

DIEGO JUNQUEIRA STEVANATO

**ONTOGENIA LARVAL E PÓS-LARVAL DE *Astyanax altiparanae*
(Garutti & Britski, 2000) EM LABORATÓRIO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal do Paraná, como requisito a obtenção do título de Mestre em Zootecnia. Orientador: Prof. Dr. Antonio Ostrensky.

CURITIBA

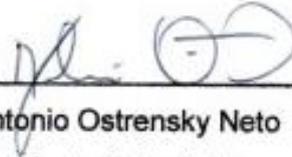
2016

DIEGO JUNQUEIRA STEVANATO

ONTOGENIA LARVAL E PÓS-LARVAL DE *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000) EM LABORATÓRIO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre com a Comissão formada pelos professores:

Banca Examinadora:



Dr. Antonio Ostrensky Neto
Presidente/Orientador



Dr. Carlos Eduardo Belz
Membro



Dr. Fabiano Bendhack
Membro

FEVEREIRO DE 2016

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antonio Ostrensky pela orientação, confiança e amizade. É uma satisfação realizar um trabalho ao lado de um pessoa incrível e que te proporciona todos os dias aquilo que todos os pesquisadores deveriam possuir, curiosidade. E sem curiosidade, não há pesquisa.

Aos caros colegas, integrantes e agregados do Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais – GIA.

Aos meus pais, Ricardo e Regina e minha irmã Náira, pelos incentivos e conselhos inestimáveis dados de forma a contribuir à minha formação pessoal e profissional.

A minha mulher Simona, com quem compartilho a alguns anos todos os momentos bons e ruins e que, apesar de tudo, sempre me apoiou e me ajudou na realização deste trabalho.

APRESENTAÇÃO

O trabalho denominado “Ontogenia larval e pós-larval de *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000) em laboratório” aborda o acompanhamento e a descrição dos processos ontogenéticos de larvas e de pós-larvas do lambari-do-rabo-amarelo, bem como os efeitos da temperatura nesse processo.

Este trabalho está inserido em uma linha de pesquisa do Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais, GIA, que visa investigar o potencial da espécie para ser usada como modelo em ensaios laboratoriais destinados a avaliar os efeitos dos mais diferentes agentes estressores e xenobiótico sobre os padrões e processos biológicos que podem afetar a sobrevivência, o desenvolvimento e a ecologia de peixes de água doce, bem como o equilíbrio dos próprios ecossistemas aquáticos continentais.

O trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (protocolo número 076/2015).

A dissertação é constituída por dois capítulos, um apêndice e dois anexos. O Capítulo 1 é intitulado “Efeitos da temperatura sobre o desenvolvimento ontogenético larval e pós-larval de *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes)” e visa a determinação da temperatura mais adequada para a incubação dos ovos e para o cultivo larval e pós larval da espécie. Uma vez definida a temperatura mais adequada, no Capítulo 2, intitulado, “Desenvolvimento ontogenético larval e pós-larval de *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000), em condições laboratoriais”, faz-se a descrição dos processos ontogenéticos dos organismos em condições de temperatura consideradas as mais adequadas. Além disso, em ambos os capítulos, são avaliados parâmetros merísticos e morfológicos das larvas e pós-larvas, enfatizando a cronologia decorrida na indução hormonal, incubação dos ovos, eclosão e no período ontogenético inicial pós-eclosão. O apêndice I abrange aspectos relativos ao lambari *A. altiparanae*, suas características específicas e tem como objetivo a divulgação científica do tema em questão. O anexo I, retrata ilustrações obtidas durante o desenvolvimento inicial da espécie em estudo e, o anexo II, as ilustrações registradas para os animais com malformações.

RESUMO

O lambari *Astyanax altiparanae* Garutti e Britski (2000) vem ganhando a atenção de pesquisadores, pois apresentam características biológicas consideradas ideais para sua utilização como espécie modelo em ensaios laboratoriais. Neste trabalho, o desenvolvimento inicial da espécie foi acompanhado sob três diferentes temperaturas, 20, 25 e 30°C. O monitoramento foi realizado desde o exato momento da eclosão das larvas, de modo a se caracterizar os efeitos dessas temperaturas no desenvolvimento e na sobrevivência larval e pós-larval. Foram acompanhadas individualmente, 48 larvas para cada temperatura testada. Essas, por sua vez, foram obtidas por métodos de reprodução artificial, aplicados já nas respectivas temperaturas testadas. Reprodutores foram selecionados com base nas características de maturação sexual, como ventre abaulado e poro urogenital avermelhado para as fêmeas, e textura áspera (presença de espículas) na nadadeira anal dos machos. Após a indução hormonal, os reprodutores foram inseridos em um tanque rede instalado dentro de um aquário, onde, foram monitoradas as horas-grau decorridas desde a indução até a liberação dos ovos. Os ovos fertilizados então foram retirados aleatoriamente do sistema e transferidos individualmente para placas de cultivo celular, posteriormente alojadas em estufas verticais, com temperatura controlada para cada tratamento. O acompanhamento ontogenético foi registrado em horas pós-eclosão (hpe) e dias pós-eclosão (dpe). A fase larval e pós-larval foi dividida em quatro estágios (I - Larval-vitelino, II – Pré-flexão, III – Flexão da Notocorda, IV – Pós-flexão). Foram mensurados diariamente o comprimento total (CT), altura do corpo (HC1), comprimento da cabeça (CC), altura da cabeça (HC2), diâmetro dos olhos (DO), comprimento do saco vitelínico (CV), altura do saco vitelínico (HV) e volume da reserva vitelínica (V). Como resultado, observou-se grande variação na ocorrência dos eventos de ontogenia em função da temperatura. Quanto maior a temperatura, mais rápidos os processos de desenvolvimento, porém, maiores foram as taxas de crescimento alométrico. Nenhum dos indivíduos cultivados a 20°C e 30°C completaram o desenvolvimento pós-larval, sobrevivendo apenas até o estágio de pré-flexão (20°C) e de flexão da notocorda (30°C). Apenas na temperatura de 25°C foi possível obter sobreviventes até o estágio de pós-flexão da notocorda, indicando ser essa a temperatura mais indicada para a utilização do *A. altiparanae* em estudos laboratoriais. Durante o período de ontogenia diversas metamorfoses foram observadas. O primeiro estágio de ontogenia (larval vitelino) de *A. altiparanae* em temperatura de 25°C estendeu-se durante as primeiras 26 horas pós-eclosão (hpe) e durante este período observou-se a pigmentação dos olhos, o surgimento do tubo digestório, abertura anal e os animais passaram a apresentar movimentação constante. Com o inflamento da bexiga natatória tem início o estágio de pré-flexão, que se estendeu por até 230 hpe. Durante este estágio, foi observada a transição entre a alimentação endógena e a exógena, sendo a reserva vitelínica totalmente absorvida após 74 hpe (com os animais atingindo $4,17 \pm 0,36$ mm de CT). Após esse período, teve início o estágio de flexão da notocorda e da estruturação da nadadeira caudal, ocorrida entre o 11º e 13º dpe. O último estágio de desenvolvimento larval (pós-flexão), foi observada a segmentação completa dos raios das nadadeiras e o início do aparecimento das escamas (animais com $5,97 \pm 0,65$ de CT). O desenvolvimento ontogenético larval de *A. altiparanae* foi concluído após 22 dpe.

Palavras chave: espécie modelo, flexão da notocorda, lambari, ontogenia

ABSTRACT

The tetra *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski (2000) has gained the attention of researchers, since they have biological characteristics considered ideal for its use as a model species in laboratory tests. In this work, the initial development of the species was accompanied under three different temperatures, 20, 25 and 30°C. The monitoring was carried out from the moment of hatching larvae in order to characterize the effects of temperature on development and larval survival and post-larval. They were individually monitored, 48 larvae for each tested temperature. These, in turn, were obtained by artificial breeding methods already applied in the respective temperatures tested. Players were selected based on the sexual maturation of features like bulging belly and pore reddish urogenital for females, and rough texture (presence of spikes) on the anal fin of males. After induction, the players were entered into a network tank installed inside an aquarium, where the time-elapsed degree from induction to the release of eggs were monitored. The fertilized eggs were then removed from the system at random and individually transferred to cell culture plates subsequently housed in vertical ovens with temperature control for each treatment. The ontogenetic monitoring was recorded in post-hatching hours (hpe) and post-hatching day (dpe). The larval and post-larval was divided into four stages (I - Larval-yolk II - Pre-bending, III - bending of the notochord, IV - Post-bending). daily were measured the total length (TL), body height (HC1), head length (CC), head height (HC2), hole diameter (OD), length of the yolk sac (CV), the yolk sac height (HV) and yolk reserve volume (V). As a result, there was great variation in the occurrence of events ontogeny as a function of temperature. The higher the temperature, the faster the development processes, however, were larger allometric growth rates. None of the individuals grown at 20°C and 30°C completed the post-larval development, surviving only to the pre-bending stage (20°C) and bending of the notochord (30°C). Only the temperature of 25°C was possible to get survivors to post-bending stage of the notochord, indicating that this is the temperature most suitable for the use of *A. altiparanae* in laboratory studies. During ontogeny period several metamorphoses were observed. The first stage of ontogeny (yolk sac larvae) *A. altiparanae* at 25°C is reached during the first 26 hours after hatching (hpe) and during this period was observed pigmentation of the eyes, the appearance of the digestive tract opening anal and animals began to show steady drive. With inflating the swim bladder starts the pre-bending stage, which lasted until 230 hpe. During this stage, the transition between endogenous and exogenous power was observed, the yolk reserve being completely absorbed after 74 hpe (with animals reaching 4.17 ± 0.36 mm CT). After that period, began the bending stage of the notochord and the structure of the caudal fin, which took place between 11 and 13 dpe. The last larval stage of development (after bending) was observed complete segmentation of the fin rays and early onset of scales (animals 5.97 ± 0.65 TC). The larval ontogeny of *A. altiparanae* was completed after 22 dpe.

Keywords: bending of the notochord, model species, ontogeny, tetra

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1.1 – Agrupamento das variáveis morfométricas mensuradas durante o acompanhamento do desenvolvimento ontogenético inicial em laboratório de *Astyanax altiparanae* em diferentes temperaturas. 9
- Figura 1.2 – Evolução temporal do volume médio de vitelo (mm³) de *Astyanax altiparanae* em diferentes temperaturas. 10
- Figura 1.3 – Comprimento total (mm) médio dos exemplares de *Astyanax altiparanae* mantidos em diferentes temperaturas. As setas indicam o momento em que ocorreu o consumo total da reserva vitelínica. 11
- Figura 1.4 – Evolução temporal da relação altura do corpo/comprimento total de larvas e pós-larvas de *Astyanax altiparanae* em diferentes temperaturas. Os números indicam o estágio de desenvolvimento (1- Larval -vitelino; 2- Pré-flexão; 3- Flexão da notocorda; 4- Pós-flexão). 12
- Figura 1.5 – Porcentagem de exemplares de *Astyanax altiparanae* com edemas e malformações, observados durante o desenvolvimento ontogenético inicial em diferentes temperaturas. 13
- Figura 1.6 – Curva de sobrevivência dos exemplares de *Astyanax altiparanae*, avaliada desde o momento da eclosão até o término do período ontogenético inicial em três diferentes temperaturas, com destaque para os dois eventos mais críticos (denominados de transição alimentar e flexão da notocorda) na sobrevivência. 15

Capítulo 2

- Figura 2.1- Desenvolvimento de *Astyanax altiparanae* durante o período larval vitelínico: Larva recém eclodida (1), apresentando glândula adesiva (a), olhos com pouca pigmentação (b), vesícula óptica (c) e sem abertura anal (d); (2) maior pigmentação dos olhos (e), maior pigmentação da reserva vitelínica (f) e botão da nadadeira peitoral (g); (3) boca na posição ventral (h), maior desenvolvimento da vesícula óptica (i) e pigmentação do coração (j); (4) olhos pigmentados (k) e bexiga natatória (L). 35
- Figura 2.2 – Exemplares de *Astyanax altiparanae* no estágio final do desenvolvimento ontogenético larval: (1) presença de alimento dentro do

tubo digestório (a); (2) dentes (b); (3) pigmentação puntiforme na região dorsal da cabeça (c); (4) escamas (d).....	40
Figura 2.3 – Curva de sobrevivência dos exemplares do <i>Astyanax altiparanae</i> durante o desenvolvimento ontogenético inicial, avaliada do momento da eclosão ao término do período inicial de desenvolvimento. As setas indicam os períodos mais críticos de sobrevivência larval.	42

Anexo I

Figura 3.1 – Micrópila de um ovo recém liberado de uma fêmea de <i>Astyanax altiparanae</i> durante o processo de reprodução induzida e desova livre ocorrida neste estudo a 25°C.....	51
Figura 3.2 – Ovos fecundados de <i>Astyanax altiparanae</i> durante o monitoramento e distribuição de ovos para as placas de cultivo celular.....	51
Figura 3.3 – Exemplar de <i>Astyanax altiparanae</i> apresentando completa pigmentação das pupilas, pigmentação do sangue (região cardíaca totalmente avermelhada) e desenvolvimento de dois arcos branquiais, durante o monitoramento em temperatura de 25°C.	52
Figura 3.4 – Coração pigmentado de <i>Astyanax altiparanae</i> , apresentando ainda maior desenvolvimento da vesícula óptica e bexiga natatória inflada, com início do desenvolvimento do intestino.....	52
Figura 3.5 – Maior desenvolvimento do trato digestório (intestino) de <i>Astyanax altiparanae</i> durante o período de pré-flexão da notocorda, em temperatura de 25°C.	53
Figura 3.6 – Desenvolvimento completo das nadadeiras peitorais e dos arcos branquiais de <i>Astyanax altiparanae</i> durante o estágio de pré-flexão em temperatura de 25°C.	53
Figura 3.7 – Bexiga natatória inflada e vestígio de alimento no trato digestório de <i>Astyanax altiparanae</i> durante o estágio de pré-flexão (7dpe) em temperatura de 25°C.	54
Figura 3.8 – Seguimentação completa dos raios da nadadeira dorsal de <i>Astyanax altiparanae</i> durante o estágio de flexão da notocorda (9dpe) em temperatura de 25°C.	54
Figura 3.9 – Seguimentação completa dos raios da nadadeira anal de <i>Astyanax altiparanae</i> em temperatura de 25°C	55

Figura 3.10 – Flexão total da porção final da notocorda de <i>Astyanax altiparanae</i> (10dpe) durante o desenvolvimento em temperatura de 25°C.....	55
Figura 3.11 – Completo desenvolvimento dos olhos e pigmentação puntiforme na cabeça de <i>Astyanax altiparanae</i> durante o período de pós-flexão.....	56
Figura 3.12 – Exemplar de <i>Astyanax altiparanae</i> no estágio de pós-flexão (22dpe) apresentando completo desenvolvimento dos raios das nadadeiras peitorais, anal, dorsal e caudal.....	56

Anexo II

Figura 4.1 – Exemplar de <i>Astyanax altiparanae</i> apresentando edema cardíaco (72hpe) em temperatura de 30°C.....	57
Figura 4.2 – Malformação da porção final da notocorda de <i>Astyanax altiparanae</i> em temperatura de 30°C (64hpe).....	57
Figura 4.3 – Malformação da notocorda de <i>Astyanax altiparanae</i> , durante o estágio larval vitelino em temperatura de 20°C	58
Figura 4.4 – Malformação da notocorda de um exemplar de <i>Astyanax altiparanae</i> , durante o estágio de pré-flexão (86hpe) em temperatura de 30°C	58
Figura 4.5 – Exemplar de <i>Astyanax altiparanae</i> apresentando completo desenvolvimento da pupila (56hpe) porém com maldesenvolvimento da cabeça, observado em temperatura de 20°C.....	59
Figura 4.6 – Malformação da cabeça e edema cardíaco no mesmo exemplar de <i>Astyanax altiparanae</i> durante o estágio larval vitelino em temperatura de 20°C	59
Figura 4.7 – Edema cardíaco e malformação da notocorda de <i>Astyanax altiparanae</i> , durante o desenvolvimento morfológico (64hpe) ocorrido a 20°C	60

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1.1 – Descrição dos estágios iniciais de desenvolvimento de <i>A. altiparanae</i> , no período compreendido desde a eclosão até o término do desenvolvimento larval.....	5
Tabela 1.2 – Período decorrido na incubação dos ovos até a eclosão (em hpi) de <i>Astyanax altiparanae</i> em diferentes temperaturas.	8
Tabela 1.3 – Número de observações e percentagem de larvas e pós-larvas de <i>Astyanax altiparanae</i> que apresentavam edemas cardíacos e malformações de acordo com cada estágio de desenvolvimento para cada temperatura testada.	12
Tabela 1.4 – Parâmetros de qualidade da água analisados antes e depois da renovação da água das placas de cultivo celular de acordo com cada estágio de desenvolvimento de <i>Astyanax altiparanae</i> em diferentes temperaturas.	17

Capítulo 2

Tabela 2.5 – Descrição dos estágios de desenvolvimento de <i>Astyanax altiparanae</i> , compreendido desde a eclosão até o término do período de desenvolvimento inicial.	30
Tabela 2.6 – Morfometria dos parâmetros avaliados durante o período de desenvolvimento larval vitelino de <i>Astyanax altiparanae</i> , em temperatura de 25°C.	33
Tabela 2.7 - Morfometria dos parâmetros avaliados durante o período de pré-flexão de <i>Astyanax altiparanae</i>	36
Tabela 2.8 – Principais eventos morfológicos ocorridos desde a eclosão até a absorção completa da reserva vitelínica do lambari <i>Astyanax altiparanae</i> , durante acompanhamento individual à temperatura de 25° C, evidenciando a cronologia em horas pós-eclosão (hpe) e unidade térmica acumulada (UTA).....	37
Tabela 2.9 - Morfometria dos parâmetros avaliados durante o período de flexão da notocorda de <i>Astyanax altiparanae</i>	38

Tabela 2.10 - Morfometria (em mm) dos parâmetros avaliados durante o estágio de desenvolvimento pós-flexão do <i>Astyanax altiparanae</i>	39
Tabela 2.11 – Parâmetros de qualidade da água medidos em cada estágio do desenvolvimento de <i>A. altiparanae</i> em sistema de placas de cultivo celular, antes e depois da renovação de água.	41

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	xiv
CARACTERÍSTICAS DA ESPÉCIE EM ESTUDO	xiv
O GÊNERO <i>Astyanax</i>	xiv
<i>Astyanax altiparanae</i>	xv
REFERÊNCIAS.....	xvi
OBJETIVO GERAL	xix
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	xix
CAPÍTULO 1. EFEITOS DA TEMPERATURA SOBRE O DESENVOLVIMENTO ONTOGENÉTICO LARVAL E PÓS-LARVAL DE <i>Astyanax altiparanae</i> (PISCES, CHARACIDAE).....	1
1.1 INTRODUÇÃO	1
1.2 MATERIAL E MÉTODOS	2
1.2.1 MANEJO DE REPRODUTORES E REPRODUÇÃO	2
1.2.2 EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A DESOVA.....	4
1.2.3 TERMINOLOGIA.....	5
1.2.4 EFEITOS DA TEMPERATURA SOBRE O DESENVOLVIMENTO LARVAL.....	5
1.2.5 ALIMENTAÇÃO PÓS-LARVAL	6
1.2.6 QUALIDADE DA ÁGUA.....	6
1.2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	7
1.3 RESULTADOS	7
1.4 DISCUSSÃO	19
REFERÊNCIAS.....	22
CAPÍTULO 2. DESENVOLVIMENTO ONTOGENÉTICO LARVAL E PÓS-LARVAL DE <i>Astyanax altiparanae</i> (GARUTTI & BRITSKI, 2000) EM CONDIÇÕES LABORATORIAIS.....	26
2.1 INTRODUÇÃO	26

2.2	MATERIAL E MÉTODOS	27
	2.2.1 MANEJO DE REPRODUTORES	28
	2.2.2 INDUÇÃO HORMONAL	29
	2.2.3 DESOVAS	29
	2.2.4 TERMINOLOGIA ADOTADA.....	30
	2.2.5 MORFOMETRIA	31
	2.2.6 MORFOLOGIA	31
	2.2.7 ALIMENTAÇÃO PÓS-LARVAL	32
	2.2.8 QUALIDADE DA ÁGUA.....	32
	2.2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
2.3	RESULTADOS	33
	2.3.1 DESENVOLVIMENTO LARVAL VITELINO.....	33
	2.3.2 PRÉ-FLEXÃO.....	35
	2.3.3 FLEXÃO	38
	2.3.4 PÓS-FLEXÃO	39
	2.3.5 QUALIDADE DA ÁGUA NO SISTEMA EXPERIMENTAL	41
	2.3.6 SOBREVIVÊNCIA.....	42
2.4	DISCUSSÃO	43
2.5	REFERÊNCIAS	47
	ANEXO I.....	51
	ANEXO II.....	57

INTRODUÇÃO GERAL

A utilização de animais capazes de fornecer informações sobre a qualidade do ambiente além de salientar a resistência que estes apresentam quando expostos aos xenobiontes (Lins, Kirschnik et al. 2010), deve corresponder à sua distribuição geográfica e capacidade adaptativa desses animais durante os ensaios laboratoriais (Akaishi, Silva de Assis et al. 2004).

