas de estudo ou entre espécies ou até mesmo em populações diferentes de uma mesma espécie seria ideal que os estudos ontogenéticos fossem descritos com base nos mesmos parâmetros. Infelizmente não existe um consenso quanto ao melhor parâmetro para definição dos estádios de desenvolvimento em vertebrados (ADRIAENS; VERRAES, 2002).

Para se definir este parâmetro é preciso analisar os responsáveis pelo controle do desenvolvimento, os quais podem ser tanto fatores genéticos quanto epigenéticos. Embora a genética de um organismo tenha um papel fundamental em sua formação, existem muitos estímulos que podem alterar ou até mesmo serem necessários para que uma estrutura se desenvolva. Os fatores epigenéticos podem consistir tanto de pressões ambientais externas, como temperatura ou, ainda, reação a locomoção de um organismo no desenvolvimento de seu sistema músculo-esquelético, quanto de pressões internas, relacionadas ao ambiente celular e à interação entre diferentes estruturas em desenvolvimento (HERRING, 1993).

Muito se discute a respeito do melhor parâmetro para o estudo ontogenético, o qual geralmente varia entre o tempo de vida (idade) e tamanho. O uso do tempo parece mais adequado para indivíduos desenvolvidos sob as mesmas condições ambientais, por ser este um parâmetro extrínseco ao organismo (BLACKSTONE, 1987). O tamanho poderia ser considerado inclusive um fator epigenético, pois altera o espaço entre as diferentes estruturas, que muitas vezes desenvolvem-se por competição espacial (HANKEN, 1983). Além disso, o tamanho pode resultar na alteração em si. Como exemplo, animais maiores, em certas situações, poderiam ter condições melhores de interação social e competição por alimento, o que também facilitaria o seu crescimento (OLSON, 1996).

Por outro lado, por ser extrínseco ao desenvolvimento do animal, não é possível definir uma relação entre o tempo cronológico e o “tempo biológico”, ou

seja, a etapa do desenvolvimento em que o organismo se encontra (ADRIAENS; VERRAES, 2002). Além disso, a maior parte dos organismos estudados dificilmente desenvolve-se sob as mesmas condições ambientais (BLACKSTONE, 1987), de modo que a utilização do parâmetro tempo é prejudicada. Tanto na natureza como em laboratório as condições ambientais divergem.

Segundo Strauss (1987) uma boa parte dos atributos anatômicos, fisiológicos ou comportamentais são relacionados de alguma forma ao tamanho do animal. Desta forma, o uso do parâmetro “tamanho” parece sobrepor o uso do “tempo”, pois está diretamente relacionado ao desenvolvimento (STRAUSS, 1987; ADRIAENS; VERRAES, 2002), no entanto, o grau de influência dos parâmetros tamanho e idade na ontogenia ainda não é bem estabelecido.

No presente estudo, o tamanho alcançado pelos indivíduos provenientes das três desovas mostrou-se significativamente diferente uns dos outros ao longo dos dias de incubação. As três incubações de embriões, larvas e pós-larvas de *R. quelen* foram similares com relação aos parâmetros de manutenção, como temperatura, pH, origem da água, sistema de filtragem e renovação, tipo e freqüência de alimento fornecido, bem como a origem dos ovos fertilizados que foram resultantes da mistura de gametas de vários adultos machos e fêmeas, havendo, portanto, diversidade genética. Ainda, pode-se incluir a esses parâmetros que a incubação, coleta e medição de todos os espécimes foram realizadas pelo mesmo pesquisador, reduzindo variações no processo de coleta de dados. A principal diferença entre as incubações foi com relação à luminosidade e densidade de estocagem, sendo que as larvas e pós-larvas da primeira incubação estavam expostas a maior claridade e confinadas num espaço menor que nas duas incubações seguintes.

Acredita-se que esses fatores afetaram o crescimento, pois a influência da luz no crescimento das larvas de *R. quelen* é comprovada, sendo seu desenvolvimento melhor quanto mais escuro o ambiente de incubação (BEHR *et al.*, 1999; PIAIA *et al.*, 1999). Ambientes escuros parecem reduzir também a agressividade entre larvas de *R. quelen*, reduzindo a taxa de mortalidade e variação do tamanho atingido pelos indivíduos (PIAIA *et al.*, 1999). Sabe-se que a densidade de estocagem também interfere no comportamento e taxa de sobrevivência das larvas de *R. quelen* (LUCHINI; RANCEL, 1981). Sendo assim uma diferença significativa entre os indivíduos coletados a partir da primeira incubação (expostos ao fotoperíodo natural) e os demais (incubados protegidos de luz direta e em ambiente mais escuros) era

esperada. Porém, houve diferenças significativas no tamanho das larvas e pós-larvas entre todas as incubações, incluindo as duas últimas, nas quais as mesmas condições de luminosidade e de estocagem foram empregadas. Além disto, a variação de tamanho e grau de desenvolvimento do esqueleto cefálico também foi observada entre indivíduos de mesma idade provenientes da mesma desova e incubação. Isto demonstra que o tamanho atingido pelas larvas/pós-larvas da mesma idade é bastante variável, sendo provavelmente dependente de outros fatores além daqueles controlados nos experimentos. Assim, a descrição com base no tempo de vida dos indivíduos é dificultada.