Os peixes, de forma geral, são considerados bons indicadores da saúde ambiental, sendo as espécies nativas, fundamentais na projeção de alertas sobre quaisquer mudanças ambientais muito antes que ocorra danos mais severos ao ambiente (Vieira, Almeida et al. 2014). Os estágios iniciais de vida desses animais são ainda mais vulneráveis às variáveis ambientais (Ramos, Cabral et al. 2015), o que os tornam bioindicadores ainda melhores para a compreensão desses efeitos sobre o meio aquático.

Estudos envolvendo o desenvolvimento pós-eclosão de peixes estão ganhando espaço na avaliação do efeito dos mais diversos xenobiontes sobre a qualidade do meio aquático (Flores, Araiza et al. 2002; Meier, Craig Morton et al. 2010), pois nestes primeiros estágios de vida, os peixes podem sofrer severas alterações morfológicas (Zambonino Infante and Cahu 2001), respondendo mesmo à eventos de curta duração (Ramos, Cabral et al. 2015).

A determinação ainda mais eficaz sobre os efeitos dos agentes xenobióticos e estressores sobre a saúde do meio aquático só pode ser entendida pela dinâmica ocorrida durante os processos de desenvolvimento normal (ou o que seria o esperado) de uma determinada espécie.

CARACTERÍSTICAS DA ESPÉCIE EM ESTUDO

O GÊNERO *Astyanax*

De acordo com Andrade et al. (2007) dentre os peixes da família Characidae, o número mais expressivo de gêneros concentra-se na subfamília Tetragonopterinae, sendo que o gênero *Astyanax* (Baird & Girard, 1854) é o que apresenta o maior número de espécies e distribuição geográfica mais ampla.

A última revisão completa do gênero *Astyanax* foi realizada por Eigenmann (1921) e incluía 24 espécies e subespécies distribuídas desde o México e Estados Unidos, até a fronteira do Sul do Brasil com o Uruguai e a Argentina. Após a revisão realizada por Eigenmann, um sumário detalhado publicado por Géry (1977), identificou mais de 60 espécies incluindo sinônimos e considerando novas subespécies com propósitos taxonômicos baseados nos dados de Eigenmann (Garavello & Sampaio 2010).

Segundo Garutti (1999), o gênero *Astyanax* é formado por peixes de pequeno porte, com dimensão de até 200 mm e comuns em bacias hidrográficas neotropicais. O mesmo autor constata que aproximadamente uma centena de espécies nominais foram incluídas ao gênero *Astyanax* e que a produção de novas coleções ictiológicas viabilizou a observação de várias espécies do gênero *Astyanax* oriundas de bacias hidrográficas da América do Sul.

Almeida & Sampaio (2009), afirmam que o gênero *Astyanax* é composto por uma grande variedade de peixes presentes nas bacias hidrográficas da América do Sul e que apresenta mais de 80 espécies conhecidas para os ambientes continentais brasileiros. O fato de possuírem grande variedade genômica e serem morfologicamente muito semelhantes, faz com que alguns pesquisadores considerem o gênero como um complexo de espécies.

Astyanax altiparanae

Conhecidos vulgarmente como lambaris-do-rabo-amarelo, os *Astyanax altiparanae* pertencem à família Characidae, povoam desde pequenos riachos a grandes rios formadores das bacias hidrográficas de todo o ambiente tropical (Porto-Foresti *et al.*, 2005). Segundo o mesmo autor, o *Astyanax altiparanae* é uma espécie de pequeno porte, entre 10 a 15 cm de comprimento, e podendo chegar a 60 gramas de peso. Por se tratar de uma espécie nativa, não migratória, e de grande importância comercial, os peixes do gênero *Astyanax sp.* têm sido muito utilizados nos experimentos de bioindicadores de contaminação ambiental (Ostrensky *et al.* 2001, Silva *et al.* 2009).

Anteriormente conhecidos como *Astyanax bimaculatus*, os *Astyanax altiparanae* são exceção no povoamento na bacia hidrográfica do Iguazu em relação às outras espécies do gênero *Astyanax sp.* (Garutti e Britski 2000). Além

de importância ecológica a espécie tem produção artificial em escala comercial, apresentam hábito alimentar flexível, podendo se alimentar de insetos, sementes e também pode praticar o canibalismo.

O dimorfismo sexual nessa espécie é bem visível, sendo os machos, além de menores, de crescimento mais tardio. No período reprodutivo, apresentam espículas na nadadeira anal, aderindo textura áspera ao toque, facilitando a sua diferenciação sexual (Porto-Foresti *et al.* 2005). Outro parâmetro do seu comportamento reprodutivo é a idade de maturação sexual. Estima-se que em sistema de cultivo esse tempo é reduzido para quatro meses de vida.

Diversos estudos já foram realizados utilizando indivíduos da espécie *Astyanax* como bioindicadores no monitoramento de corpos hídricos (Schulz & Martins Junior 2001; Alberto *et al.* 2005; Ghisi & Oliveira, 2013), ambientes contaminados por agrotóxicos (Disner *et al.* 2011; Pistone *et al.* 2012; Goldoni & Silva, 2012), metais (Santos 2009; Mariano-da-Silva 2012), combustíveis e derivados (Akaishi *et al.* 2004; Dal Pont 2012) e medicamentos (Matsumoto & Cólus 2000), porém ambos abordam a utilização desta espécie em fases juvenis e adultas, pouco se conhece a exploração desta espécie em suas fases iniciais de vida em ensaios e estudos laboratoriais.

REFERÊNCIAS

Akaishi, F. M., H. C. Silva de Assis, S. C. G. Jakobi, D. R. Eiras-Stofella, S. D. St-Jean, S. C. Courtenay, E. F. Lima, A. L. R. Wagener, A. L. Scofield and C. A. O. Ribeiro (2004). "Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil." *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 46: 244-253.

Alberto, A.; Camargo, A. F. M.; Verani, J. R.; Costa, O. F. T.; Fernandes, M. N. Health variables and gill morphology in the tropical fish *Astyanax fasciatus* from a sewage-contaminated river. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 61. 247–255. 2005.

Almeida, F. & Sampaio, W. Bicho da vez – n°.10. Universidade Federal de Viçosa. Museu de Zoologia João Moojen. p. 03. 2009.

Andrade, D. F.; Pereira, C. L.; Angelini, R.; Lima, F. P. Nicho trófico de duas espécies do gênero *Astyanax* (Characidae) no Rio Corrente, sudoeste de Goiás. *Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil*, 23 a 28 de setembro de 2007, Caxambu, MG, Brasil.

Baird, F. S. & C. Girard, 1854. Descriptions of new species of fishes collected in Texas, New Mexico and Sonora, by Mr. John H. Clark, on the U.S. and Mexican Boundary Survey, and in Texas by Capt. Stewart Van Vliet, U.S.A. Proceedings of the Academy Natural Sciences, Philadelphia, 1854: 24–29.

Dal Pont, G. Toxicidade do óleo diesel para o peixe *Astyanax altiparanae*. 111 p. Dissertação (Mestrado) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2012.

Disner, G. R.; Rocha, M. V. Da.; Miranda, G. B. de. Avaliação da atividade mutagênica do Roundup® em *Astyanax altiparanae* (Chordata, Actinopterygii). Evidência, Joaçaba v. 11 n. 1, p. 33-42, janeiro/junho 2011.

Eigenmann, C. H. 1921. The American Characidae. Memoirs of the Museum of Comparative Zoology, 23(3): 209–310.

Faustino, F., L. S. O. Nakaghi and E. Neumann (2011). "Brycon gouldingi (Teleostei, Characidae): aspects of the embryonic development in a new fish species with aquaculture potential." Zygote 19(04): 351-363.

Flores, J., M. Araiza and M. Valle (2002). Desarrollo embrionario de *Ctenopharyngodon idellus* (Carpa herbivora).[online], CIVA 2002.

Lins, J., P. G. Kirschnik, V. Queiroz and S. M. Cirio (2010). "Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático." Rev. Acad., Agrár. Ambient 8: 469-484.

Garavello, J. C. A & Sampaio, F. A. A. Five new species of genus *Astyanax* Baird & Girard, 1854 from Rio Iguaçu, Paraná, Brazil (Ostariophysi, Characiformes, Characidae). Braz. J. Biol., 2010, vol. 70, no. 3, p. 847-865.

Garutti, V. Revisão taxonômica dos *Astyanax* (Pisces, Characidae), com mancha umeral ovalada e mancha no pedúnculo caudal, estendendo-se a extremidade dos raios caudais medianos, das bacias do Paraná, São Francisco e Amazônica. São Jose do Rio Preto, Tese de Livre-Docência, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE, Universidade Estadual Paulista, p. 286. 1995.

Garutti, V. & H. A. Britski. 2000. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do Alto Rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS, Série Zoologia, 13: 65–88.

Ghisi, N. De C. & Oliveira, E. C. de. Evidence of contamination in the main body of the public water supply of Campo Mourão-PR: an analysis from a bioindicator of environmental quality. SaBios: Rev. Saúde e Biol., v.8, n.2, p.13-22, mai./ago., 2013.

Goldoni, A. & Silva, L. B. da. Potencial mutagênico do fungicida Mancozebe em *Astyanax jacuhiensis* (Teleostei: Characidae). Biosci. J., Uberlândia, v. 28, n. 2, p. 297-301, Mar./Apr. 2012.

Mariano-Da-Silva, S.; Costa Netto, A. P.; Oliveira, C. A.; Faria, F. P. De.; Mariano-Da-Silva, F. M. de S. Biomonitoramento de metais pesados no Córrego do Cravo e Represa Paraíso utilizando *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) (Characiformes, Characidae). Revista Agrarian. Dourados, v.5, n.16, p.140-150, 2012.

Matsumoto, F. E. & Cólus, I. M. S. Micronucleus frequencies in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) treated with cyclophosphamide or vinblastine sulfate. Genetics and Molecular Biology, 23, 2, 489-492, 2000.

Meier, S., H. Craig Morton, G. Nyhammer, B. E. Grøsvik, V. Makhotin, A. Geffen, S. Boitsov, K. A. Kvestad, A. Bohne-Kjersem, A. Goksøyr, A. Folkvord, J. Klungsøyr and A. Svoldal (2010). "Development of Atlantic cod (*Gadus morhua*) exposed to produced water during early life stages: Effects on embryos, larvae, and juvenile fish." Marine Environmental Research 70(5): 383-394.

Ostrensky, A., Chaves, P.T.C., Duboc, L.F., Guimarães, A.T.B., Cruz, S.R.Z., Wegbecher, F.X., Pilchowski, R.W., Teixeira, U.A., Belz, C.E., 2001. Monitoramento ictiofaunístico pós-derramamento de óleo nos Rios Barigüí e Iguaçu. In: UN-REPAR/PETROBRÁS, 2001. 2º Seminário do Rio Iguaçu. Araucária, PR, Brasil, p. 32–52.

Pistone, G.; Eguren, G.; Rodriguez-lthurralde. Inhibition, recovery and field responses of *Astyanax fasciatus* (Cuvier, 1819) brain cholinesterases upon exposure to azinphos-methyl. J. Braz. Soc. Ecotoxicol., v. 7, n. 2, 93-102. 2012.

Porto-Foresti, F., R. B. Castilho-Almeida, and F. Foresti. "Biologia e criação do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*)."*Espécies nativas para piscicultura no Brasil 2* (2005): 101-116.

Ramos, S., H. Cabral and M. Elliott (2015). "Do fish larvae have advantages over adults and other components for assessing estuarine ecological quality?" Ecological Indicators 55(0): 74-85.

Santos, D. C. M. dos. Toxidez aguda do zinco em lambaris *Astyanax aff. Bimaculatus* (Linnaeus, 1758). Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, MG. 2009.

Schulz, U.H. & H. Martins-Junior. *Astyanax fasciatus* as bioindicator of water pollution of Rio dos Sinos, RS, Brazil. Brazilian Journal of Biology 61: 615-622. 2001.

Vieira, C. E. D., M. d. S. Almeida, B. A. Galindo, L. Pereira and C. B. d. R. Martinez (2014). "Integrated biomarker response index using a Neotropical fish to assess the water quality in agricultural areas." Neotropical Ichthyology 12(1): 153-164.

Zambonino Infante, J. L. and C. L. Cahu (2001). "Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 130(4): 477-487.

OBJETIVO GERAL

Identificar e descrever os processos ontogenéticos e morfométricos do lambari *A. altiparanae*, desde o momento da eclosão até o final do período da fase de pós-flexão da notocorda, visando a utilização futura da espécie como modelo a ser empregado em ensaios e estudos laboratoriais diversos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos da temperatura sobre o desenvolvimento larval e pós-larval de *A. altiparanae*, estabelecendo a temperatura mais adequada para a utilização da espécie em ensaios laboratoriais;
- Descrever os processos morfológicos ocorridos individualmente em larvas e pós-larvas do lambari *A. altiparanae*, durante seu desenvolvimento em condições de temperatura consideradas ideais.

CAPÍTULO 1. EFEITOS DA TEMPERATURA SOBRE O DESENVOLVIMENTO ONTOGENÉTICO LARVAL E PÓS-LARVAL DE *Astyanax altiparanae* (PISCES, CHARACIDAE)

RESUMO

O estudo teve por objetivo caracterizar o desenvolvimento ontogenético inicial do lambari-do-rabo-amarelo *Astyanax altiparanae* e investigar os efeitos da temperatura (20, 25 e 30°C) sobre os parâmetros morfométricos durante o período de desenvolvimento larval e pós larval da espécie em condições laboratoriais. Os embriões foram obtidos através de reprodução induzida pelo uso de extrato hipofisário de carpas. Larvas recém eclodidas (n = 48 por tratamento) foram transferidas para placas de cultivo celular de 6 poços (uma larva/poço), mantidas em uma estufa microprocessada tipo DBO. O desenvolvimento ontogenético foi caracterizado desde a eclosão até o estágio de pós-flexão. Observou-se uma grande variação na ocorrência dos eventos ontogenéticos em função da temperatura. Quanto mais rápido o processo de desenvolvimento (o que aconteceu a 30°C), maior também foi a taxa de alometria observada. O efeito da temperatura sobre o consumo do vitelo também foi evidente, sendo o mais tardio (20°C) associado aos menores valores de comprimento total observados. Nenhum dos indivíduos mantidos a 20°C e a 30°C completou o desenvolvimento pós-larval. A 20°C os indivíduos testados sobreviveram até o estágio de pré-flexão e a 30°C até estágio de flexão da notocorda. Já para os exemplares mantidos na temperatura de 25°C, 8% (n = 4) dos indivíduos chegaram vivos ao estágio de pós-flexão, o que ocorreu 22 dias após a eclosão. Os resultados aqui obtidos apontam a potencialidade do uso de *A. altiparanae*, como espécie modelo em ensaios laboratoriais realizados a 25°C.

Palavras chave: desenvolvimento, parâmetros morfométricos, ontogenia, indução hormonal.

1.1 INTRODUÇÃO

Estudos demonstram que nas suas fases iniciais de vida os peixes podem ser influenciados por estímulos ambientais de baixa intensidade ou mesmo de curta duração (Ramos, Cabral et al. 2015), o que os tornam bons bioindicadores das condições ambientais (Chovanec, Hofer et al. 2003, Ruaro, Gubiani et al. 2015). A sensibilidade a esses efeitos, por sua vez, está relacionada principalmente à espécie e ao estágio de vida em que a mesma se encontra (Klimogianni, Koumoundouros et al. 2004).

Dentre os fatores que interferem no desenvolvimento ontogenético e na própria sobrevivência dos peixes, um dos mais, senão o mais importante, é a temperatura (Laurence 1975, Blaxter 1991, Pepin 1991, Rombough 1997, Aritaki

and Seikai 2004, Pankhurst and Munday 2011). De uma forma em geral, a temperatura do meio aquático afeta diretamente o ritmo biológico dos peixes (Ostrensky and Boeger 1998), sendo que, aproximadamente a cada 10 °C de variação na temperatura do meio, dobram ou diminuem pela metade as taxas metabólicas dos peixes (Azocar, Claramunt et al. 2014), o que acarreta em uma proporcional variação temporal nos eventos ontogenéticos.

O lambari-do-rabo-amarelo *Astyanax altiparanae* é uma espécie que tem sido cada vez mais utilizada como bioindicadora em estudos ambientais (Nogueira, Castro et al. 2009, Dal Pont 2012, Siqueira-Silva, Santos Silva et al. 2015), pois apresenta grande plasticidade trófica e a capacidade de se alimentar nos mais diversos compartimentos ambientais (Peretti and Andrian 2008). Também tem sido empregada como espécie-modelo em ensaios laboratoriais (Almeida 2007, Vicente 2014, Ostrensky, Pedrazzani et al. 2015), por, dentre outras características, apresentar elevada rusticidade, ciclo de vida rápido, pequeno porte e fácil manejo (Garutti 2003).

Este trabalho tem como objetivo identificar e descrever os efeitos da temperatura sobre os principais caracteres e sobre os processos ontogênicos durante as fases larval vitelina, de pré-flexão, de flexão e de pós-flexão da notocorda de *A. altiparanae*.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Pesquisa com Organismos Aquáticos (LAPOA), do Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais (GIA), localizado no Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, Paraná, Brasil.

1.2.1 MANEJO DE REPRODUTORES E REPRODUÇÃO

Os exemplares de *A. altiparanae* utilizados no processo de reprodução induzida foram selecionados de um banco de reprodutores do GIA, com base nos caracteres sexuais secundários dos animais. Os machos através de análise da textura da nadadeira anal (presença de espículas na nadadeira) e as fêmeas pela coloração avermelhada do poro urogenital e pelo ventre abaulado.

Os animais foram estocados em um tanque de manutenção de reprodutores (1000 L), confeccionado em polietileno, conectado a um filtro mecânico e biológico externo, e mantido a $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, através do uso de três aquecedores de 300 watts, controlados por um termostato digital (BOYU, Taiwan). O fotoperíodo foi ajustado para 12 h luz: 12 h escuro e intensidade luminosa $1498 \pm 23\text{lux}$ (MLM-1010, Brasil). Nesses tanques eram mantidos 200 exemplares, enquadrados na classe de tamanho III, segundo classificação proposta por Vicente (2014). Os animais foram alimentados duas vezes ao dia (08:00 e 17:00 horas), com ração comercial extrusada contendo 45% de proteína bruta e 4% de extrato etéreo.

Dentre esses animais, 9 fêmeas e 27 machos foram selecionadas em função do seu Fator de Condição Corporal (FC), calculado a partir da seguinte equação:

$$FC = \left(\frac{P}{CT^3} \right) * 100$$

Onde:

P= peso (g).

CT= Comprimento total (cm).

As fêmeas, apresentando $FC=1,79 \pm 0,08$ receberam uma dose preparatória de 1 mg/kg de extrato bruto de hipófise (EBHC) e, em seguida, foram alojadas em um tanque-rede (*nylon* 3 mm com malha 1,5x1,5 cm), com dimensões de 25x25x20 cm (comprimento, largura e altura, respectivamente), instalado no interior de um tanque de manutenção de reprodutores. Após 8 horas foi aplicada uma segunda dose de EBHC, porém com concentração de 5 mg/kg. No momento em que as fêmeas receberam a segunda dose, os machos ($FC=1,72 \pm 0,15$), receberam uma dose única de 1,0 mg/kg de EBHC.

Após os procedimentos de indução hormonal, os reprodutores foram transferidos para um segundo tanque-rede (*nylon* 3 mm com malha 1,5x1,5 cm) com dimensões de 25x15x15 cm (comprimento, largura e altura, respectivamente), mantido no interior de um aquário de vidro de 36 L. O aquário, por sua vez, era ligado, através de uma bomba submersa (SB-2000, Sarlobetter, Brasil), a filtros mecânicos e biológicos e submetido à aeração constante. A

temperatura do sistema foi mantida de acordo com os tratamentos térmicos testados (20, 25 e 30°C). O controle da temperatura nesse sistema foi feito através do uso de um aquecedor de 300 watts e de um termostato digital (BOYU, Taiwan).

1.2.2 EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A DESOVA

Foram monitoradas as Unidades Térmicas Acumuladas (UTAs), calculadas desde o momento da aplicação do hormônio indutor nos reprodutores até o momento da desova, a partir da aplicação da seguinte fórmula:

$$UTA = \sum (Hr * Temp \text{ } ^\circ C)$$

Onde:

Hr = N^o de horas contabilizadas do momento da indução até a desova.

Temp °C = Valor da temperatura registrado de hora em hora.

Após a desova natural, os reprodutores eram checados para verificação de possíveis ferimentos e óbitos, uma vez que há um forte comportamento agonístico entre machos e fêmeas durante a reprodução, e só então transferidos para tanques de recuperação.

Os ovos foram removidos por sifonagem, retidos em uma peneira de malha de 0,5 mm e lavados em água corrente. Em seguida, eram coletados com uma pipeta de Pasteur, analisados e selecionados sob microscópio óptico Leica[®] DMLS, adaptado com câmera digital ToupCam[™] (L3CMOS-14000KPA, China). Para cada tratamento, foram utilizados 48 ovos fecundados, mantidos individualmente em 8 placas de cultivo celular de 6 poços cada, com tampa e com capacidade para 17 mL em cada poço (KASVI K12-006, China). As placas foram mantidas em incubadora vertical tipo DBO Microprocessada (ADAMO, Brasil), com fotoperíodo ajustado para 12 h luz: 12 h escuro, com intensidade luminosa 1498±23lux (MLM-1010, Brasil). Todo esse procedimento experimental era integralmente repetido para cada tratamento (temperatura) testado.

1.2.3 TERMINOLOGIA

Os dados morfométricos foram obtidos com auxílio de estereomicroscópio Leica® MZ6, com aumento de 0,63x e 0,8x, com uma câmera ToupCam™ (L3CMOS-14000KPA, China) acoplada. O desenvolvimento larval foi analisado através de observações visuais registradas diariamente com auxílio de microscópio óptico Leica® DMLS. A diferenciação dos estágios de desenvolvimento larval foi baseada nas descrições de Nakatani, Agostinho et al. (2001), com modificações (Tabela 2.5).

Foram considerados como “larvas” as fases anteriores ao inflamento da bexiga natatória e como “pós-larvas” os períodos subsequentes. A cronologia evolutiva foi descrita em unidades térmicas acumuladas (UTA), horas após indução (hpi), minutos pós-eclosão (mpf), horas pós-eclosão (hpe) e dias pós-eclosão (dpe).

Tabela 1.1 – Descrição dos estágios de desenvolvimento inicial de *A. altiparanae*, no período compreendido desde a eclosão até o término do desenvolvimento larval.

Estágio	Descrição
Larval vitelino	Do momento da eclosão até o início do desenvolvimento do tubo digestório, caracterizado pela abertura da cavidade oral e anal e aparecimento da bexiga natatória;
Pré-flexão	Desde o aparecimento da bexiga natatória até o início do dobramento distal da notocorda, bem como início da segmentação dos raios das nadadeiras peitorais e anal;
Flexão da notocorda	Desenvolvimento dos raios das nadadeiras dorsal e caudal e completa flexão da porção distal da notocorda;
Pós-flexão	Completa segmentação dos raios das nadadeiras anal, dorsal, caudal e início do desenvolvimento de escamas.

1.2.4 EFEITOS DA TEMPERATURA SOBRE O DESENVOLVIMENTO LARVAL

Foram realizadas observações horárias nos indivíduos desde a eclosão até

a absorção completa da reserva vitelínica; a cada 12 horas, a partir do momento em que houve completa absorção da reserva vitelínica até a flexão total da notocorda; e a cada 24 h após esta fase e a até o final do período pós-larval.

Para isso, as placas de cultivo foram retiradas individualmente da incubadora. Cada poço era então sifonado em 3/4 do seu volume de água, com auxílio de uma pipeta de Pasteur, em seguida os animais foram observados e fotografados individualmente sob estereomicroscópio.

Nessas ocasiões eram mensurados e quantificados o comprimento total (CT), a altura do corpo (HC1), o comprimento da cabeça (CC), a altura da cabeça (HC2), o diâmetro dos olhos (DO), o comprimento do saco vitelínico (CV) e a altura do saco vitelínico (HV) e o volume da reserva vitelínica (V), calculado de acordo com a equação:

$$V(mm^3) = \frac{\pi * CV * HV^2}{6}$$

Ao término dos procedimentos, o poço onde o animal se encontrava era novamente completado com água na respectiva temperatura e a placa retornava para a incubadora. Todo o procedimento analítico era realizado em sala mantida na mesma temperatura do tratamento experimental que estava sendo analisado naquele momento.

1.2.5 ALIMENTAÇÃO PÓS-LARVAL

Assim que se constatava que 50% das pós-larvas de cada tratamento haviam completado a absorção de sua reserva vitelínica, passava-se a fornecer a todos os animais ração microencapsulada (American B.P., EUA), contendo 46% de PB. O arraçamento foi realizado com 0,1g de ração, pesada em balança digital (precisão de 0,0001g) (Shimadzu-AUY220, Japão), previamente dissolvida em 40 ml de água. Com auxílio de uma pipeta de Pasteur, uma gota dessa suspensão era fornecida para cada larva todos os dias às 18:00 horas.

1.2.6 QUALIDADE DA ÁGUA

A água utilizada para a renovação/reposição diária dos poços era proveniente da rede de abastecimento público, sendo previamente filtrada em

filtro de 45µm, clorada e neutralizada com tiosulfato de sódio. Essa água era então mantida em um tanque de polietileno (1000 L), acoplado a um filtro biológico e mecânico do tipo *air lift*. Antes de ser usada, a água era transferida para uma incubadora tipo DBO, até que atingisse a temperatura do respectivo tratamento experimental.

Os seguintes parâmetros físico-químicos da água eram analisados diariamente como rotina durante o experimento: pH, através de peagâmetro digital (AZ-86505, Taiwan); oxigênio dissolvido (OD) e percentual de saturação de oxigênio (OD), por meio de oxímetro digital (YSI Pro20, EUA); alcalinidade mensurada por titulometria com ácido sulfúrico 0,02N (APHA, 2005a); e concentração de dióxido de carbono (CO₂) mensurada por titulometria com hidróxido de sódio 0,02N (APHA, 2005b); concentração de nitrogênio na forma de amônia total [N-AT= NH₃+NH₄⁺] obtida pelo método do indofenol (APHA, 2005) e nitrito (APHA 1995) seguido de leitura das amostras em espectrofotômetro de bancada (Spectronic 20 Genesys, EUA). Para análise, a água previamente sifonada dos poços de cultivo era concentrada em um béquer e analisada na forma de uma amostra única.

1.2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O banco de dados foi gerado e organizado através do uso dos *softwares* Excel[®] e Access[®] (Microsoft Office Professional Plus 2013). Os dados de qualidade da água e biométricos foram analisados através do teste de normalidade de Shapiro-Wilk, seguido pelo teste U de Mann-Whitney. Os dados biométricos foram relacionados através de análise de componentes principais e comparados através de estatística descritiva (p<0,05) e associados pela análise de Scatterplot. A sobrevivência foi analisada pela curva de Kaplan-Meier. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o *software* Statsoft Statistica^{MR} versão 10.0[®].

1.3 RESULTADOS

O tempo de desova foi inversamente proporcional à temperatura testada. As fêmeas desovaram, em média, após 220, 200, e 150 HG nas temperaturas de 20, 25 e 30°C, respectivamente.

O tempo de eclosão dos ovos incubados também foi inversamente proporcional à temperatura de incubação (Tabela 1.2). Ao eclodirem, independente da temperatura testada, as larvas apresentaram características altriciais, ou seja, não apresentavam capacidade de natação ou de se alimentar a partir de alimentos exógenos.

Tabela 1.2 – Período decorrido na incubação dos ovos até a eclosão (em hpi) de *Astyanax altiparanae* em diferentes temperaturas.

Unidade	20°C	25°C	30°C
Mediana	23	18	17
Amplitude	23-24	17-19,5	16,5-17,5
CV	1,59	2,81	1,43

Através da análise de componentes principais (Figura 1.1), observou-se que os dados morfométricos foram separados em dois grupos, sendo o primeiro, envolvendo a altura do corpo, altura da cabeça, comprimento do corpo, comprimento total e diâmetro do olho e, o outro grupo relacionado ao vitelo (altura, volume e comprimento do vitelo). Baseado nesses agrupamentos, foram definidos dois caracteres para representar os resultados obtidos, um de cada grupo: comprimento total do corpo e volume do vitelo (Figura 1.3).

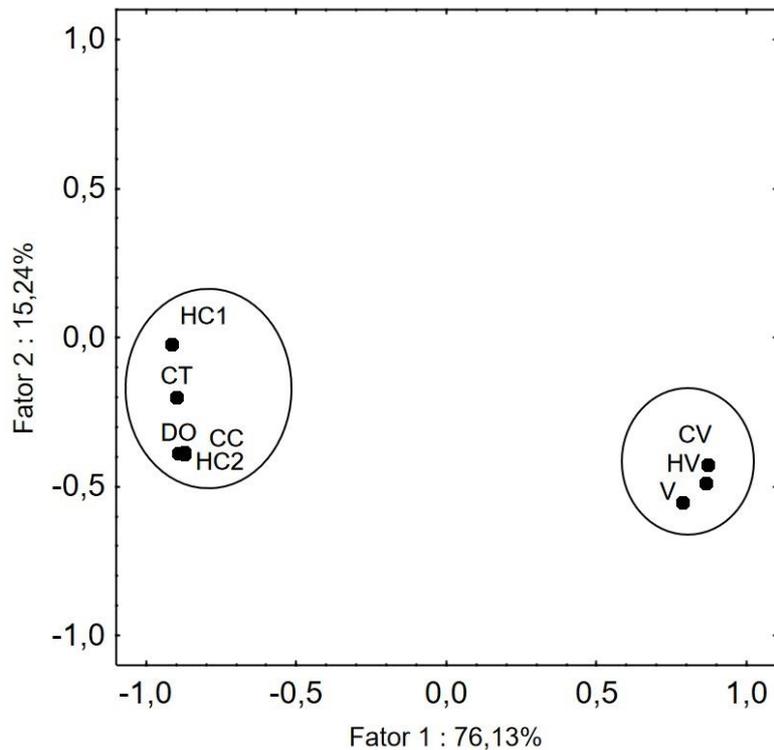


Figura 1.1 – Agrupamento das variáveis morfométricas mensuradas durante o acompanhamento do desenvolvimento ontogenético inicial em laboratório de *Astyanax altiparanae* em diferentes temperaturas.

As larvas incubadas em temperatura de 20 e 25°C eclodiram apresentando e o mesmo volume do vitelo ($0,06 \pm 0,01 \text{ mm}^3$) (Figura 1.2) e o mesmo comprimento total ($2,93 \pm 0,23 \text{ mm}$) (Figura 1.3). Já as larvas incubadas a 30°C apresentaram maior volume de vitelo ($0,11 \pm 0,02 \text{ mm}^3$) e comprimento total ligeiramente inferior ($2,73 \pm 0,20 \text{ mm}$).

O crescimento dos peixes não foi linear em nenhum dos tratamentos testados, sendo diretamente influenciado pela temperatura da água. Observou-se que com o aumento da temperatura houve uma aceleração na velocidade de consumo do vitelo. Também foi observada uma relação entre o consumo do vitelo e a taxa de crescimento dos animais, havendo uma redução das taxas de crescimento após o consumo total da reserva vitelínica (Figura 1.3).

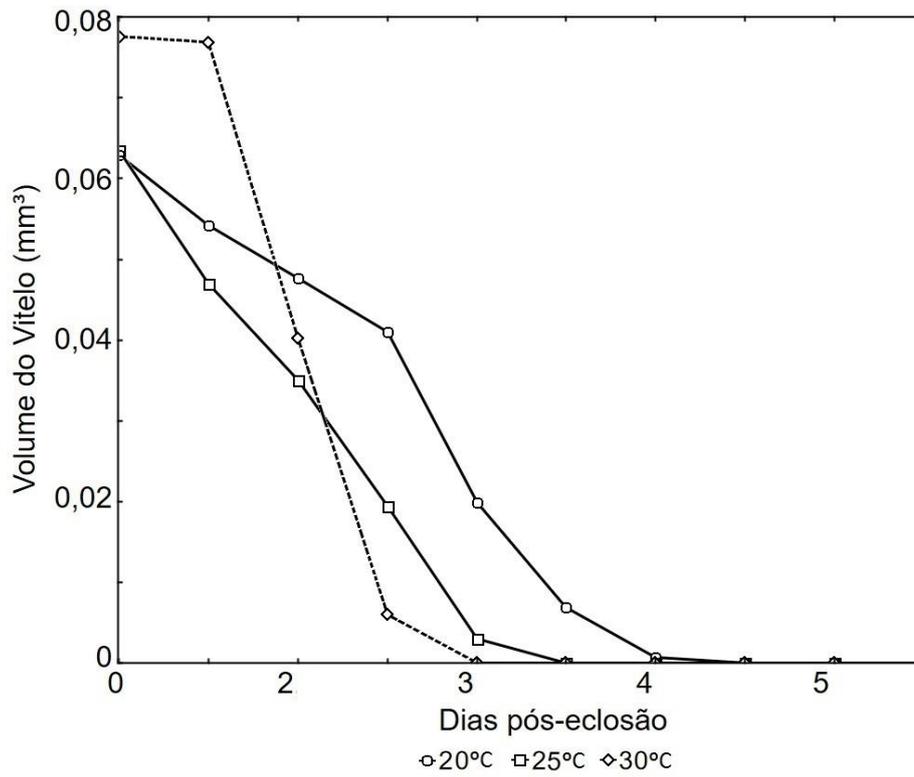


Figura 1.2 – Evolução temporal do volume médio de vitelo (mm³) de *Astyanax altiparanae* em diferentes temperaturas.

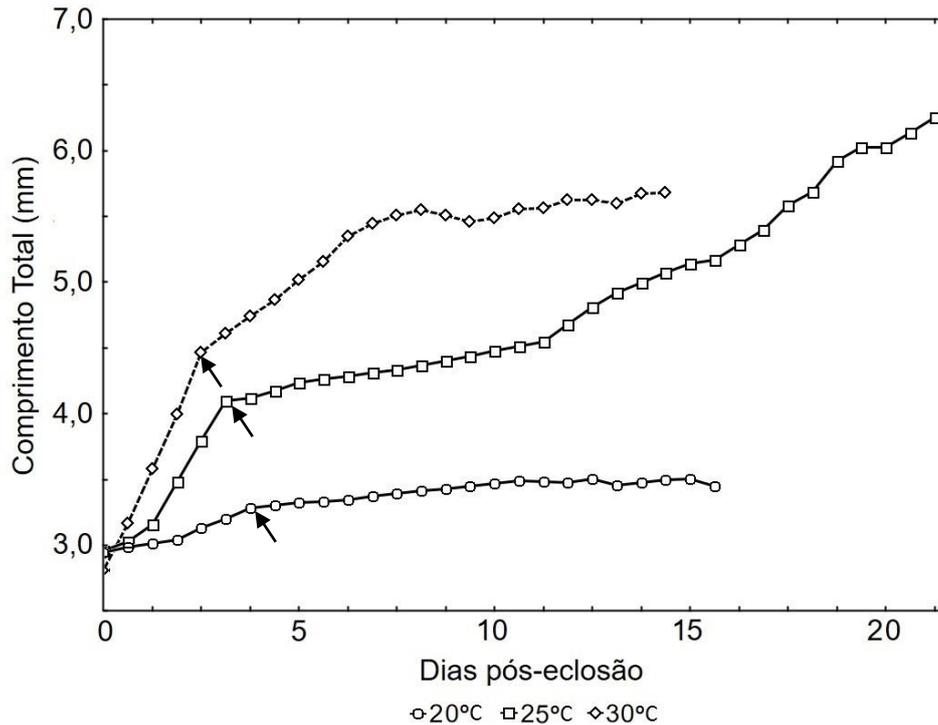


Figura 1.3 – Comprimento total (mm) médio dos exemplares de *Astyanax altiparanae* mantidos em diferentes temperaturas. As setas indicam o momento em que ocorreu o consumo total da reserva vitelínica.