Embora variações no grau de desenvolvimento craniano também tenham sido encontradas em exemplares de mesmo comprimento, estas situações foram bem mais raras. A descrição de acordo com o comprimento total parece, portanto, mais prática e viável, tendo sido por isso escolhida como parâmetro para esta descrição, até por facilitar a comparação com outros estudos similares, os quais utilizam em sua maioria o comprimento dos indivíduos como parâmetro. No entanto, por terem sido observados casos em que comprimentos iguais resultaram em diferentes graus de desenvolvimento, não se pode garantir que todos os indivíduos daquele tamanho tenham aquelas características.

Propôs-se, então, uma divisão da descrição em estádios nominais baseados nas variações observadas ao longo dos diferentes comprimentos. Isto torna este trabalho comparável a outros trabalhos da área, os quais utilizam em sua maioria o comprimento total, ao mesmo tempo que situa o leitor quanto às principais alterações morfológicas alcançadas em cada etapa, enfatizando a ordem em que estas ocorrem ao invés do comprimento total.

Foram definidos quatorze estádios entre o período larval e juvenil, sendo os três primeiros estádios correspondentes à formação da maior parte do condrocrânio, enquanto os demais descrevem o gradual aumento de estruturas ósseas (osteocrânio).

Não foi definido nenhum estádio relativo às larvas recém eclodidas porque, dos nove indivíduos diafanizados e corados coletados no momento da eclosão, nenhum apresentou componentes do esqueleto cefálico em formação. Embora a forma geral da formação do condrocrânio seja considerada similar em diferentes teleósteos (KENT, 2001), o momento em que este inicia sua formação pode variar bastante. Em *Salmo fario* (Clupeiformes), por exemplo, as primeiras cartilagens

formadoras do neurocrânio podem aparecer até seis dias antes da eclosão (de BEER, 1937), enquanto que, de modo semelhante a *R. quelen* em *Sander lucioperca* (Perciformes), nenhum componente esquelético é visualizado quando as larvas eclodem (LÖFFLER *et al.*, 2008). Existem ainda outras espécies de siluriformes, como *Heterobranchus longifilis* (Clariidae) e *Chrysichthys auratus* (Claroteidae) em que também nenhum primórdio do condrocrânio foi registrado em larvas recém-eclodidas (VANDEWALLE *et al.*, 1997 e 1999). Mas, mesmo dentre os siluriformes, encontram-se espécies como *Corydoras aeneus* (Callichthyidae), em que, no momento da eclosão, as larvas apresentam um neurocrânio rudimentar articulado com alguns elementos do viscerocrânio (HUYSENTRUYT *et al.*, 2008) e *Galeichthys feliceps* (Ariidae), no qual as larvas já eclodem com o crânio ossificado (TILNEY; HECHT, 1993). Porém, quando o condrocrânio está presente em espécies de siluriformes no momento da eclosão, normalmente, apresentam um limitado grau de complexidade quando comparadas com outras espécies de teleósteos (HUYSENTRUYT *et al.*, 2008).

A simples comparação temporal do desenvolvimento em peixes é muito difícil, como já discutido anteriormente. No entanto, o momento da eclosão, independente do tempo necessário para que ocorra, é um momento crítico, pois em pouco tempo as larvas esgotarão seu estoque de vitelo e precisarão se alimentar de forma exógena. As reservas vitelínicas de *R. quelen* esgotam-se cerca de 96h após a fertilização a 24^{o}C (RODRIGUES-GALDINO *et al*., 2009). Entretanto, foi verificado que quanto maior a temperatura, mais rápido é o desenvolvimento do jundiá (FORGATI, 2008). De fato, no presente estudo, verificou-se que, quando incubados a 27^{o}C, as reservas vitelínicas do jundiá se esgotaram aproximadamente 3 dias após a eclosão (dados não apresentados). Dessa maneira, é esperado que ao menos o mínimo do aparato bucal necessário para a captura de alimento seja formado o mais rápido possível nas larvas recém-eclodidas (FAUSTINO; POWER, 2001). Isso poderia justificar o rápido desenvolvimento do condrocrânio em *R. quelen* durante a primeira semana pós-eclosão [entre 3,37 mm (1 dpe) e 6,51 mm (7dpe)]. Nesse curto período de transição da alimentação endógena para exógena, as larvas dobraram de tamanho (médias de CT de 3,70 mm a 7,45 mm) e o condrocrânio tornou-se praticamente completo, sofrendo poucas alterações maiores em seu formato nos estádios seguintes. Durante este período, também foi registrado o

rápido desenvolvimento de estruturas relacionadas à percepção do alimento no ambiente nesta espécie (ARAÚJO, 2011).