Observou-se que a relação entre altura do corpo e o comprimento total também não se mostrou linear em nenhum dos tratamentos testados ao longo do desenvolvimento ontogenético inicial dos animais, o que indica que os animais apresentam crescimento alométrico nas fases iniciais de vida (Figura1.4).

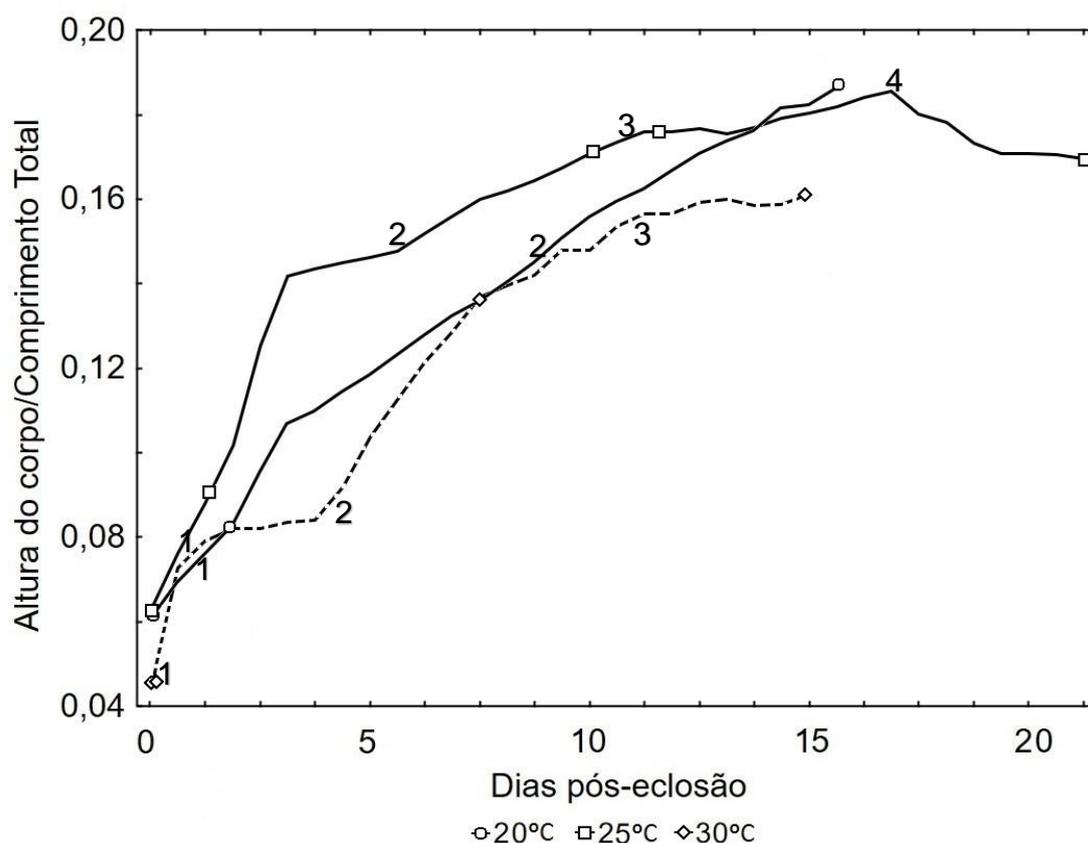


Figura 1.4 – Evolução temporal da relação altura do corpo/comprimento total de larvas e pós-larvas de *Astyanax altiparanae* em diferentes temperaturas. Os números indicam o estágio de desenvolvimento (1- Larval -vitelino; 2- Pré-flexão; 3- Flexão da notocorda; 4- Pós-flexão).

Cerca de 11% dos indivíduos dos tratamentos a 20°C e de 13% dos indivíduos mantidos a 30°C apresentavam malformação ao eclodir. Não foram observadas larvas e pós-larvas com malformações a 25°C (Tabela 1.3). Os sinais mais evidentes de malformações foram identificados na notocorda e no coração (como a ocorrência de edemas cardíacos).

Tabela 1.3 – Número de observações e percentagem de larvas e pós-larvas de *Astyanax altiparanae* que apresentavam edemas cardíacos e malformações de acordo com cada estágio de desenvolvimento para cada temperatura testada.

Temp °C	Estágio	Total Observado	Edemas Cardíacos		Malformações	
			nº de observações	% Aprox.	nº de observações	% Aprox.
20	1	182	0	0	18	10
	2	560	0	0	32	6
	3	2	0	0	0	0

Temp. °C	Estágio	Total Observado	Edemas Cardíacos		Malformações	
			nº de observações	% Aprox.	nº de observações	% Aprox.
25	1	107	0	0	0	0
	2	669	0	0	0	0
	3	87	0	0	0	0
	4	65	0	0	0	0
30	1	73	7	10	11	15
	2	539	44	8	55	10
	3	170	0	0	0	0

Algumas outras malformações foram identificadas ao longo do desenvolvimento, como, por exemplo, no 4º dpe, observou-se deformações (principalmente na boca) das pós-larvas mantidas a 30°C. Até o 7º dpe, todas as pós-larvas que apresentavam malformação, tanto a 20°C como a 30°C haviam morrido (Figura 1.5).

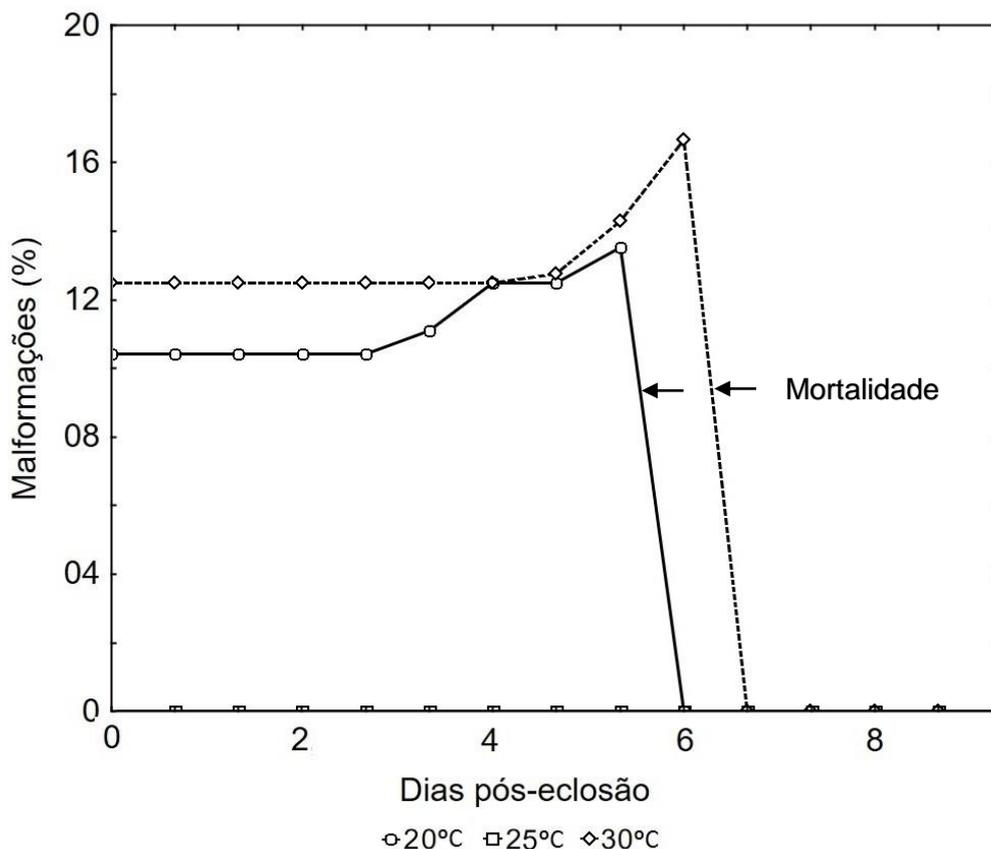


Figura 1.5 – Porcentagem de exemplares de *Astyanax altiparanae* com edemas e malformações, observados durante o desenvolvimento ontogenético inicial em diferentes temperaturas.

Não foi observada mortalidade durante o período larval-vitelino em nenhuma das temperaturas experimentais. Já em relação às pós-larvas foram registrados dois momentos considerados mais críticos de mortalidade durante todo o período experimental em todas as temperaturas testadas (Figura 1.6).

Para os organismos testados a 20°C, além da morte dos indivíduos com malformações, ocorrida entre o 2º e 6º dpe, a inanição também foi outro fator causador de morbidade. Nessa temperatura, o último vestígio de alimento no trato digestório de um animal foi registrado no 10º dpe. As últimas pós-larvas desse tratamento morreram até o 15º dpe, quando ainda se encontravam no estágio de pré-flexão.

Para os indivíduos mantidos à 25°C, registrou-se grande mortalidade entre o 4º e 5º dpe, coincidindo com o momento de transição alimentar. O segundo momento crítico foi registrado quando da flexão da notocorda, que ocorreu entre o 10º e 11º dpe, momento em que a taxa de sobrevivência caiu de 58 para 36%. A partir do 18º dpe (pós-flexão), não ocorreram mais mortes e a taxa final de sobrevivência chegou ao 22º dpe em 8% (n = 4), quando o experimento foi encerrado.

Já para os organismos mantidos a 30°C, tanto o período de transição alimentar como as malformações foram limitantes para a sobrevivência das pós-larvas até o 5º dpe. Entre o 7º e 8º dpe, na fase de metamorfose da notocorda, observou-se uma acentuada queda na taxa de sobrevivência das pós-larvas mantidas nesta temperatura. Ainda assim, o último vestígio de alimento no trato digestório foi observado no 6º dpe, sendo que, no 14º dpe, foi registrado 100% de mortalidade, em um momento em que os indivíduos remanescentes encontravam-se no estágio de flexão da notocorda.

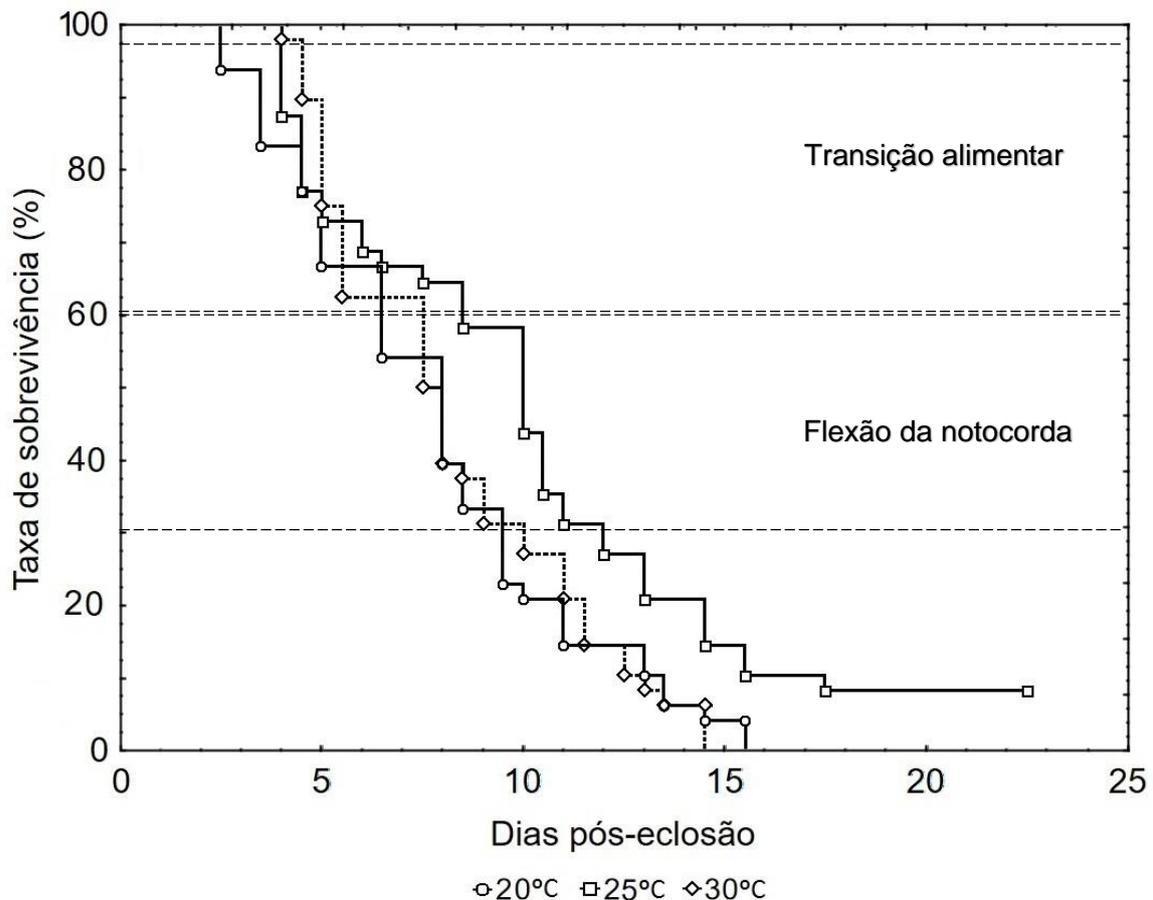


Figura 1.6 – Curva de sobrevivência dos exemplares de *Astyanax altiparanae*, avaliada desde o momento da eclosão até o término do período ontogenético inicial em três diferentes temperaturas, com destaque para os dois eventos mais críticos (denominados de transição alimentar e flexão da notocorda) na sobrevivência.

Como pode ser observado na (Tabela 1.4), de uma forma em geral, observou-se uma tendência de queda nas concentrações de oxigênio dissolvido e nos níveis de saturação de oxigênio, em relação aos valores quantificados na água usada para renovação dos poços de cultivo em todos os tratamentos experimentais.

A 20 °C durante o estágio larval-vitelino houve uma redução da alcalinidade da água dos poços de cultivo em relação a água de renovação. O pH, as concentrações de amônia total, de nitrito e de CO₂ não apresentaram diferença significativas (p<0,05) em relação à água utilizada na renovação dos poços.

A 25 °C houve diferenças significativas (p<0,05) nas concentrações dos compostos nitrogenados. Durante os estágios de pré-flexão, flexão e pós-flexão,

observou-se uma tendência de queda na alcalinidade em relação aos valores quantificados na água de reposição.

Tanto a 25°C quanto a 30°C, houve uma leve tendência de acidificação da água no decorrer do desenvolvimento larval e pós-larval, observando-se um aumento das concentrações de amônia, de nitrito, de dióxido de carbono e da alcalinidade da água. No tratamento mantido a 30°C não foram observadas diferenças significativas entre os parâmetros de qualidade da água avaliados antes e depois da renovação dos poços durante o estágio larval vitelino.

Tabela 1.4 – Parâmetros de qualidade da água analisados antes e depois da renovação da água das placas de cultivo celular de acordo com cada estágio de desenvolvimento de *Astyanax altiparanae* em diferentes temperaturas.

Temp. °C	Estágio		Parâmetro						
			pH	OD (mg.L-1)	OD (%)	N-AT (mg.L-1)	N-NO ²⁻	CO ₂ (mg.L-1 CaCO ₃)	Alcalinidade (mg.L-1)
20	Larval vitelino	Renovação	8,17 ^X (7,38-8,63)	7,81 ^{aY} (6,61-8,61)	95,60 ^a (75,40-102,30)	0,01 ^X (0,01-0,03)	0,01 (0,01-0,02)	0,43 ^Y (0,34-0,52)	68,40 ^a (46,80-81,00)
		Experimento	7,95 (7,54-8,10)	6,11 ^b (5,71-6,53)	71,70 ^{bA} (58,90-83,50)	0,04 (0,02-0,04)	0,02 (0,00-0,09)	0,38 (0,30-0,50)	30,80 ^b (16,20-50,20)
	Pré-flexão	Renovação	7,73 ^{aY} (7,46-8,15)	8,15 ^{aX} (7,68-8,60)	102,10 ^a (89,90-112,30)	0,02 ^{aY} (0,01-0,05)	0,02 ^a (0,01-0,03)	0,38 ^{aX} (0,32-0,45)	61,20 ^a (44,00-75,60)
		Experimento	6,77 ^b (6,34-8,04)	4,19 ^b (4,02-6,55)	62,65 ^{bB} (48,30-78,00)	0,06 ^b (0,03-0,08)	0,05 ^b (0,01-0,09)	0,60 ^b (0,45-0,71)	38,60 ^b (26,80-44,00)
25	Larval vitelino	Renovação	7,38	6,61	77,80 ^a	0,02 ^{aX}	0,01 ^a	0,44	50,60
		Experimento	7,63	5,71	58,90 ^b	0,05 ^{bB}	0,09 ^{bA}	0,45	50,20
	Pré-flexão	Renovação	7,52 (7,25-7,82)	6,71 ^{a*} (6,02-6,92)	85,90 ^a (72,10-90,50)	0,03 ^{aY} (0,02-0,04)	0,01 ^a (0,01-0,01)	0,50 ^a (0,27-0,57)	68,00 ^{aY} (55,60-82,80)
		Experimento	7,34 (5,58-7,68)	3,54 ^b (3,25-5,89)	47,90 ^b (44,60-63,70)	0,43 ^{bA} (0,06-0,48)	0,15 ^{bAB} (0,06-0,19)	1,04 ^{bA} (0,62-1,18)	27,80 ^{bA} (14,40-46,50)
	Flexão	Renovação	7,46 ^a (7,34-7,68)	6,41 ^a (6,31-6,52)	83,60 ^a (80,20-84,50)	0,02 ^{aXY} (0,02-0,03)	0,01 ^a (0,01-0,02)	0,42 ^a (0,31-0,56)	45,80 ^{aXY} (44,00-58,00)
		Experimento	6,70 ^b (6,61-6,74)	3,92 ^b (3,71-4,07)	49,06 ^b (45,70-50,10)	0,52 ^{bB} (0,51-0,54)	0,17 ^{bB} (0,14-0,18)	1,16 ^{bAB} (1,08-1,32)	38,20 ^{bAB} (36,00-41,00)
	Pós-flexão	Renovação	7,71 ^a (7,37-7,83)	6,49 ^a (6,02-7,05)	83,95 ^a (71,70-102,80)	0,02 ^{aX} (0,01-0,03)	0,01 ^a (0,01-0,02)	0,42 ^a (0,28-3,05)	53,00 ^{aX} (41,80-59,40)
		Experimento	6,77 ^b (5,76-7,05)	3,83 ^b (3,15-4,43)	47,00 ^b (43,80-56,60)	0,51 ^{bB} (0,44-0,73)	0,13 ^{bAB} (0,12-0,18)	1,63 ^{bB} (1,29-1,88)	40,60 ^{bB} (29,00-48,60)
30	Larval vitelino	Renovação	7,66	6,78	78,6	0,01	0,01	0,34	53,7
		Experimento	7,58	6,59	77,7	0,01	0,01	0,38	55,3

Temp. °C	Estágio	Parâmetro						
		pH	OD (mg.L-1)	OD (%)	N-AT (mg.L-1)	N-NO ²⁻	CO ₂ (mg.L-1 CaCO ₃)	Alcalinidade (mg.L-1)
Pré- flexão	Renovação	7,62 ^a (7,33-7,76)	6,53 ^a (6,25-6,62)	75,95 ^a (62,70-78,90)	0,01 ^a (0,01-0,02)	0,02 (0,01-0,02)	0,50 ^a (0,37-0,56)	64,80 (45,00-81,00)
	Experimento	7,29 ^b (7,10-7,66)	5,53 ^b (5,20-6,32)	42,75 ^b (59,90-74,20)	0,05 ^b (0,03-0,09)	0,03 (0,01-0,04)	1,01 ^b (0,60-1,18)	52,20 (39,60-55,80)
Flexão	Renovação	7,66 ^a (7,58-7,78)	6,58 ^a (6,44-6,62)	75,60 ^a (75,20-77,60)	0,02 ^a (0,01-0,02)	0,02 ^a (0,01-0,03)	0,50 ^a (0,31-0,52)	52,20 (41,40-63,00)
	Experimento	6,71 ^b (6,36-7,26)	4,88 ^b (4,11-5,37)	49,80 ^b (40,90-59,30)	0,08 ^b (0,06-0,09)	0,06 ^b (0,03-0,09)	1,30 ^b (1,02-1,50)	18,40 (14,40-55,80)

* Valores apresentados como mediana (mínima-máxima). Letras minúsculas (a,b) indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os parâmetros de qualidade de água medidos na “renovação” e “experimento” dos poços das placas de cultivo celular. Letras maiúsculas (A,B) indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os parâmetros mensurados na água de renovação a cada estágio de desenvolvimento larval. Letras maiúsculas (X,Y) indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os parâmetros mensurados na água do experimento em cada estágio de desenvolvimento larval.

1.4 DISCUSSÃO

A reprodução induzida por hormônios hipofisários, nas diferentes temperaturas aqui testadas, apresentou variações significativas nos resultados aqui obtidos, mas dentro dos padrões já encontrados para a espécie (Sato, Sampaio et al. 2006, Almeida 2007, Lopes 2011), que é entre 180 a 200 horas-grau para temperaturas medianas (entre 24 e 26°C). Ressalta-se também que a espécie tende a apresentar uma maior variabilidade genética se comparada a outros peixes utilizados frequentemente em bioensaios e muito mais “domesticados”, como é o caso do paulistinha (Zebra Fish) (Spence, Gerlach et al. 2008), por exemplo.

O tempo de incubação dos ovos apresentou resultados relativamente próximos aos relatados em estudos prévios realizados com *A. altiparanae*. Lopes (2011) obteve eclosões 17 hpi em ovos incubados a 26°C. Este valor foi aqui observado para ovos incubados a 30°C. Sato, Sampaio et al. (2006) obtiveram eclosão 18 hpi em temperatura de 23°C, valor próximo ao aqui registrados a 25°C.

Independentemente da temperatura testada, as larvas recém-eclodidas apresentaram padrões morfológicos altriciais, classificados por Fuiman and Werner (2009) como típicos de larvas pouco desenvolvidas. Apresentaram, ainda, características comuns para esse gênero e que já haviam sido reportadas para a própria espécie por Nakatani, Agostinho et al. (2001), como, por exemplo, a presença de pequenos pigmentos formados por cromatóforos dendríticos espalhados na região frontal do saco vitelínico e a presença da glândula adesiva.

O caractere morfológico mais evidente e diretamente afetado pela temperatura durante os primeiros momentos pós-eclosão foi o comprimento total. Mas, apesar de maiores, os indivíduos incubados e cultivados a 30°C eram também menos altos. Verreth (1994) postula que esse crescimento, denominado alométrico, pode se manifestar como um reflexo das mudanças hidrodinâmicas ambientais, neste caso, expressas pelas diferentes temperaturas testadas e também pelo estágio de desenvolvimento em que os peixes se encontravam. O estágio de pré-flexão, o mais longo entre todos os estágios de desenvolvimento larval e pós-larval de *A. altiparanae*, foi marcado como o período de maior

incremento na altura do corpo, o que de certa forma, reduziu, neste período, os graus de alometria observados.

Segundo Rebouças, de Lima et al. (2014), nas fases iniciais da sua ontogenia, os peixes são bastante suscetíveis aos mais variados agentes estressores, que podem, mesmo em baixa frequência ou intensidade, levar os exemplares à morte em poucos dias como aqui observado entre o 6^o a 7^o dpe para as pós-larvas que apresentavam qualquer tipo de malformação morfológica.

A existência de malformações larvais foi registrada exclusivamente nos exemplares testados a 20 e 30°C. A maioria das malformações foi identificada logo após a eclosão. Mas, em alguns indivíduos, como no tratamento a 30 °C elas se manifestaram somente após o 4^o dpe. Essas malformações, por sua vez, caracterizadas por deformações na notocorda e pela não abertura oral e anal, também foram descritas por Koumoundouros, Gagliardi et al. (1997), que identificaram pós-larvas de dourada *Sparus aurata* no estágio de pré-flexão apresentando desenvolvimento anormal, naquele apresentando alterações morfológicas significativas na região da nadadeira caudal.

Especificamente para algumas das larvas incubadas e mantidas a 30°C, as anomalias também foram evidenciadas por deformidades na região cardíaca, que provocavam edemas cardíacos. Incardona, Swarts et al. (2013) relatam que esse tipo de malformação é comum para indivíduos que são expostos a xenobiontes tóxicos. No presente caso, porém, os peixes não foram expostos a nenhum outro agente estressor que não a temperatura, o que indica que uma maior atividade metabólica, provocada pelo aumento da temperatura acima dos limites ótimos para a espécie pode também induzir ao aparecimento deste tipo de alteração.

Como bem documentado por Kamber (1992) e por Nunn, Tewson et al. (2012), o início do estágio de pré-flexão, que marca também o início da fase de alimentação exógena, é um dos pontos críticos (“endpoints”) para a sobrevivência de peixes. Mas, além dessa característica comum, observou-se, no presente caso, que há grandes diferenças individuais das pós-larvas em relação à sua capacidade de detecção, captura, ingestão e digestão do alimento, constantemente observado no momento em que houve o fornecimento de alimento, momento em que algumas pós-larvas se movimentavam com maior

intensidade assim que o alimento entrava em contato com a água e isso, em maior ou menor grau, foi observado em todas as temperaturas testadas. Complementarmente, quando essas particularidades individuais se somaram com a ocorrência de malformações, houve uma potencialização deste evento crítico para a sobrevivência de *A. altiparanae* relacionado à transição para a alimentação exógena. Ficou claro ainda que as anomalias observadas influenciaram de forma direta na mortalidade dos indivíduos que, muito provavelmente, apresentavam dificuldade de acesso ao alimento em função de suas restrições morfológicas. A mortalidade por inanição também foi reportada para pós-larvas de *Piaractus mesopotamicus* por Menossi, Takata et al. (2012), *Colossoma macropomum* por Pedreira, Schorer et al. (2015), afetando também a sobrevivência e desenvolvimento larval de *Lophiosilurus alexandri*, descrito por (López e Sampaio 2008), explicando a mortalidade de aproximadamente 98% do surubim *Steindachneridion melanodermatum*, por Feiden, Hayashi et al. (2006).

No decorrer de todo processo ontogênico pós-larval, independente da temperatura testada, observou-se uma contínua mortalidade dos exemplares. Isso seria naturalmente esperado pela própria dinâmica experimental, pois os indivíduos, em uma fase bastante frágil de sua vida, sofriam manipulação (e conseqüente estresse) diário. Ainda assim, ficou evidente que houve um segundo evento crítico, que coincidiu com o período em que ocorreram as bruscas metamorfoses da porção final da notocorda. Não há, porém, registros na literatura sobre a influência dessa metamorfose sobre a sobrevivência larval.

Outro fator a ser considerado, quando do uso de larvas e de pós-larvas de *A. altiparanae* como espécie modelo em experimentos laboratoriais diz respeito à deterioração da qualidade da água nas unidades experimentais.

Observou-se que praticamente não houve alterações nos padrões de qualidade da água (com destaque para o oxigênio dissolvido) nos tratamentos a 30°C durante o estágio larval-vitelino. Provavelmente, este resultado seja um reflexo de que a grande maioria das larvas permaneceu neste estágio por, no máximo, 12 hpe, tempo relativamente curto e muito inferior aos registrados nas duas outras temperaturas aqui avaliadas (48 e 24 hpe, respectivamente a 20 e 25°C).

A medida em que os indivíduos evoluem para os estágios subsequentes, eles passam a também alterar de forma mais significativa as variáveis determinantes da qualidade da água, principalmente em temperaturas mais elevadas, conseqüentemente aumentando a demanda por oxigênio (Ferreira, Barbosa et al. 2009), e pelo aumento da quantidade de resíduos metabólicos (principalmente compostos nitrogenados e CO₂) gerados (Orbe, Lima et al. 2003, Rosso, Bolner et al. 2006).

Contudo, ainda há poucas informações sobre os níveis críticos de cada um dos parâmetros de qualidade da água aqui registrados para fases iniciais de vida de *A. altiparanae*, o que não possibilita se descartar a hipótese de que, a qualidade do meio também tenha influenciado na mortalidade pós-larval. Caso a espécie venha, de fato, a se consolidar como modelo em estudos laboratoriais, o conhecimento sobre tais limites críticos precisa ser melhor investigado.

Ainda assim, animais mantidos a 25°C foram capazes de sobreviver (mesmo que em proporção relativamente baixa) por todo o período experimental, sendo capazes de se adaptar às intensas e inevitáveis manipulações a que foram submetidos durante o experimento; alimentar-se (o que pode ser constatado pela presença de resíduos alimentares ao longo do trato digestório durante praticamente todo o experimento); desenvolver adequadamente as suas estruturas morfológicas; e interferir, como seria esperado, nos parâmetros de qualidade de água. Os resultados aqui obtidos apontam a potencialidade do uso de larvas e pós-larvas do lambari-do-rabo-amarelo, *Astyanax altiparanae*, como animais modelo em ensaios laboratoriais realizados a 25°C.

REFERÊNCIAS

Almeida, R. (2007). "*Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) como modelo biológico de espécie de peixe para exploração zootécnica e biomanipulação." Botucatu. 103p.(Tese de Doutorado, Instituto de Biociência, UNESP). Disponível em: http://www.ibb.unesp.br/posgrad/teses/zoologia_do_2007_rodrigo_almeida.pdf Acesso em 13(10): 2011.

APHA (1995). Standard methods for the examination of water and wastewater: 4500-NH₃ Método fenol de determinação de Amônia Total. Washington, DC, USA.

APHA., A. P. H. A. (2005). "Standard methods for the examination of water and wastewater. Method 4500 F. 4-114." 21.

Aritaki, M. and T. Seikai (2004). "Temperature effects on early development and occurrence of metamorphosis-related morphological abnormalities in hatchery-reared brown sole *Pseudopleuronectes herzensteini*." *Aquaculture* 240(1): 517-530.

Azocar, C., G. Claramunt, F. Yañez and M. Futagawa (2014). "Efecto de la temperatura sobre el desarrollo embrionario y larval de *Graus nigra* (Kyphosidae) del norte de Chile." *Revista de biología marina y oceanografía* 49: 111-122.

Blaxter, J. (1991). "The effect of temperature on larval fishes." *Netherlands Journal of Zoology* 42(2): 336-357.

Chovanec, A., R. Hofer and F. Schiemer (2003). Chapter 18 Fish as bioindicators. Trace Metals and other Contaminants in the Environment. A. M. B. B.A. Markert and H. G. Zechmeister, Elsevier. Volume 6: 639-676.

Dal Pont, G. (2012). Toxicidade do óleo diesel para o peixe *Astyanax altiparanae*. Mestrado em Ciências Veterinárias Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná.

Feiden, A., C. Hayashi and W. R. Boscolo (2006). "Desenvolvimento de larvas de surubim-do-iguaçu (*Steindachneridion melanodermatum*) submetidas a diferentes dietas." *Revista Brasileira de Zootecnia* 35(6): 2203-2210.

Ferreira, P. d. M. F., J. M. Barbosa, E. L. Santos, M. R. Lima and J. Cabral (2009). "Efeito da temperatura sobre a taxa metabólica da carpa-comum *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758)." *Rev. Bras. Eng. Pesca* 4(2): 1-10.

Fuiman, L. A. and R. G. Werner (2009). *Fishery science: the unique contributions of early life stages*, John Wiley & Sons.

Garutti, V. (2003). *Piscicultura Ecológica*. São Paulo, SP, Fundação Editora da UNESP - FEU.

Incardona, J. P., T. L. Swarts, R. C. Edmunds, T. L. Linbo, A. Aquilina-Beck, C. A. Sloan, L. D. Gardner, B. A. Block and N. L. Scholz (2013). "Exxon Valdez to Deepwater Horizon: Comparable toxicity of both crude oils to fish early life stages." *Aquatic toxicology* 142: 303-316.

Kamber, E. (1992). "Early life history of fish: An energetic approach." Chapman and Hall. *Fish and Fisheries Series* 4: 167.

Klimogianni, A., G. Koumoundouros, P. Kaspiris and M. Kentouri (2004). "Effect of temperature on the egg and yolk-sac larval development of common pandora, *Pagellus erythrinus*." *Marine Biology* 145(5): 1015-1022.

Koumoundouros, G., F. Gagliardi, P. Divanach, C. Boglione, S. Cataudella and M. Kentouri (1997). "Normal and abnormal osteological development of caudal fin in *Sparus aurata* L. fry." *Aquaculture* 149(3-4): 215-226.

Laurence, G. (1975). "Laboratory growth and metabolism of the winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* from hatching through metamorphosis at three temperatures." *Marine Biology* 32(3): 223-229.

Lopes, M. C. (2011). DESOVA INDUZIDA E VIABILIDADE ECONÔMICA DA PRODUÇÃO DE PÓS-LARVAS E ALEVINOS DO LAMBARI-DA-MATA-ATLÂNTICA (*Deuterodon iguape* Eigenmann, 1907), Instituto de Pesca.

López, C. M. and E. V. Sampaio (2008). "Sobrevivência e crescimento larval do pacamã *Lophiosilurus alexandri* Steindachner 1876 (Siluriformes, Pimelodidae), em função de três densidades de estocagem em laboratório." *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 22: 491-494.

Menossi, O. C. C., R. Takata, M. I. Sánchez-Amaya, T. Mendes de Freitas, M. Yúfera and M. C. Portella (2012). "Crescimento e estruturas do sistema digestório de larvas de pacu alimentadas com dieta microencapsulada produzida experimentalmente."

Nakatani, K., A. A. Agostinho, G. Baumgartner, A. Bialecki, P. V. Sanches, M. C. Makrakis and C. S. Pavanelli (2001). *Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação*. Maringá/PR - Brasil, Editora da Universidade Estadual de Maringá.

Nogueira, D. J., S. C. d. Castro and O. R. d. Sá (2009). Utilização das brânquias de *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000) (Teleostei, Characidae) como biomarcador de poluição ambiental no reservatório UHE Furnas – MG. *Revista Brasileira de Zootecias*. Juiz de Fora, MG, Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora. 11 (3): 237-232.

Nunn, A., L. Tewson and I. Cowx (2012). "The foraging ecology of larval and juvenile fishes." *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 22(2): 377-408.

Orbe, R. A. I., C. A. R. M. A. Lima and L. de Carvalho Gomes (2003). "Excreção de amônia por tambaqui (*Colossoma macropomum*) de acordo com variações na temperatura da água e massa do peixe." *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 38(10): 1243-1247.

Ostrensky, A., A. S. Pedrazzani and A. L. Vicente (2015). "Use of MS- 222 (tricaine methanesulfonate) and propofol (2, 6- diisopropylphenol) as anaesthetics for the tetra *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae)." *Aquaculture Research*.

Pankhurst, N. W. and P. L. Munday (2011). "Effects of climate change on fish reproduction and early life history stages." *Marine and Freshwater Research* 62(9): 1015-1026.

Pedreira, M. M., M. Schorer and A. L. Ferreira (2015). "Use of different diets in first feeding of tambaqui larvae." *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal* 16(2): 440-448.

Pepin, P. (1991). "Effect of temperature and size on development, mortality, and survival rates of the pelagic early life history stages of marine fish." *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 48(3): 503-518.

Peretti, D. and I. Andrian (2008). "Feeding and morphological analysis of the digestive tract of four species of fish (*Astyanax altiparanae*, *Parauchenipterus galeatus*, *Serrasalmus marginatus* and *Hoplias aff. malabaricus*) from the upper Paraná River floodplain, Brazil." *Brazilian Journal of Biology* 68: 671-679.

Ramos, S., H. Cabral and M. Elliott (2015). "Do fish larvae have advantages over adults and other components for assessing estuarine ecological quality?" *Ecological Indicators* 55(0): 74-85.

Rebouças, P. M., L. R. de Lima, Í. F. Dias and J. A. D. Barbosa Filho (2014). "Influence of thermal oscillation on pisciculture water." *Journal of Animal Behaviour and Biometeorology* 2(2): 35-42.

Rombough, P. J. (1997). *The effects of temperature on embryonic and larval development. SEMINAR SERIES-SOCIETY FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY*, Cambridge University Press.

Rosso, F. L. d., K. Bolner and B. Baldisserotto (2006). "Ion fluxes in silver catfish (*Rhamdia quelen*) juveniles exposed to different dissolved oxygen levels." *Neotropical Ichthyology* 4(4): 435-440.

Ruaro, R., É. A. Gubiani, A. M. Cunico, Y. Moretto and P. A. Piana (2015). "Comparison of fish and macroinvertebrates as bioindicators of Neotropical streams." *Environmental Monitoring and Assessment* 188(1): 1-13.

Sato, Y., E. V. Sampaio, N. Fenerich-Verani and J. R. Verani (2006). "Biologia r Biologia reprodutiva e reprodução induzida de duas espécies de Char odução induzida de duas espécies de Char odução induzida de duas espécies de Characidae (Osteichth (Osteichthyes, Characiformes) da bacia do São F mes) da bacia do São Francisco, Minas Ger Minas Ger Minas Gerais, Brasil." *Revista Brasileira de Zoologia* 23(1): 267-273.

Siqueira-Silva, D. H., A. P. Santos Silva, A. Ninhaus-Silveira and R. Veríssimo-Silveira (2015). "The effects of temperature and busulfan (Myleran) on the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) spermatogenesis." *Theriogenology* 84(6): 1033-1042.

Spence, R., G. Gerlach, C. Lawrence and C. Smith (2008). "The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*." *Biological Reviews* 83(1): 13-34.

Verreth, J. (1994). "Nutrition and related ontogenetic aspects in larvae of the African catfish *Clarias gariepinus*."