Assim como na maioria dos teleósteos, o início do desenvolvimento do viscerocrânio e neurocrânio foi simultâneo em *R. quelen* e o desenvolvimento de ambos ocorreu em sua maior parte de forma similar ao padrão encontrado em outros siluriformes. Seu crânio é largo e achatado dorso-ventralmente, condição esta condizente com seu hábito alimentar bentônico, pois facilita seu deslocamento de forrageio, reduzindo o atrito com a água (ADRIAENS; VERRAES, 1997b; GOMES *et al.*, 2000). Seus olhos são de tamanho reduzido, inclusive nas larvas (RODRIGUES-GALDINO *et al.*, 2009), o que, juntamente com o formato de seu crânio, acarreta num grande espaço interorbital. Essa característica justifica a grande fenestra hipofisial verificada em *R. quelen*, limitada lateralmente por trabéculas *cranii* bem separadas entre si em relação a outros teleósteos, o que é típico em siluriformes (ADRIAENS; VERRAES, 1997b). Isso resulta também em uma placa etmoidal bastante reduzida e uma lâmina pré-cerebral no lugar de um septo pré-cerebral como encontrado em grande parte dos teleósteos, uma vez que o encontro das comissuras esfeno-septais com as trabéculas *cranii* ocorre em pontos afastados formando posteriormente esta lâmina entre eles. A formação desta lâmina no lugar de um septo pré-cerebral é sugerido como um padrão para siluriformes (ADRIAENS; VERRAES, 1997b).

As trabéculas marginais do neurocrânio, normalmente aparecem como cartilagens isoladas em teleósteos, dorsais às trabéculas *cranii* e que se desenvolvem no sentido anterior e posterior (de BEER, 1937). No entanto, em *R. quelen*, essas cartilagens aparecem pela primeira vez claramente conectadas aos processos anteriores das cápsulas óticas, desenvolvendo-se então no sentido anterior nos estádios seguintes. Esse desenvolvimento foi verificado também em outros siluriformes, como *Clarias gariepinus* (Clariidae) (ADRIAENS; VERRAES, 1997a) e em *Corydoras aeneus* (Callichthyidae) (HUYSENTRUYT *et al.*, 2008), podendo ser este outro padrão no desenvolvimento dessas estruturas deste grupo.

A conexão entre as trabéculas *cranii* e marginais feita pela base pré-orbital, tem sua origem normalmente em um processo ventral das trabéculas marginais, que alcança as trabéculas *cranii* em região imediatamente posterior a lâmina orbito-nasal (de BEER, 1937). Em *R. quelen*, assim como verificado em *C. gariepinus* (ADRIAENS; VERRAES, 1997a) ocorre o caminho inverso. A base pré-orbital forma-

se por um processo dorsal nas trabéculas *cranii* que alcança as trabéculas marginais.

Uma particularidade no desenvolvimento da espécie *R. quelen* ocorre no início da formação do neurocrânio posterior, geralmente relacionado ao aparecimento das cartilagens paracordais lateralmente a extremidade anterior da notocorda para a maioria dos teleósteos (de BEER, 1937; KENT, 2001). Nesta espécie as primeiras cartilagens desta região e possivelmente do neurocrânio em si, são representadas pelas comissuras basicapsulares anteriores, que, embora sejam conectadas as porções anteriores das futuras cartilagens paracordais, coravam mais fortemente em suas porções distais, ou seja, porções localizadas sobre as cartilagens hiomandibulares. Isto indica que estas porções seriam as possuidoras de cartilagens mais bem formadas e provavelmente iniciaram seu desenvolvimento primeiro. Embora este padrão tenha ficado bem claro, uma análise embasada em coletas entre o momento da eclosão e o primeiro dia pós-eclosão poderia confirmar.

As cartilagens paracordais em *R. quelen* também não se unem contornando a extremidade anterior da notocorda em momento algum, diferente do que é verificado em outras espécies de siluriformes descritas, *C. gariepinus* (ADRIAENS; VERRAES, 1997a), que formam uma placa basal, embora geralmente reduzida, pela união anterior das cartilagens paracordais.

Por apresentarem olhos reduzidos como comentado anteriormente, os bagres de forma geral possuem outras estruturas sensoriais como sistema olfatório, botões gustativos e linha lateral bem desenvolvidos (BRITSKI *et al.*, 1999; ARAÚJO, 2011), bem como alguns pares de barbilhões sensoriais e boca geralmente ventral (FERRARIS, 2007). O viscerocrânio dos siluriformes possui adaptações relacionadas a esse desenvolvido do sistema sensorial. Observou-se em *R. quelen*, que a cartilagem palatina parece não fusionar-se em momento algum com a cartilagem pterigoide. Acredita-se que a primeira seja equivalente a uma porção rostral da segunda (de BEER, 1937; KURATANI; OTA, 2008) podendo não existir em muitos teleósteos, fusionar-se ao processo pterigóide da cartilagem quadrada em outros, ou ficar livre (de BEER, 1937), como observada neste estudo. Segundo Adriaens e Verraes (1997b), a descontinuidade desta cartilagem com o processo pterigóide é uma característica sinapomórfica dos siluriformes, podendo este ser o resultado de um novo arranjo que permite uma articulação com os barbilhões maxilares e maior liberdade de movimentação destes. Na espécie *R. quelen*,

portanto, a sustentação da maior parte da arcada superior (cartilagem palatina) é embasada, durante boa parte do desenvolvimento inicial do sincrânio, nas cartilagens trabeculares do neurocrânio. Isso é observado em muitas espécies de peixes e é um dos principais argumentos que defendem uma origem visceral para as trabéculas *cranii*, como componentes do arco branquial que deu origem ao mandibular (de BEER, 1937; DEPEW; SIMPSON, 2006; KURATANI; OTA, 2008).

A respeito dos arcos branquiais, o desenvolvimento de *R. quelen* apresenta outra particularidade. O desenvolvimento dos arcos branquiais nesta espécie ocorre do mais anterior para o posterior e sempre primeiramente com o aparecimento das cartilagens ceratobranquiais do arco em questão, como nas demais espécies de siluriformes descritas. Entretanto, nas outras espécies de siluriformes, o aparecimento das cartilagens ceratobranquiais é seguido da formação de cartilagens hipobranquiais, basibranquiais e só então (quando presentes) as epibranquiais e faringobranquiais (VANDEWALLE *et al.*,1997; ADRIAENS; VERRAES, 1997a). Em *R. quelen*, a ordem de formação dos componentes branquiais é um pouco diferente. As cartilagens ceratobranquiais, epibranquiais (com exceção da epibrânquia 5) e a copula surgem primeiramente, seguidas pela formação das hipobranquiais e faringobranquiais e por fim da epibrânquia 5. Talvez essa variação ocorra em decorrência da necessidade de formação dos segmentos que suportam as brânquias de fato (ceratobrânquias e epibrânquias) antes dos demais. Isso pode ser resultado do desenvolvimento do condrocrânio em *R. quelen* ser necessariamente rápido, uma vez que inicia-se tardialmente. Os componentes cartilaginosos do viscerocrânio mais importantes no processo de alimentação e respiração são os primeiros a serem formados.

Como citado acima, *R. quelen* desenvolve a cartilagem epibranquial 5, e embora seja bastante reduzida, também suporta brânquias. A cartilagem epibranquial 5 foi perdida em muitas espécies de teleósteos, podendo estar presente ou não em espécies da família Heptapteridae (BOCKMANN, 1998).

O reconhecimento de faringobrânquias em Siluriformes parece ainda não bem definido (BOCKMANN, 1998). Geralmente a faringobrânquia 1 é associada a uma estrutura óssea cilíndrica paralela e anterior a epibrânquia 1 (SILFVERGRIP, 1996; ADRIAENS; VERRAES, 1998; BOCKMANN, 1998). Essa posição da faringobrânquia 1, embora encarada por muitos como uma autapomorfia de Siluriformes, por outros é considerada uma evidência de sua natureza neomórfica,

possivelmente sem homologia com a faringobrânquia 1 dos demais teleósteos (BOCKMANN, 1998). Por ser descrita geralmente em indivíduos adultos, esta estrutura é apresentada simplesmente como óssea. Neste estudo a possível faringobrânquia 1 não se desenvolveu em espécimes de R. quelen com até 72,93 mm. Uma vez que o sincrânio sofre alterações ao longo de toda a vida do animal (HERRING, 1993), é possível que essa formação seja tardia, em indivíduos maiores. Por outro lado, caso desenvolva-se diretamente como osso, ou seja, através de ossificação intramembranosa, é possível que não equivalha de fato a uma faringobrânquia.

A faringobranquia 4 não corou em momento algum com Vermelho de Alizarina (marcação para ossos) e a partir do estádio de osteocrânio médio III: reforço de ossificação (CT 19,46 mm), deixou de corar também como cartilagem. Silfvergrip (1996), já havia relatado este fato na anatomia de *R. quelen* adulto, sugerindo que este seja um osso condróide (uma espécie de tecido intermediária entre cartilagem e osso).

Quanto às cartilagens basibranquiais, em *R.quelen*, embora a segunda e a terceira (pertencentes à copula anterior) tenham deixado de corar como cartilagens no estádio osteocrânio médio III (CT 19,46), até o fim da descrição aqui apresentada essas estruturas não coram como ossos. Silfvergrip (1996) descreve a presença de 4 basibrânquias para esta espécie, sendo a segunda e a terceira ossificadas, enquanto as demais permanecem cartilaginosas. É possível, então, que as basibrânquias 2 e 3 ossifiquem em momento posterior ao último estádio aqui descrito. No entanto, não se pode garantir que estes, bem como outros ossos de substituição não se formem antes de corar como ossos pela técnica utilizada nesse estudo. Quando uma estrutura deixa de corar como cartilagem, é possível que o osso já tenha se formado, mas sua mineralização ainda não começou. O processo de coloração dos ossos com Vermelho de Alizarina é totalmente dependente da existência de minerais no tecido, podendo por isso ocultar o momento exato de formação óssea.

A primeira ossificação observada em *R. quelen* por meio da técnica de coloração com Vermelho de Alizarina ocorreu no estádio de condrocrânio tardio (CT 5,96 mm) e corresponde aos ossos dérmicos opérculos. O estádio seguinte, osteocrânio inicial I (CT 6,66 mm), é marcado pelo aparecimento de ossos endocondrais e dérmicos, que suportam dentes (os quais também se desenvolvem

simultaneamente, porém inicialmente desconectados de tais ossos), além da formação do primeiro raio branquiostegal. Embora não suportem dentes na maioria das espécies de Siluriformes (ADRIAENS, VERRAES, 1998), inclusive em *R. quelen*, os maxilares estão relacionados com a sustentação dos barbilhões, muito importantes na detecção do alimento (ARAÚJO, 2011) e também são formados neste estádio (estádio de osteocrânio inicial I – CT 6,66 mm). Todas as primeiras ossificações observadas em *R. quelen* podem ser relacionadas, portanto, a proteção das brânquias ou a mecanismos de alimentação exógena, reforçando a importância evolutiva de estruturas relacionadas com as funções mais básicas de sobrevivência. Geralmente, esse é o padrão observado em teleósteos. Os primeiros ossos a serem formados são aqueles associados à alimentação e respiração (SCHULTZE, 1993; FAUSTINO; POWER, 2001).