Vicente, A. L. (2014). *Uso de óleos essenciais e de compostos sintéticos como agentes anestésicos para o lambari *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000), Universidade Federal do Paraná.*

CAPÍTULO 2. DESENVOLVIMENTO ONTOGENÉTICO LARVAL E PÓS-LARVAL DE *Astyanax altiparanae* (GARUTTI & BRITSKI, 2000) EM CONDIÇÕES LABORATORIAIS

RESUMO

O desenvolvimento ontogenético do lambari *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characidae) foi estudado em condições ambientais controladas. Larvas e pós-larvas, obtidas através de reprodução artificial, foram mantidas individualmente em placas de cultivo celular de 6 poços, alojadas em uma estufa vertical, em temperatura mantida a 25°C e fotoperíodo de 12 h luz/12 h escuro. Diariamente foram realizadas observações e medições morfométricas. As larvas eclodiram com $3,02 \pm 0,34$ mm (média \pm desvio padrão) de comprimento total (CT); sem pigmentação e com $0,06 \pm 0,02$ mm³ de reserva vitelínica. O período larval vitelino estendeu-se durante as primeiras 26 horas pós-eclosão (hpe) e durante este período teve início o processo de pigmentação dos olhos, o surgimento do tubo digestório, abertura anal e os animais passaram a apresentar movimentação constante. Com o inflamento da bexiga natatória tem início o estágio de pré-flexão, que se estendeu por até 230 hpe. Durante este estágio, foi observada a transição entre a alimentação endógena e a exógena, sendo a reserva vitelínica totalmente absorvida após 74 hpe (com os animais atingindo $4,17 \pm 0,36$ mm de CT). Após esse período, teve início o estágio de flexão da parte final da notocorda e da estruturação da nadadeira caudal (11 e 13 dias após a eclosão – dpe). Por fim, no último estágio de desenvolvimento larval (pós-flexão), foi observada a segmentação completa dos raios das nadadeiras e o início do aparecimento das escamas (animais com $5,97 \pm 0,65$ de CT). O desenvolvimento ontogenético larval de *A. altiparanae* foi concluído após 22 dpe.

Palavras chave: bexiga natatória, estágio larval, morfometria, notocorda.

2.1 INTRODUÇÃO

Embriões e larvas são os estágios de vida de peixes mais vulneráveis às variações das condições ambientais, sendo afetados até mesmo por eventos de baixa intensidade e de curta duração (Ramos, Cabral et al. 2015). Por isso, estudos envolvendo o desenvolvimento pós-eclosão de peixes costumam ser utilizados na avaliação dos efeitos dos mais diversos xenobiontes sobre a qualidade do meio aquático (McKim 1977, Meier, Craig Morton et al. 2010), como metais pesados (Sfakianakis, Renieri et al. 2015), prata (Barrera 2013) e derivados de petróleo (Lema, Schultz et al. 2007, Ingvarsdóttir, Bjørkblom et al. 2012).

Em função da grande diversidade de espécies e também de fatores como o tipo de alimento disponível e as variáveis ambientais locais e regionais, a

duração do estágio larval de um peixe pode se estender por dias ou até meses. Durante este período, as larvas passam por profundas alterações morfológicas e celulares (Zambonino Infante and Cahu 2001), ocorrendo, na maioria dos casos, transformações significativas de órgãos e sistemas (Brown and Núñez 1994).

Durante o desenvolvimento ontogenético inicial, diversos processos metamórficos provocam não apenas diferenciações estruturais, mas também definem as características alimentares e reprodutivas de cada espécie, e, aliado a possíveis limitações fisiológicas das larvas, podem acarretar em altas taxas de mortalidade já nas primeiras horas de vida (Nakatani, Agostinho et al. 2001, Russo, Scardi et al. 2014). O tamanho da boca, por exemplo, acaba sendo um fator limitante para o desenvolvimento dos indivíduos, visto que restringe o número e o tamanho de presas capturadas (Govoni, Boehlert et al. 1986, Nunn, Tewson et al. 2012).

Porém, a utilização de indicadores morfométricos, como comprimento e peso, não evidenciam obrigatoriamente as relações ocorridas durante o desenvolvimento larval (MACIEL 2006). De acordo com Gisbert, Asgari et al. (2014), as diferentes mudanças morfométricas relacionadas ao desenvolvimento alométrico ou isométrico de cada região do corpo, bem como na movimentação e alimentação larval, são parâmetros que possibilitam uma melhor análise da ontogenia inicial de peixes, fornecendo informações mais precisas sobre o desenvolvimento normal da espécie estudada.

Este trabalho tem como objetivo descrever os processos morfológicos, avaliando e identificando individualmente larvas e pós-larvas do lambari *A. altiparanae*, enfatizando características peculiares ocorridas desde o momento da eclosão até o final do período de desenvolvimento inicial, visando a utilização futura da espécie como modelo a ser empregado em ensaios e estudos laboratoriais diversos.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Pesquisa com Organismos Aquáticos (LAPOA), do Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais

(GIA), localizado no Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Brasil.

2.2.1 MANEJO DE REPRODUTORES

Os exemplares de *Astyanax altiparanae* utilizados no processo de reprodução induzida foram selecionados com base nos caracteres sexuais secundários dos animais. Os machos através de análise da textura da nadadeira anal (presença de espículas) e as fêmeas pela coloração avermelhada do poro urogenital e pelo ventre abaulado.

Os animais foram retirados de um tanque de manutenção de reprodutores, onde foram submetidos a um regime prévio de restrição alimentar por 24 horas. O sistema de manutenção dos reprodutores era composto por um tanque de polietileno (1000 L), conectado a um filtro mecânico e biológico externo, mantido a 25°C através do uso de três aquecedores de 300 watts, controlados por termostato digital (BOYU, Taiwan). Nesses tanques eram mantidos 200 animais em idade reprodutiva. Os reprodutores foram capturados com auxílio de um puçá, anestesiados, segundo a metodologia proposta por Vicente (2014), com 35 $\mu\text{L.L}^{-1}$ de solução de óleo essencial de cravo (10%), até atingirem o estágio IV de anestesia cirúrgica.

Os animais foram então pesados individualmente em balança digital (Shimadzu-AUY220, Japão) e mensurados com paquímetro manual (Vonder-200mm/0,05mm, Brasil). Após a avaliação morfométrica, foram selecionadas 3 fêmeas, com peso médio de $24,06 \pm 1,37$ g (média \pm desvio padrão) e comprimento total de $9,9 \pm 1,0$ cm; e 9 machos, com peso médio de $5,20 \pm 1,99$ g e comprimento total médio de $8,4 \pm 0,3$ cm.

Após essa seleção, os reprodutores foram alojados em sistema de maturação final composto por um tanque de polietileno de 100 L, ligado, através de uma bomba submersa (SB-2000, Sarlobetter, Brasil), a filtros mecânicos e biológicos, com aeração constante e temperatura mantida em 25°C, através do uso de um sistema de aquecimento composto por um aquecedor de 300 watts, controlado por um termostato digital (BOYU, Taiwan).

Durante os 10 dias que permaneceram neste sistema, os animais foram alimentados duas vezes ao dia (08:00 e 18:00 horas), com ração comercial

extrusada (Kowalski, Brasil) contendo 45% de proteína bruta e 4% de extrato etéreo.

2.2.2 INDUÇÃO HORMONAL

Para indução hormonal foi utilizado extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC), provenientes da piscicultura MOANA Aquacultura (Cananéia, Brasil). O hormônio foi ministrado, através de injeção com seringa graduada (0,3 mL/cc) na base inferior da nadadeira peitoral, em um ângulo de 45°, em doses únicas de 5,0 mg/kg de EBHC para as fêmeas e de 1,0 mg/kg de EBHC para os machos. A Unidade Térmica Acumulada (UTA) foi calculada a partir do momento da aplicação do hormônio nos animais, ficando entre 190-200 horas-grau.

2.2.3 DESOVAS

Após o procedimento de indução hormonal, todos os reprodutores foram acondicionados em um tanque-rede com dimensões de 25 x 15 x 15 cm (comprimento, largura e altura, respectivamente), confeccionado com rede de *nylon* trançada de 3 mm e malha de 1,5 x 1,5 cm, mantido, por sua vez, em um tanque de polietileno de 100 L, em temperatura controlada de 25°C com o uso de um aquecedor de 300 watts (BOYU, Taiwan). O tanque era ainda ligado a um sistema de filtração física e biológica externo, de 60 L. Os animais foram mantidos nesse local até a liberação e posterior fertilização dos ovócitos.

Imediatamente após a desova, os ovos foram removidos por sifonagem, retidos em uma peneira de malha de 0,5 mm, lavados em água corrente. Em seguida, foram coletados com uma pipeta de Pasteur e analisados em microscópio óptico Leica® DMLS, adaptados com câmera digital Dino-Eye (AM-423X, Taiwan) e transferidos para 8 placas de cultivo celular de 6 poços cada com tampa (KASVI K12-006, China), de volume unitário de 17 ml, sendo acondicionado um ovo fecundado por poço. As placas foram mantidas em incubadora vertical tipo BOD Microprocessada (ADAMO, Brasil), com fotoperíodo ajustado para 12 h luz: 12 h escuro e mantida em 25°C.

2.2.4 TERMINOLOGIA ADOTADA

Os registros morfométricos foram obtidos com auxílio de um estereomicroscópio Leica® MZ6, com aumento de 0,63x e 0,8x, adaptado com câmera Dino-Eye (AM-423X, Taiwan). O desenvolvimento larval e também a contagem de batimentos cardíacos foram caracterizados através de registros diários, realizados com auxílio de microscópio óptico Leica® DMLS, sendo realizada a diferenciação dos estágios de desenvolvimento larval, conforme descrito por Nakatani, Agostinho et al. (2001), com modificações (Tabela 2.5).

Dentre as fases de desenvolvimento larval, a terminologia aplicada para “larva” foi definida para fase na qual os animais não possuem ainda bexiga natatória inflada e “pós-larva” para os períodos subsequentes. A cronologia evolutiva foi descrita em horas-grau (HG), unidade térmica acumulada (UTA), horas após indução (hpi), minutos pós-eclosão (mpf), horas pós-eclosão (hpe) e dias pós-eclosão (dpe).

Tabela 2.1 – Descrição dos estágios de desenvolvimento de *Astyanax altiparanae*, compreendidos desde a eclosão até o término do período de desenvolvimento inicial.

Estágio	Descrição
Larval vitelino	Desde o momento da eclosão até o início do desenvolvimento do tubo digestório, caracterizado pela abertura da cavidade oral e anal e pelo aparecimento da bexiga natatória;
Pré-flexão	Estágio compreendido desde o aparecimento da bexiga natatória até o início do dobramento distal da notocorda. Também caracterizado pelo início da segmentação dos raios das nadadeiras peitorais e anal;
Flexão	Desenvolvimento dos raios das nadadeiras dorsal e caudal e completa flexão da porção distal da notocorda;
Pós-flexão	Caracterizado pela completa segmentação dos raios das nadadeiras anal, dorsal, caudal e início do desenvolvimento de escamas.

2.2.5 MORFOMETRIA

Foram realizadas análises morfométricas e observações gerais em intervalos regulares de 60 min, desde a eclosão até a absorção completa da reserva vitelínica; a cada 12 horas, a partir do momento em que houve completa absorção da reserva vitelínica até a flexão total da notocorda; e a cada 24 h, desde este ponto até o final do período de desenvolvimento inicial.

Para realização das análises, as placas de cultivo eram retiradas individualmente da incubadora. Cada poço era então sifonado em 3/4 do seu volume, com auxílio de uma pipeta de Pasteur e, em seguida, os animais eram observados individualmente (dentro dos próprios poços) com auxílio de estereomicroscópio.

Foram mensurados o comprimento total (CT), a altura do corpo (HC1), o comprimento da cabeça (CC), a altura da cabeça (HC2), o diâmetro dos olhos (DO), o comprimento do saco vitelínico (CV), a altura do saco vitelínico (HV) e o volume da reserva vitelínica (V), calculado de acordo com a equação:

$$V (mm^3) = \frac{(\pi \cdot CV \cdot HV^2)}{6}$$

Ao término das observações, o volume original de água em cada poço era renovado e as placas eram novamente tampadas, realojadas na incubadora e mantidas até o período subsequente de observação. Para maior controle da temperatura, a sala onde as análises eram realizadas era também mantida a 25°C.

2.2.6 MORFOLOGIA

Os animais foram analisados sob microscópio óptico (4x) e tiveram suas variáveis morfológicas registradas com base ao desenvolvimento das suas estruturas internas e externas. A descrição foi realizada a partir do primeiro animal em que determinada estrutura era observada. Já o intervalo de desenvolvimento foi definido com base no momento em que todos os outros animais remanescentes tivessem completado o desenvolvimento da mesma estrutura observada.

2.2.7 ALIMENTAÇÃO PÓS-LARVAL

Quando 50% dos animais já haviam absorvido sua reserva vitelínica por completo, passava a se ofertar a todos os animais do experimento ração microencapsulada (American B.P., EUA), contendo 46% de PB. Isso era feito pesando-se 0,1g de ração em balança de precisão (Shimadzu-AUY220, Japão) e, em seguida, dissolvendo-se essa quantidade em 40 ml de água. Com auxílio de uma pipeta de Pasteur, uma gota dessa suspensão era fornecida para cada larva todos os dias às 18:00 horas.

2.2.8 QUALIDADE DA ÁGUA

A água utilizada para a renovação diária dos poços de cultivo era retirada de um reservatório de água de polietileno (1000 L), acoplado a um filtro biológico e mecânico do tipo *air lift*, sendo a mesma filtrada em saco bag (45µm), clorada e neutralizada com tiosulfato de sódio. Antes de ser usada, a água era mantida em incubadora para que atingisse 25°C.

Os seguintes parâmetros físico-químicos da água eram analisados diariamente: pH, através de peagâmetro digital (AZ-86505, Taiwan); oxigênio dissolvido (OD) e percentual de saturação de oxigênio (%OD), por meio de oxímetro digital (YSI Pro20, EUA); alcalinidade e concentração de dióxido de carbono (CO₂) mensurada por titulometria com hidróxido de sódio 0,02N (APHA, 2005a); concentração de nitrogênio na forma de amônia total [N-AT= NH₃+NH₄⁺] obtida pelo método do indofenol (APHA. 2005) e nitrito (APHA 1995). As análises colorimétricas eram realizadas em espectrofotômetro de bancada (Spectronic 20 Genesys, EUA). Em função dos reduzidos volumes, a água sifonada dos poços era concentrada em um béquer e analisada na forma de uma amostra única.

2.2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O banco de dados foi gerado e organizado através do uso dos *softwares* Excel[®] e Access[®] Microsoft Office Professional Plus 2013. Os dados de qualidade da água foram analisados através do teste de normalidade de Shapiro-Wilk, seguido pelo teste U de Mann-Whitney. Os dados biométricos foram comparados através de estatística descritiva. A sobrevivência foi analisada pela

curva de Kaplan-Meier. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o *software* Statsoft Statistica^{MR} versão 10.0[®].

2.3 RESULTADOS

2.3.1 DESENVOLVIMENTO LARVAL VITELINO

Assim que eclodem, as larvas de *A. altiparanae* possuem cabeça aderida à região anterior do saco vitelínico, postura distendida e ausência de nadadeiras. Algumas larvas eclodem sem pigmentação e outras apresentam pigmentação na borda do saco vitelínico. Neste momento, todas apresentam membrana embrionária e trato digestório rudimentar, sem abertura anal. Já nas primeiras horas pós-eclosão, inicia-se a pigmentação dos olhos e ocorre grande desenvolvimento da membrana na nadadeira embrionária.

A cabeça pode ser observada em três posições distintas no decorrer deste estágio larval. Inicialmente, ela encontra-se colada ao saco vitelino, separada pelo espaço perivitelínico. Cerca de 10 a 12 hpe a cabeça assume posição semiterminal e, 20 horas depois, posição terminal. No decorrer do desenvolvimento, a boca também sofre transformação significativa, passando de uma posição ventral para terminal.

A fase larval vitelínica (Figura 2.7) foi a mais rápida dentre as fases de desenvolvimento corporal, durando entre 18 e 26 hpe (Tabela 2.6). Essa fase termina no momento em que a bexiga natatória, localizada acima do trato digestório e abaixo do segmento notocordal, torna-se funcional.

O tamanho das larvas pós-eclosão variou de 2,28 a 3,31 mm. Já na segunda hora de vida foi possível notar o início da pigmentação da região frontal do saco vitelino e dos olhos, além do aumento considerável da membrana embrionária caudal. Entre 5 a 7 hpe, o comprimento total era de $2,99 \pm 0,31$ mm (média \pm desvio padrão), sendo possível identificar o tubo digestório, de formato morfológico reto, bem como a abertura anal.

Tabela 2.2 – Morfometria dos parâmetros avaliados durante o período de desenvolvimento larval vitelino de *Astyanax altiparanae*, em temperatura de 25°C.

Parâmetros (mm)	Morfometria		Coeficiente de Variação
	$x \pm dp^*$	Amplitude	
Comprimento total	2,95 ± 0,28	2,28-3,36	9,32
Altura do corpo	0,19 ± 0,04	0,08-0,26	19,76
Comprimento da cabeça	0,53 ± 0,09	0,30-0,66	15,90
Altura da cabeça	0,32 ± 0,05	0,17-0,40	15,14
Diâmetro do olho	0,14 ± 0,03	0,09-0,22	19,65
Comprimento do vitelo	0,69 ± 0,06	0,48-0,79	8,29
Altura do vitelo	0,40 ± 0,06	0,21-0,54	14,57
Volume do vitelo	0,06 ± 0,02	0,01-0,12	30,67
Miômeros pré-anal	13 ± 3,59	9 – 17	28,16
Miômeros pós-anal	11 ± 4,05	6 – 15	18,96
Total de Miômeros	23 ± 8,48	10 - 32	25,48

*Valores apresentados como média e desvio padrão (n=48).

O sangue começou a apresentar pigmentação entre 3 a 4 hpe e, a partir disso, foi possível observar claramente o fluxo sanguíneo irrigando as demais estruturas corporais. Esse fluxo sanguíneo foi observado irrigando a glândula adesiva até 26 hpe. Após 98 hpe (pré-flexão), a glândula, localizada originalmente na região superior frontal da cabeça das larvas, não foi mais observada.



Figura 2.1- Desenvolvimento de *Astyanax altiparanae* durante o período larval vitelínico: Larva recém eclodida (1), apresentando glândula adesiva (a), olhos com pouca pigmentação (b), vesícula óptica (c) e sem abertura anal (d); (2) maior pigmentação dos olhos (e), maior pigmentação da reserva vitelínica (f) e botão da nadadeira peitoral (g); (3) boca na posição ventral (h), maior desenvolvimento da vesícula óptica (i) e pigmentação do coração (j); (4) olhos pigmentados (k) e bexiga natatória (L).

2.3.2 PRÉ-FLEXÃO

Após se inflar de ar, a bexiga natatória, juntamente com as estruturas natatórias (nadadeira caudal e peitorais), passa a dar suporte para a constante movimentação pós-larval. Nesta fase (sintetizada na Tabela 2.7), foi observada uma maior pigmentação dos animais, principalmente dos olhos, que ficaram totalmente escuros após 32 hpe.