Seguindo a formação dos principais ossos relacionados à alimentação e proteção das brânquias, observou-se a formação dos ossos da base do neurocrânio tanto ossos de substituição (estádio de osteocrânio inicial II – CT 7,60 mm), quanto ossos dérmicos (estádio de osteocrânio inicial III – CT 8,22 mm). É provável que a prioridade dessa formação esteja relacionada a proteção do encéfalo durante o transporte da presa na cavidade oral, uma vez que as principais estruturas relacionadas a captura de alimento já estão em formação.

Nos estádios seguintes observou-se em *R. quelen* o inicio da formação dos canais dérmicos que revestem os principais canais sensoriais do crânio-mandíbula, sendo o primeiro deles o canal sensorial mandibular (estádio de osteocrânio médio I) e logo em seguida o início dos canais que revestem o canal sensorial principal do crânio (estádio de osteocrânio médio II). Praticamente todos os ossos dérmicos que apresentam porções neurodérmicas (em formas de canal) e membranodérmicas (em forma de chapa) iniciaram seu desenvolvimento pelas porções neurodérmicas. Em *R. quelen*, assim como para a maioria dos bagres, os barbilhões e órgãos sensoriais são bastante desenvolvidos, e de suma importância na detecção do alimento, entre outras funções (ARAÚJO, 2011). Isso justifica a necessidade de proteção dos canais sensoriais em *R. quelen*, especialmente o canal sensorial mandibular. Somente após o início da formação dos principais canais dérmicos, os ossos dérmicos em forma de chapa começam a se formar, iniciando a cobertura, formação de suturas e o fechamento da base e teto craniano.

Contudo notou-se que apenas no último estádio de osteocrânio tardio (CT 72,93 mm), os canais sensoriais infraorbitais começam a ser revestidos com ossos dérmicos (túbulos infraorbitais), sendo estas as últimas estruturas formadas nesta descrição. Embora os canais sensoriais sejam de grande importância para a espécie aqui estudada (ARAÚJO, 2011), talvez a proteção dos olhos não seja tão essencial em bagres, como é nos demais teleósteos, uma vez que estes forrageiam próximo ao fundo, em águas turbulentas e com períodos de atividade geralmente noturnos, ou vespertinos, sendo mais importantes em Silurifomes outros órgãos sensoriais.

As descrições osteológicas, tanto relacionadas ao desenvolvimento, quanto em indivíduos adultos são complicadas, uma vez que seus componentes são identificados em geral topograficamente. Não existem evidências de um exocrânio comum a todos os gnatostomados e a nomenclatura utilizada para os ossos foi criada para tetrápodes, mais especificamente para humanos e posteriormente aplicada a peixes (SCHULTZE, 1993). A presença de um número muito maior de elementos dérmicos em peixes que em humanos torna a identificação de homologias ainda mais complexa.

Além disso, não existe um consenso quanto ao número de tipos de ossificação. Hall (2005) classifica a ossificação intramembranosa (não proveniente de precursores cartilaginosos) em três tipos: ossos de membrana (desenvolvem sem contato com ectoderme ou endoderme); ossos dérmicos (desenvolvem em contato com ectoderme ou endoderme) e ossos sub-dérmicos (neoformação que desenvolvem sem contato com ectoderme ou endoderme). Este último grupo inclui os ossos sesamóides (formados a partir de tendões). No presente estudo, uma vez que os precursores dos ossos intramembranosos não coram e, portanto, são dificilmente distinguíveis por meio da técnica utilizada, a classificação destes ossos foi baseada em literatura descritiva para teleósteos, preferencialmente para espécies de siluriformes (e.g. ADRIAENS; VERRAES, 1997a, 1997b e 1998; HUYSENTRUYT *et al.*, 2008) e descrições para o indivíduos adultos desta espécie (SILFVERGRIP, 1996; BOCKMANN, 1998). Por outro lado, a ossificação a partir de precursores cartilaginosos (endocondrais) pode ser facilmente observada.

O osteocrânio de *R. quelen* desenvolvido até o último estádio descrito neste estudo (osteocrânio tardio IV – CT 72,93 mm) compreende 131 ossos (contando ambos os lados), sendo 34 ossos dérmicos em forma de chapa, 28 canais dérmicos, 59 ossos endocondrais e 4 ossos sesamóides.

O osteocrânio de *R. quelen* apresentou poucas alterações quando comparado a outras espécies de Siluriformes, diferenciando-se em apenas dois pequenos detalhes. O osso dérmico paraesfenóide, se forma normalmente na região da fenestra hipofisial, sendo posteriormente aderido ao osso basioccipital (ADRIAENS; VERRAES, 1998). Em *R. quelen* esta ossificação parece desenvolver-se a partir do osso basioccipital, ou ao menos ligada a ele, desde o início de sua formação. Outra característica da formação do osteocrânio de *R. quelen* é o início da ossificação do canal sensorial mandibular. Geralmente esta ocorre ao redor de neuromastos distribuídos na porção mediana da mandíbula (porção recoberta por dentários) (ADRIAENS; VERRAES, 1998), enquanto que, na espécie aqui estudada, esta começa em posição frontal, ao redor de neuromastos localizados no nível dos ossos mentomeckelians.

De maneira geral, pode- se dizer que a formação do sincrânio de *R. quelen* é semelhante à observada em outros Siluriformes descritos, apresentando, porém pequenas alterações referentes ao primeiro par de cartilagens do neurocrânio posterior, ordem de formação dos componentes dos arcos branquiais, ossos da base do neurocrânio e ponto de início da ossificação do canal sensorial mandibular, podendo ser considerado um modelo para outras espécies da família Heptapteridae.

6 CONCLUSÕES

O desenvolvimento do esqueleto cefálico de *Rhamdia quelen* foi descrito em 14 estádios nominais distribuídos de acordo com o comprimento total dos indivíduos, uma vez que a variação significativa de tamanho dos indivíduos coletados em três diferentes períodos de incubação sob condições similares mostrou que o parâmetro idade (tempo cronológico) não é satisfatório para a definição do tempo biológico. O desenvolvimento do sincrânio de *R. quelen* apresenta algumas particularidades quando comparado às demais espécies da ordem Siluriformes, relacionadas a: ordem de formação dos elementos dos arcos branquiais; primeiro par cartilaginoso do neurocrânio posterior e local de início da formação dos ossos paraesfenóide e esplenial (canal sensorial mandibular). Na formação das demais estruturas do sincrânio, o desenvolvimento descrito neste trabalho pode ser considerado similar ao descrito para os demais Siluriformes, podendo ser utilizado como modelo para o desenvolvimento do crânio-mandíbula das espécies da família Heptapteridae, até então sem nenhuma descrição deste tipo. De forma geral, o condrocrânio torna-se quase completo muito rapidamente, quando comparado ao osteocrânio, enquanto o desenvolvimento deste último segue de forma gradual, culminando com a formação de 131 ossos, sendo formados primeiramente aqueles relacionados à alimentação e respiração, seguidos de ossos de proteção do encéfalo, proteção dos principais canais sensoriais e por fim fechamento do teto craniano.

REFERÊNCIAS

ADRIAENS, D.; VERRAES, W. The ontogeny of the chondrocranium in *Clarias gariepinus*: trends in siluroids. **Journal of Fish Biology**, 50: 1221-1257,1997a.

ADRIANES, D.; VERRAES, W. Some consequences of transformations in Siluriform chondrocrania: A case study of *Clarias gariepinus* (BURCHELL, 1822) (Siluriformes: Clariidae). **Netherlands Journal of Zoology**, 47 (4): 349-363, 1997b.

ADRIANES, D.; VERRAES, W. Ontogeny of the Osteocranium in the African Catfish, *Clarias gariepinus* Burchell (1822) (Siluriformes: Clariidae): Ossification Sequence as a Response to Functional Demans. **Journal of Morphology**, 235: 183-237, 1998.

ADRIANES, D.; VERRAES, W. An Empirical Approach to Study the Relation between Ontongeny, Size and Age Using Geometric Morphometrics. In: AERTS, P.; D'AOÛT, K.; HERREL, A. & VAN DAMME, R. (Eds.). **Topics in Functional and Ecological Vertebrate Morphology**. Maastricht : Shaker Publising. 293-324, 2002.

ARAÚJO, A. **Desenvolvimento do sistema Sensorial do Jundiá Rhamdia quelen (Siluriformes,Heptapteridae)**. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

BALDISSEROTTO, B.; RANDÜNZ-NETO, J. **Criação de Jundiá**. Santa Maria: UFSM, 232p, 2004.

BEHR, E. R.; RADÜNZ-NETO, J.; TRONCO, A. P.; FONTANA, A. P. Influência de diferentes níveis de luminosidade sobre o desempenho de larvas de Jundiá (*Rhamdia quelen*) (Quoy e Gaimard, 1824) (Pisces: pimelodidae). **Acta Scientiarum** 21(2): 325-330, 1999.

BLACKSTONE, N. W. Size and time. **Systematic Zoology,** 36(2): 211-215, 1987.

BOCKMANN, F. L. **Análise Filogenética da Família Heptapteridae (teleostei, Ostariophysi, Siluriformes) e Redefinição de seus Gêneros**. Tese – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. São Paulo, 1998.

BONE, Q.; MARSHALL, N.B.; BLAXTER, J.H.S. **Biology of Fishes**. London: Chapman & Hall. 2ª. Ed. 332p, 1995.

BRITSKI, H. A.; SILIMON, K. Z. de S.; LOPES, B. S. **Peixes do Pantanal. Manual de Identificação**. Brasília: Embrapa-SPI; Corumbá: Embrapa-CPAP, 184p, 1999.