O desenvolvimento dos quatro arcos branquiais ocorre rapidamente algumas horas depois. A movimentação do opérculo, as constantes

movimentações das nadadeiras peitorais e o fluxo sanguíneo passam a ocorrer de forma sincronizada com os batimentos cardíacos.

Tabela 2.3 - Morfometria dos parâmetros avaliados durante o período de pré-flexão (entre hpe) de *Astyanax altiparanae*.

Parâmetros (mm)	Morfometria		Coeficiente de Variação
	$x \pm dp^*$	Amplitude	
Comprimento total	3,65 \pm 0,52	2,39-4,88	13,89
Altura do corpo	0,43 \pm 0,16	0,14-0,89	37,91
Comprimento da cabeça	0,59 \pm 0,10	0,33-0,91	16,45
Altura da cabeça	0,38 \pm 0,07	0,22-0,67	17,77
Diâmetro do olho	0,20 \pm 0,06	0,12-0,47	28,11
Comprimento do vitelo	0,39 \pm 0,28	0,00-0,75	72,44
Altura do vitelo	0,18 \pm 0,15	0,00-0,52	79,87
Volume do vitelo	0,02 \pm 0,02	0,00-0,10	113,58
Miômeros pré-anal	17 \pm 1,11	15-19	7,07
Miômeros pós-anal	16 \pm 1,21	13-19	8,18
Total de miômeros	33 \pm 2,30	18-38	7,54
Raios das nadadeiras peitorais	12 \pm 3,44	10-13	7,42
Raio da nadadeira caudal	16 \pm 1,86	15-19	3,27

*x: média. dp: desvio padrão.

Este foi o momento mais crítico para a sobrevivência dos animais, pois ocorreram bruscas mudanças morfofisiológicas para algumas pós-larvas (Tabela 2.8), principalmente para aquelas cuja reserva vitelínica já havia se esgotado (74 hpe) e ainda não apresentavam alimento no tubo digestório (86 hpe).

Tabela 2.4 – Principais eventos morfológicos ocorridos desde a eclosão até a absorção completa da reserva vitelínica do lambari *Astyanax altiparanae*, durante acompanhamento individual à temperatura de 25° C, evidenciando a cronologia em horas pós-eclosão (hpe) e unidade térmica acumulada (UTA).

Tempo* (mpf)	Cronologia evolutiva		Fase Larval	Tamanho** (mm)	Desenvolvimento observado
	hpe	UTA			
80 - 120	1 - 2	25 - 50	Larval vitelino	2,99 ± 0,32	Início da pigmentação dos olhos
120 - 240	3 - 4	74 - 100	Larval vitelino	2,99 ± 0,24	Início da pigmentação do sangue
300 - 360	5 - 6	125 - 150	Larval vitelino	3,00 ± 0,24	Formação do tubo digestório
300 - 420	5 - 7	125 - 175	Larval vitelino	3,00 ± 0,24	Abertura da cavidade anal
360 - 420	6 - 7	150 - 175	Larval vitelino	3,00 ± 0,24	Visualização de um arco branquial
480 - 600	8 - 10	200 - 250	Larval vitelino	3,01 ± 0,32	Cabeça desprende do vitelo
660 - 720	11 - 12	275 - 300	Larval vitelino	3,03 ± 0,31	Cabeça na posição semiterminal
1140 - 1200	19 - 20	475 - 500	Larval vitelino	3,05 ± 0,31	Boca na posição terminal
1380 - 1440	23 - 24	575 - 600	Larval vitelino	3,07 ± 0,31	Nadadeiras peitorais desenvolvidas
1080 - 1560	18 - 26	450 - 650	Larval vitelino	3,04 ± 0,28	Bexiga natatória inflada
1200 - 1560	20 - 26	500 - 650	Larval vitelino	3,05 ± 0,29	Desenvolvimento da mandíbula
1800 - 1920	30 - 32	750 - 800	Pré-flexão	3,11 ± 0,29	Cabeça na posição terminal
1860 - 1920	31 - 32	775 - 800	Pré-flexão	3,12 ± 0,30	Pupila dos olhos totalmente pigmentadas
1920 - 1980	32 - 33	800 - 825	Pré-flexão	3,13 ± 0,30	Formação completa dos arcos branquiais
2280 - 2460	38 - 41	950 - 1025	Pré-flexão	3,29 ± 0,29	Enovelamento do intestino
2580 - 2700	43 - 45	1075 - 1125	Pré-flexão	3,42 ± 0,30	Aparecimento da faringe e do esôfago
3300 - 4440	55 - 74	1375 - 1850	Pré-flexão	3,92 ± 0,32	Absorção completa da reserva vitelínica
3720 - 5160	62 - 86	1550 - 2150	Pré-flexão	4,02 ± 0,30	Primeiro alimento no tubo digestório
5160 - 5880	86 - 98	2150 - 2450	Pré-flexão	4,16 ± 0,33	Desaparecimento da glândula adesiva

*Tempo apresentados como mínimo-máximo observado;

**Valores apresentados como média e desvio padrão.

Ao longo deste estágio houve um aumento da pigmentação corporal. Os animais passaram a apresentar maior quantidade de cromatóforos dendríticos, distribuídos, em sua maioria, horizontalmente acima da notocorda, além de cromatóforos puntiformes, distribuídos principalmente na região superior da cabeça. O momento-chave da transição para a fase subsequente é o início do dobramento da porção distal da notocorda, mais precisamente na base da nadadeira caudal.

2.3.3 FLEXÃO

Durante a flexão, observa-se a completa pigmentação dos olhos (retina). Havia, em média, 30 miômeros no início do estágio de flexão. O corpo apresentava-se mais pigmentado (coloração marrom escura) em relação à fase anterior. Durante este período ocorreu a estruturação dos raios da nadadeira anal, em processo simultâneo ao dobramento da porção distal da notocorda, formando um ângulo de 45° (Tabela 2.9).

Tabela 2.5 - Morfometria dos parâmetros avaliados durante o período de flexão da notocorda de *Astyanax altiparanae*.

Parâmetros (mm)	Morfometria		Coeficiente de Variação
	x ± dp*	Amplitude	
Comprimento total	4,93 ± 0,22	4,45-5,23	3,81
Altura do corpo	0,88 ± 0,07	0,73-1,01	7,19
Comprimento da cabeça	0,91 ± 0,10	0,67-1,03	9,45
Altura da cabeça	0,70 ± 0,06	0,57-0,81	8,13
Diâmetro do olho	0,48 ± 0,05	0,38-0,58	9,18
Miômeros pré-anal	15 ± 1,056	13-17	5,43
Miômeros pós-anal	14 ± 0,79	13-16	4,33
Total de miômeros	30 ± 4,93	14-32	13,54
Raios das nadadeiras peitorais	13 ± 0,54	11-13	7,81
Raios da nadadeira anal	21 ± 1,49	15-21	15,24
Raios da nadadeira caudal	21 ± 1,35	15-21	13,60
Raios da nadadeira dorsal	8 ± 0,28	7-11	6,89

* X: média. dp: desvio padrão.

Ao término da flexão da notocorda, observou-se a presença de 7-11 (mínimo-máximo) raios na região superior e 8-18 raios na região inferior da nadadeira caudal.

2.3.4 PÓS-FLEXÃO

Durante a pós-flexão (Tabela 2.10), há um aumento da pigmentação da face lateral da cabeça e do tronco. No opérculo, pode ser observada uma grande quantidade de cromatóforos. A bexiga natatória apresenta-se com dois compartimentos. Com auxílio da microscopia in vivo, foi possível observar a presença de alimento nas dobras intestinais. Essa identificação visual do alimento só foi possível até o início da pós-flexão, pois no decorrer deste estágio, o corpo passa a ser opaco, não sendo mais possível diferenciar os órgãos internos dos animais.

Os primeiros indícios de escamas surgiram em 17 dpe. Inicialmente, elas se concentraram na porção ventral, ao longo da extensão da bexiga natatória, e de estruturas do trato digestório e do opérculo. Não foram observados miômeros nesta fase.

Tabela 2.6 - Morfometria (em mm) dos parâmetros avaliados durante o estágio de desenvolvimento pós-flexão do *Astyanax altiparanae*.

Parâmetros (mm)	Morfometria		Coeficiente de Variação
	$x \pm dp^*$	Amplitude	
Comprimento total	5,68 \pm 0,45	4,98-6,28	6,66
Altura do corpo	1,01 \pm 0,08	0,82-1,12	6,88
Comprimento da cabeça	1,03 \pm 0,08	0,81-1,11	6,56
Altura da cabeça	0,82 \pm 0,07	0,65-0,89	7,56
Diâmetro do olho	0,57 \pm 0,06	0,43-0,66	9,33
Raios das nadadeiras peitorais	13 \pm 1,86	12-13	3,92
Raios da nadadeira anal	21 \pm 6,45	17-21	9,36
Raios da nadadeira caudal	23 \pm 3,04	21-23	3,71
Raios da nadadeira dorsal	11 \pm 1,86	10-11	4,65

*X: média. dp: desvio padrão.

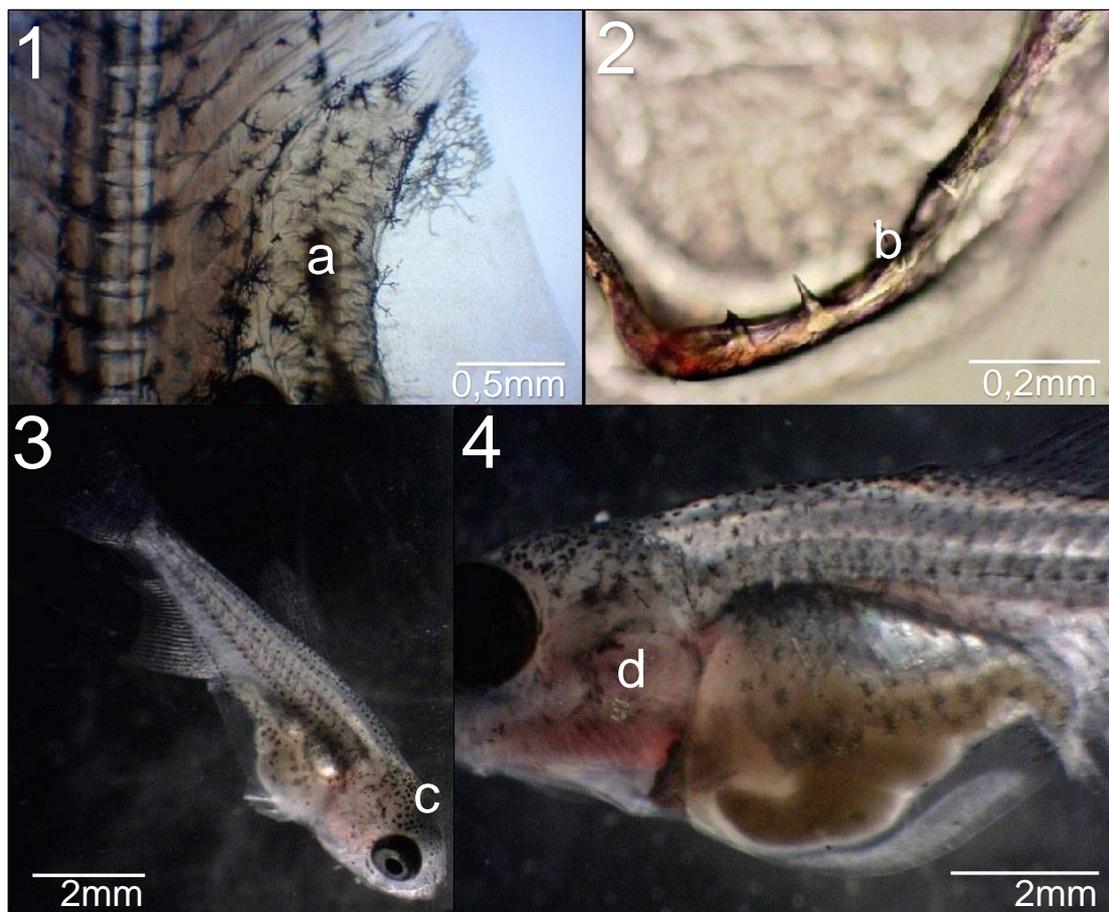


Figura 2.2 – Exemplos de *Astyanax altiparanae* no estágio final do desenvolvimento ontogenético larval: (1) presença de alimento dentro do tubo digestório (a); (2) dentes (b); (3) pigmentação puntiforme na região dorsal da cabeça (c); (4) escamas (d).

2.3.5 QUALIDADE DA ÁGUA NO SISTEMA EXPERIMENTAL

Tabela 2.7 – Parâmetros de qualidade da água medidos em cada estágio do desenvolvimento de *A. altiparanae* em sistema de placas de cultivo celular, antes e depois da renovação de água.

Estágio		Parâmetro						
		pH	OD (mg.L ⁻¹)	OD (% Sat.)	N-AT (mg.L ⁻¹)	N-NO ₂ ⁻ (mg.L ⁻¹)	CO ₂ (mg.L ⁻¹ CaCO ₃)	Alcalinidade (mg.L ⁻¹)
Larval vitelino	Antes	7,38	6,61	77,80	0,02	0,01	0,44	50,60
	Depois	7,63	5,71	58,90	0,05	0,09	0,45	50,20
Pré-flexão	Antes	7,52 (7,25-7,82)	6,71 ^{a*} (6,02-6,92)	85,90 ^a (72,10-90,50)	0,03 ^{aY} (0,02-0,04)	0,01 ^a (0,01-0,01)	0,50 ^a (0,27-0,57)	68,00 ^{aY} (55,60-82,80)
	Depois	7,34 (5,58-7,68)	3,54 ^b (3,25-5,89)	47,90 ^b (44,60-63,70)	0,43 ^{bA} (0,06-0,48)	0,15 ^b (0,06-0,19)	1,04 ^{bA} (0,62-1,18)	27,80 ^{bA} (14,40-46,50)
Flexão	Antes	7,46 ^a (7,34-7,68)	6,41 ^a (6,31-6,52)	83,60 ^a (80,20-84,50)	0,02 ^{aXY} (0,02-0,03)	0,01 ^a (0,01-0,02)	0,42 ^a (0,31-0,56)	45,80 ^{aXY} (44,00-58,00)
	Depois	6,70 ^b (6,61-6,74)	3,92 ^b (3,71-4,07)	49,06 ^b (45,70-50,10)	0,52 ^{bB} (0,51-0,54)	0,17 ^b (0,14-0,18)	1,16 ^{bAB} (1,08-1,32)	38,20 ^{bAB} (36,00-41,00)
Pós-flexão	Antes	7,71 ^a (7,37-7,83)	6,49 ^a (6,02-7,05)	83,95 ^a (71,70-102,80)	0,02 ^{aX} (0,01-0,03)	0,01 ^a (0,01-0,02)	0,42 ^a (0,28-3,05)	53,00 ^{aX} (41,80-59,40)
	Depois	6,77 ^b (5,76-7,05)	3,83 ^b (3,15-4,43)	47,00 ^b (43,80-56,60)	0,51 ^{bB} (0,44-0,73)	0,13 ^b (0,12-0,18)	1,63 ^{bB} (1,29-1,88)	40,60 ^{bB} (29,00-48,60)

* Valores apresentados como mediana (min-máx). Letras minúsculas indicam diferenças significativas (p<0,05) entre os parâmetros de qualidade de água medidos antes e depois da renovação em cada um dos estágios de desenvolvimento. Letras maiúsculas indicam diferenças significativas (p<0,05) entre os estágios: YX – Indicam diferenças significativas entre as águas usadas para renovação nas placas de cultivo (Antes), AB - Indicam diferenças significativas entre as águas nas placas de cultivo ao longo de cada estágio (Depois).

No estágio de desenvolvimento larval vitelino, nenhum parâmetro de qualidade da água apresentou diferença em relação aos da água utilizada na renovação dos poços ($p > 0,05$). Durante o estágio de pré-flexão observou-se uma tendência de queda nas concentrações de oxigênio dissolvido, saturação de oxigênio e alcalinidade em relação aos valores identificados na água de reposição. O pH apresentou ligeira acidificação em relação à água de manutenção nos estágios de flexão e pós-flexão. Já em relação às análises de amônia total, nitrito e CO_2 , observou-se um aumento significativo dos valores observados depois da renovação da água. Ao decorrer dos estágios larvais, observou-se uma tendência das concentrações de amônia, dióxido de carbono e da alcalinidade. Os demais parâmetros não apresentaram relação com o desenvolvimento larval.

2.3.6 SOBREVIVÊNCIA

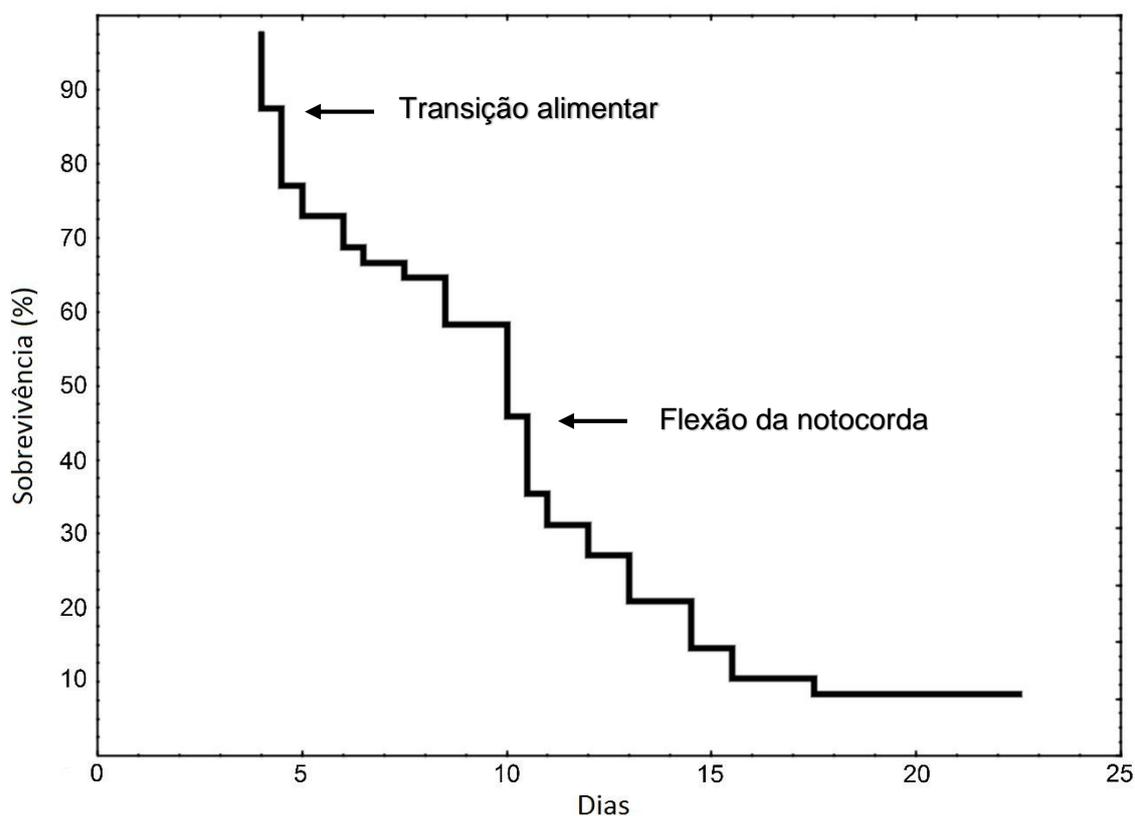


Figura 2.3 – Curva de sobrevivência dos exemplares do *Astyanax altiparanae* durante o desenvolvimento ontogenético inicial, avaliada do momento da eclosão ao término do período inicial de desenvolvimento. As setas indicam os períodos mais críticos de sobrevivência larval.