CARROLL, S.B. **Infinitas formas de grande beleza**. Rio de Janeiro: Jorge Zahar Ed. Ltda. 303p, 2006.

CHAI, Y; MAXSON, R. E. Recent Advances in Craniofacial Morphogenesis. **Developmental Dynamics**, 235: 2353-2375, 2006.

CUSSAC, V. E.; MAGGESE, M. C. Ontogeny of the Maxillary Barbels and Palatine-Maxillary Mechanism in the Catfish *Rhamdia sapo* (Pisces, Pimelodidae). **Revista Brasileira de Biologia**, 48 (2): 195-201, 1988.

de BEER, G. R. **The Development of the Vertebrate Skull**. Oxford: Claredon Press. 552p, 1937.

DEPEW, M. J.; OLSON, L. Symposium on the Evolution and Development of the Vertebrate Head. **Journal of Experimental Zoology** (MOL DEV EVOL) 310B: 287-293, 2008.

DEPEW, M. J.; SIMPSON, C. A. 21st Century Neontology and the Comparative Development of the Vertebrate Skull. **Developmental Dynamics,** 235: 1256-1291, 2006.

DINGERKUS, G.; UHLER, L. D. Enzyme clearing of Alcian Blue stained whole small vertebrates for demonstration of cartilage. ***Stain Technology***, 52 (4): 229-232, 1977.

FAUSTINO, M.; POWER, D. M. Oesteologic development of the viscerocranial skeleton in sea bream: alternative ossification strategies in teleost fish. **Journal of Fish Biology**, 58: 537-572, 2001.

FERRARIS, C. J. JR. **Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types**. Auckland: Magnolia Press. 628p, 2007.

FINK, S.V.; FINK, W.L. Interrelationships of the ostariophysan fishes (Teleostei). **Zoological Journal of the Linnean Society,** 72**:** 297–353, 1981.

FORGATI, M. **Crescimento e tempo de desenvolvimento embrionário do jundiá (*Rhamdia quelen*) incubados em diferentes temperaturas.** Monografia de conclusão de curso (graduação em Ciências Biológicas) - setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

GILBERT, S. F. **Biologia do Desenvolvimento**. 8ª. Ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 817 p, 2006.

GOMES, L. C.; GOLOMBIESKI, J. I.; GOMES, A. G. C.; BALDISSEROTTO, B. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). **Ciência Rural**, 30 (1): 179-185, 2000.

GREGORY, W. K. **Fish Skulls: A Study of the Evolution of Natural Mechanisms**. Laurel: Eric Lundeberg. 481p, 1959.

GREGORY, W. K. **Our face from fish to man**. New York: Capricorn Books. 295 p, 1965.

HALL, B. K. **Bones and Cartilages: Developmental and Evolutionary Skeletal Biology**. London: Elsevier Academic Press. 787 p, 2005.

HANKEN, J. Miniaturization and its Effects on Cranial Morphology in Plethodontid Salamanders, Genus *Thorius* (Amphibia, Plethodontidae): II. The Fate of the Brain and Sense Organs and Their Role in Skull Morphogenesis and Evolution. **JOURNAL OF MORPHOLOGY**, 177: 255-268, 1983.

HANKEN, J.; HALL, B. K. (Eds). **The Skull, v. 1: Development**. Chicago:The University of Chicago Press. 587p, 1993.

HANNEMAN, E.; TREVARROW, B.; METCALFE, W. K.; KIMMEL, C. B.; WESTERFIELD, M. Segmental pattern of development of the hindbrain and spinal cord of the zebrafish embryo. **Development**, 103: 49-58, 1988.

HERRING, S. W. Epigenetic and Functional Influences on Skull Growth. In: HANKEN, J.; HALL, B. K. (eds). **The Skull, volume 1: Development.** Chicago: The Univesity of Chicago Press. 153-206, 1993.

HILDEBRAND, M. **Análise da Estrutura dos Vertebrados**. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo LTDA. 3ª. Edição. 700 p, 1995.

HUYSENTRUYT, F.; BRUNAIN, M. ADRIAENS, D. Ontogeny of the Chondrocranium in *Corydoras aeneus* (Gill, 1858) (Callichthyidae, Siluriformes). **Journal of Morphology**, 269: 522-532, 2008.

KENT, G. C. **Comparative anatomy of the vertebrates**. New York: McGraw-Hill Companies, 9ª.Ed. 524p, 2001.

KURATANI, S. Evolution of the vertebrate jaw: comparative embryology and molecular developmental biology reveal the factors behind evolutionary novelty. **Journal of Anatomy**, 205: 335-347, 2004.

KURATANI, S.; OTA, K. Primitive versus derived traits in the developmental program of the vertebrate head: Views from Cyclostome developmental studies. **Journal of Experimental Zoology (Mol Dev Evol)**, 308 B: 294-314, 2008.

LANGILLE, R. M.; HALL, B. K. Pattern Formation and the Neural Crest. In: HANKEN, J.; HALL, B. K. (eds). **The Skull, volume 1: Development.** Chicago: The Univesity of Chicago Press. 77-111, 1993.

Le DOUARINO; N. M.; KALCHEIM, C. **The Neural Crest**. 2ª. Ed. United Kingdom: Cambridge University Press. 445 p, 1999.

LERMEN, C. L.; LAPPE, R.; CRESTANI, M.; VIEIRA, V. P.; GIODA, C. R.; SCHETINGER, M. R. C.; BALDISSEROTTO, B. MORAES, G.; MORSCH, V. M. **Aquaculture,** 239: 497-507, 2004.

LÖFFLER, J.; OTT, A.; AHNELT, H.; KECKEIS, H. Early development of the skull of *Sander lucioperca* (L.) (Teleostei: Percidar) relating to growth and mortality. **Journal of Fish Biology**, 72: 233-258, 2008.

LOPES, J.M.; SILVA, L.V.F. BALDISSEROTTO, B. Survival and growth of silver catfish larvae exposed to diferente water pH. **Aquaculture International**, 9: 73-80, 2001.

LUCHINI, L.; RANCEL, C. C. Reproduccion inducida y desarrollo larval del “bagre negro”, *Rhamdia sapo*. **Rev. Asoc. Cienc. Nat. Litoral**, 12: 1-7, 1981.

NORTHCUTT, R.G. Development of the lateral line system in the channel catfish. **The Big Fish Bang**. Proceedings of the 26th Annual Larval Fish Conference, 137-159, 2003.

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

OLSON, M. H. Ontogenetic Niche Shifts in Largemouth Bass: Variability and Consequences for First-Year Growth. **Ecology**, 77(1): 179-190, 1996.

ORTOLANI-MACHADO, C. F.; RIOS, F. S. A.; FREITAS, P. F.; OKADA, M. A. RODRIGUES-GALDINO, A. M.; MAIOLINO, C. V.; TAMADA, M. H. Métodos para a manipulação e o preparo de embriões e larvas. In: OLIVEIRA-RIBEIRO, C. O.; REIS-FILHO, H. S.; GROTZER, S. R. (Org.). **Técnicas e Métodos para Utilização Prática de Microscopia**. 1ª. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, v.1, p. 233-293, 2011.

PERDICES, A.; BERMINGHAM, E.; MONTILLA, A.; DOADRIO, I. Evolutionary history of the genus *Rhamdia* (Teleostei: Pimelodidae) in Central America. **Molecular Phylogenetics and Evoltuion** 25: 172-189, 2002.

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**, 66 (4): 1057-1063, 2006.

PIAIA, R.; TOWSEND, C. R.; BALDISSEROTTO, B. Growth and survival of fingerlings of silver catfish exposed to different photoperiods. **Aquaculture International**, 7: 201-205, 1999.

RODRIGUES-GALDINO, A. M.; MAIOLINO, C. V.; FORGATI, M.; DONATTI, L. MIKOS, J. D.; CARNEIRO, P.C.F.; RIOS, F. S. Development of the neotropical catfish *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) incubated in different temperature regimes. **Zygote**, 18 (May):131-144*,* 2009.

ROMER, A. S.; PARSONS, T. S. **Anatomia comparada dos vertebrados.** São Paulo: Atheneu, 559p, 1985.

SCHULTZE, H. P. Patterns of Diversity in the Skulls of Jawed Fishes. **In**: HANKEN, J.; HALL, B. K. (eds). **The Skull, volumen 2: Patterns of Structural and Systematic Diversity**. Chicago: The University of Chicago Press. 189-254, 1993.

SCHULZ, U. H.; LEUCHTENBERGER, C. Activity Patterns of South American Silver Catfish (*Rhamdia quelen*). **Brazilian Journal of Biology**, 66 (2A): 565-574, 2006.

SILFVERGRIP, A. M. C. **A systematic review of the neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae).** Stockholm: Swedish Museum of Natural History. 156 p, 1996.

STRAUSS, R. E. On allometry and Relative Growth in Evolutionary Studies. **Systematic Zoology**, 36(1):72-75, 1987.

SZABO-ROGERS, H. L.; SMITHERS, L. E.; YAKOB, W.; LIU, K. J. New directions in craniofacial morphogenesis. **Developmental Biology**, 341: 84-94, 2010.

TILNEY, R. L.; HECHT, T. Early ontogeny of *Galeichthys feliceps* from the south east coast of South Africa. **Journal of Fish Biology**, 43(2): 183-212, 1993.

TORREY, T. **Morfologénesis de los vertebrados**. Mexico, D.F.: Limusa, 576p, 1978.

VANDEWALLE, P.; GLUCKMANN, I.; BARAST, E.; HURIAUX, F.; FOCANT, B. Postembryonic development of the cephalic region in *Heterobranchus longifilis*. **Journal of Fish Biology**, 50(2): 227-253, 1997.

VANDEWALLE, P.; CHIKOU, A.; LALÈYÉ, P.; PARMENTIER, E.; HURIAUX, F.; FOCANT, B. Early development of the chondrocranium in *Chrysichthys auratus*. **Journal of Fish Biology**, 55(4): 795-808, 1999.

WASSERSUG, R. J. A procedure for differential staining of cartilage and bone in whole formalin-fixed vertebrates. **Stain Tecnology**, 51 (2): 131-134, 1976.

ANEXO

Certificado de aprovação no Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPR.

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