Observou-se dois momentos críticos na sobrevivência das pós-larvas durante a ontogenia inicial. O primeiro, ocorreu no período de transição alimentar, ocasionando 28% de mortalidade entre o 4º e 5º dpe. O segundo momento ocorreu no início da flexão da notocorda (entre o 10º e o 11º dpe). Neste momento, a taxa de sobrevivência registrada era de 36%. A partir do 18º dpe, não ocorreu mais mortes, mantendo a taxa de sobrevivência final em 8%.

2.4 DISCUSSÃO

Segundo Nakatani, Agostinho et al. (2001), a maioria das espécies de peixes apresenta um padrão morfológico pós-eclosão relativamente semelhante. Os autores destacam, por exemplo, algumas características morfológicas que foram aqui observadas nas larvas de *A. altiparanae*, como, por exemplo, a presença de pequenos pigmentos formados por cromatóforos dendríticos, espalhados pelas bordas externas do saco vitelínico e próximos aos olhos. Os parâmetros morfométricos analisados no presente estudo também são compatíveis com os descritos por Nakatani, Agostinho et al. (2001) para larvas dessa mesma espécie, em fase de pós-eclosão, mas coletadas em ambiente natural.

Uma característica importante em larvas da espécie é a presença da glândula adesiva. De acordo com Godinho, Santos et al. (2003), essa glândula permite que, em meio natural, as larvas tanto possam permanecer no local de eclosão quando ser levadas pela correnteza, potencializando a capacidade de dispersão da espécie. A glândula não foi mais registrada nos animais 98 hpe.

Nas horas subsequentes à eclosão, foi observada uma maior pigmentação por cromatóforos dendríticos espalhados ao longo da região acima da notocorda, e puntiformes, espalhados pela região cranial. De acordo com Meijide and Guerrero (2000), os estudos da pigmentação corporal de peixes são fundamentais para a identificação de estágios larvais e pós larvais de várias espécies. Larvas de espécies como *Atherinella brasiliensis* (Franca, Severi et al. 2007) e de larvas de *Rhinelepis aspera* (Perini, Sato et al. 2010) apresentam apenas um tipo de cromatóforo. Outras espécies apresentam os dois tipos de cromatóforos, como *Pimelodus maculatus* (Buzollo, Veríssimo-Silveira et al. 2011), jundiá *Rhamdia quelen* (Amorim, Gomes et al. 2009) e o próprio *Astyanax*

altiparanae, como constatado neste estudo. Neste estágio também foi observado o desenvolvimento das estruturas do trato digestório, com destaque para a abertura e funcionalidade bucal, desenvolvimento do tubo digestório e abertura anal.

Com o aparecimento da bexiga natatória e o desenvolvimento das nadadeiras peitorais e caudal, evidenciou-se o início do estágio de pré-flexão. Segundo Trotter, Pankhurst et al. (2003), assim que a bexiga natatória torna-se funcional, as larvas precisam capturar o ar atmosférico. O desenvolvimento destas estruturas possibilita um maior equilíbrio e controle natatório, aumentando o potencial de captura de alimento e, conseqüentemente, de sobrevivência das pós-larvas.

Quanto ao desenvolvimento das nadadeiras, o padrão aqui observado mostrou-se semelhante ao reportado por Makrakis (2001) para *Auchenipterus osteomystax*, iniciando-se pela metamorfose da membrana embrionária caudal, processo também observado em larvas de *Danio rerio* (Parichy, Elizondo et al. 2009); surgimento do botão das nadadeiras peitorais (larval vitelino); desaparecimento da membrana embrionária; surgimento da nadadeira caudal (pré-flexão); desenvolvimento da nadadeira anal e dorsal na pós-flexão.

O tempo até a absorção da reserva vitelínica constatada neste estudo diferiu do observado por Almeida (2007) em exemplares da mesma espécie. Segundo o autor, a absorção completa da reserva vitelínica e o início da alimentação exógena ocorreram em 18 hpe (larval vitelino). Já no presente estudo, esses processos foram observados 74 hpe, tempo próximo ao encontrado para pós-larvas de *Brycon orbignyanus* (Maciel, Lanna et al. 2010, Nogueira, Godinho et al. 2014).

No estudo realizado por Nakatani, Agostinho et al. (2001), a total absorção do saco vitelino ocorreu quando os exemplares de *Astyanax altiparanae* atingiram 4,50 mm de CT (pré-flexão). Já no presente caso, as pós-larvas apresentavam 3,90 mm de CT, o que pode indicar tanto a existência de variações genética dentro da mesma espécie ou a possibilidade de que em laboratório o desenvolvimento ontogenético sofrer alterações em relação aos padrões observados na natureza, que certamente são expostos a diversas variações da temperatura ao longo do desenvolvimento inicial.

Em laboratório, um dos fatores-chave para o sucesso da larvicultura é a adaptação dos animais ao alimento externo, principalmente no caso de uso de alimentos inertes. O período de transição entre a nutrição endógena e exógena é caracterizado por elevados índice de mortalidade durante os primeiros dias de vida dos peixes. Entre 62 a 86 hpe, foi observada a presença de ração no tubo digestório das pós-larvas, indicando que o período de transição ocorreu quando os exemplares ainda possuíam vestígios de reserva vitelínica. Segundo Guerrero Alvarado (2003), as pós-larvas não reconhecem imediatamente dietas artificiais inertes como alimento, o que pode explicar a amplitude observada (próximo a 24 horas) entre o primeiro e o último exemplar de *A. altiparanae* que apresentou o primeiro vestígio de alimento dentro do tubo digestório. Pittman, Yúfera et al. (2013) relataram que fatores como o comprimento total e o maior tamanho da boca são essenciais, nas fases iniciais, para aumentar a probabilidade de sobrevivência das pós-larvas, estando relacionados à maior chance de capturar alimento. Os mesmos autores relatam ainda que, na ausência de predadores e na presença de grande disponibilidade de alimentos, essa vantagem deixa de existir, pois não há relatos na literatura de que larvas e pós-larvas maiores se tornem necessariamente juvenis e adultos também maiores.

Quando as pós-larvas atingiram em média 4,93 mm de CT (11 a 13 hpe), iniciou-se a flexão da porção caudal da notocorda. Não há outros registros do momento de flexão da notocorda para esta espécie. Em pós-larvas de *Brycon hilarii* a flexão total da notocorda acontece quando os indivíduos atingem 9,00 mm de CT (Oliveira, Bialetzki et al. 2012). Já para pós-larvas de *Pyrrhulina australis*, a notocorda encontra-se flexionada quando os exemplares atingem aproximadamente 5,33 mm de CT (Taguti, Kipper et al. 2009).

Durante este estágio de desenvolvimento também foi observado o número de miômeros pré e pós-anal, que variou entre 13 a 17 e 13 a 16, respectivamente. No trabalho realizado por Nakatani, Agostinho et al. (2001), o número de miômeros totais de *Astyanax altiparanae* variou entre 32 a 37 no estágio de pós-flexão. Neste estudo, o número máximo de miômeros observados no período de flexão da notocorda foi de 33. Não foram visualizados miômeros durante a pós-flexão larval. O número de miômeros observados para *A. altiparanae* os

diferencia de outras espécies da família Characidae, como *Pyrrhulina australis* (Taguti, Kipper et al. 2009), *Brycon orbignyanus* (Faustino, Nakaghi et al. 2011) e *Brycon hilarii* (Oliveira, Bialecki et al. 2012).

Segundo Nakatani, Agostinho et al. (2001) os indivíduos de *A. altiparanae* atingem o estágio de pós-flexão com 8,10 mm de CT, e as escamas são visíveis quando os exemplares atingem 13,08 mm de CT. Neste estudo, as pós-larvas entraram em estágio de pós-flexão da notocorda com 4,98 mm de CT e apresentavam escamas quando atingiram 5,97 mm de CT (17 hpe). Mais uma vez, tais diferenças podem estar tanto relacionadas às variações genéticas, quanto ser decorrentes das condições laboratoriais.

Embora existam grandes variações individuais no número de raios de cada nadadeira, não existe na literatura estudos referentes à essa característica morfológica durante o período de desenvolvimento inicial de *A. altiparanae*. Tanto os raios das nadadeiras peitorais, anal, caudal e dorsal diferenciaram de exemplares de *A. altiparanae* observados por Nakatani, Agostinho et al. (2001). Isso mostra que, mesmo após o período larval, algumas alterações morfológicas ainda podem ocorrer para a espécie.

Um dos desafios a serem superados para o uso de pós-larvas em experimentos laboratoriais é a tendência de deterioração da qualidade da água nas unidades experimentais provocadas pelo aumento na produção de resíduos metabólicos e pela decomposição das frações não consumidas de ração. Tais processos puderam ser constatados principalmente a partir do aumento das concentrações de amônia e de CO₂ que ocorreram ao longo do desenvolvimento dos indivíduos. Em estudo de toxicidade da amônia para indivíduos adultos de *Astyanax altiparanae*, realizado por Dal Pont (2012), a CL₅₀ 24 h foi superior a 100 mg.L⁻¹. Porém, nada se sabe sobre toxicidade da amônia ou do CO₂ para as formas larvais dessa espécie. Dessa forma, não se pode, a priori, descartar a hipótese de que os aumentos das concentrações desses compostos nos poços de cultivo tenham afetado a taxa de crescimento ou até a sobrevivência dos animais.

Ainda assim, os resultados obtidos no presente estudo mostram que larvas e pós-larvas de *A. altiparanae* têm grande potencial para serem utilizadas como modelo em ensaios laboratoriais com peixes, como em testes de

exposição à xenobióticos, testes de mutagenicidade e experimentos biológicos em geral. Nesse sentido, os dados aqui apresentados constituem uma importante contribuição para a compreensão dos processos ontogenéticos larvais da espécie e como referência a estudos subsequentes.

2.5 REFERÊNCIAS

Almeida, R. (2007). "Astyanax altiparanae (Pisces, Characiformes) como modelo biológico de espécie de peixe para exploração zootécnica e biomanipulação." Botucatu. 103p.(Tese de Doutorado, Instituto de Biociência, UNESP). Disponível em: http://www.ibb.unesp.br/posgrad/teses/zoologia_do_2007_rodrigo_almeida.pdf Acesso em 13(10): 2011.

Amorim, M. P. d., B. V. C. Gomes, Y. S. Martins, Y. Sato, E. Rizzo and N. Bazzoli (2009). "Early development of the silver catfish *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824)(Pisces: Heptapteridae) from the São Francisco River Basin, Brazil." *Aquaculture Research* 40(2): 172-180.

APHA (1995). Standard methods for the examination of water and wastewater: 4500-NH₃ Método fenol de determinação de Amônia Total. Washington, DC, USA.

APHA., A. P. H. A. (2005). "Standard methods for the examination of water and wastewater. Method 4500 F. 4-114." 21.

Barrera, E. A. L. (2013). "Avaliação dos efeitos da exposição de nanopartículas de prata em larvas de *Rhamdia quelen* e da coexposição com Benzo (a) pireno em indivíduos adultos."

Brown, C. L. and J. Núñez (1994). Hormone actions and applications in embryogenesis, Sea Grant College Program, University of Hawaii.

Buzollo, H., R. Veríssimo-Silveira, I. R. Oliveira-Almeida, J. S. Alexandre, H. T. Okuda and A. Ninhaus-Silveira (2011). "Structural analysis of the *Pimelodus maculatus* (Lacépède, 1803) embryogenesis (Siluriformes: Pimelodidae)." *Neotropical Ichthyology* 9: 601-616.

Dal Pont, G. (2012). Toxicidade do óleo diesel para o peixe *Astyanax altiparanae*. Mestrado em Ciências Veterinárias Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná.

Faustino, F., L. S. Nakaghi and E. Neumann (2011). "Brycon gouldingi (Teleostei, Characidae): aspects of the embryonic development in a new fish species with aquaculture potential." *Zygote* 19(4): 351-363.

Franca, E. J., W. Severi, M. F. Castro, T. N. Medeiros and A. C. A. El-Deir (2007). "Description of *Atherinella brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1825) (Atheriniformes : Atherinopsidae) larvae from the Jaguaribe River estuary, Itamaraca island, northeastern Brazil." *Neotropical Ichthyology* 5(3): 369-374.

Gisbert, E., R. Asgari, G. Rafiee, N. Agh, S. Eagderi, H. Eshaghzadeh and C. Alcaraz (2014). "Early development and allometric growth patterns of beluga *Huso huso* (Linnaeus, 1758)." *Journal of Applied Ichthyology* 30(6): 1264-1272.

Godinho, H. P., J. Santos and Y. Sato (2003). "Ontogênese larval de cinco espécies de peixes do São Francisco." *Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais*: 133-148.

Govoni, J. J., G. W. Boehlert and Y. Watanabe (1986). "The physiology of digestion in fish larvae." *Environmental Biology of Fishes* 16(1-3): 59-77.

Guerrero Alvarado, C. E. (2003). "Treinamento alimentar de pintado *Pseudoplatystoma coruscans* (Agassiz, 1829): Sobrevivência, crescimento e aspectos econômicos."

Ingvarsdóttir, A., C. Bjørkblom, E. Ravagnan, B. F. Godal, M. Arnberg, D. L. Joachim and S. Sanni (2012). "Effects of different concentrations of crude oil on first feeding larvae of Atlantic herring (*Clupea harengus*)." *Journal of Marine Systems* 93(0): 69-76.

Lema, S. C., I. R. Schultz, N. L. Scholz, J. P. Incardona and P. Swanson (2007). "Neural defects and cardiac arrhythmia in fish larvae following embryonic exposure to 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (PBDE 47)." *Aquatic Toxicology* 82(4): 296-307.

Maciel, C., E. A. T. Lanna, A. M. Junior, J. L. Donzele, C. A. Neves and E. Menin (2010). "Morphological and behavioral development of the piracanjuba larvae." *Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science* 39(5): 961-970.

MACIEL, C. M. R. R. (2006). Ontogenia de larvas de piracanjuba, *Brycon orbignyanus valenciennes* (1849)(Characiformes, Characidae, Bryconinae), Universidade Federal de Viçosa.

Makrakis, M. C. (2001). "Early development of *Auchenipterus osteomystax* (Osteichthyes, Auchenipteridae) from the Paraná river basin, Brazil
Caracterização do desenvolvimento inicial de *Auchenipterus osteomystax* (Osteichthyes, Auchenipteridae) da bacia do rio Paraná, Brasil." *Acta Scientiarum : Biological Sciences*.

McKim, J. M. (1977). "Evaluation of Tests with Early Life Stages of Fish for Predicting Long-Term Toxicity." *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 34(8): 1148-1154.

Meier, S., H. Craig Morton, G. Nyhammer, B. E. Grøsvik, V. Makhotin, A. Geffen, S. Boitsov, K. A. Kvestad, A. Bohne-Kjersem, A. Goksøyr, A. Folkvord,

J. Klungsøyr and A. Svoldal (2010). "Development of Atlantic cod (*Gadus morhua*) exposed to produced water during early life stages: Effects on embryos, larvae, and juvenile fish." *Marine Environmental Research* 70(5): 383-394.

Meijide, F. and G. Guerrero (2000). "Embryonic and larval development of a substrate-brooding cichlid *Cichlasoma dimerus* (Heckel, 1840) under laboratory conditions." *Journal of Zoology* 252(04): 481-493.

Nakatani, K., A. A. Agostinho, G. Baumgartner, A. Bialetzki, P. V. Sanches, M. C. Makrakis and C. S. Pavanelli (2001). *Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação*. Maringá/PR - Brasil, Editora da Universidade Estadual de Maringá.

Nogueira, L. B., A. L. Godinho and H. P. Godinho (2014). "Early development and allometric growth in hatchery-reared characin *Brycon orbignyanus*." *Aquaculture Research* 45(6): 1004-1011.

Nunn, A., L. Tewson and I. Cowx (2012). "The foraging ecology of larval and juvenile fishes." *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 22(2): 377-408.

Oliveira, F. G. d., A. Bialetzki, L. C. Gomes, M. Santin and T. L. Taguti (2012). "Larval development of *Brycon hilarii* (Characiformes, Characidae)." *Iheringia. Série Zoologia* 102(1): 62-70.

Parichy, D. M., M. R. Elizondo, M. G. Mills, T. N. Gordon and R. E. Engeszer (2009). "Normal Table of Post-Embryonic Zebrafish Development: Staging by Externally Visible Anatomy of the Living Fish." *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 238(12): 2975-3015.

Perini, V. d. R., Y. Sato, E. Rizzo and N. Bazzoli (2010). "Biology of eggs, embryos and larvae of *Rhinelepis aspera* (Spix & Agassiz, 1829)(Pisces: Siluriformes)." *Zygote* 18(02): 159-171.

Pittman, K., M. Yúfera, M. Pavlidis, A. J. Geffen, W. Koven, L. Ribeiro, J. L. Zambonino-Infante and A. Tandler (2013). "Fantastically plastic: fish larvae equipped for a new world." *Reviews in Aquaculture* 5: S224-S267.

Ramos, S., H. Cabral and M. Elliott (2015). "Do fish larvae have advantages over adults and other components for assessing estuarine ecological quality?" *Ecological Indicators* 55(0): 74-85.

Russo, T., M. Scardi and S. Cataudella (2014). "Applications of Self-Organizing Maps for Ecomorphological Investigations through Early Ontogeny of Fish."

Sfakianakis, D. G., E. Renieri, M. Kentouri and A. M. Tsatsakis (2015). "Effect of heavy metals on fish larvae deformities: A review." *Environmental Research* 137(0): 246-255.

Taguti, T. L., D. Kipper, A. Bialecki, P. V. Sanches, M. C. Makrakis, G. Baumgartner and R. Fernandes (2009). "Early development of *Pyrrhulina australis* Eigenmann & Kennedy, 1903 (Characiformes, Lebiasinidae)." *Biota Neotropica* 9(4): 59-65.

Trotter, A. J., P. M. Pankhurst, D. T. Morehead and S. C. Battaglione (2003). "Effects of temperature on initial swim bladder inflation and related development in cultured striped trumpeter (*Latris lineata*) larvae." *Aquaculture* 221(1-4): 141-156.

Vicente, A. L. (2014). *Uso de óleos essenciais e de compostos sintéticos como agentes anestésicos para o lambari *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000)*, Universidade Federal do Paraná.

Zambonino Infante, J. L. and C. L. Cahu (2001). "Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae." *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 130(4): 477-487.

ANEXO I



Figura 3.7 – Micrópila de um ovo recém liberado de uma fêmea de *Astyanax altiparanae* durante o processo de reprodução induzida e desova livre ocorrida neste estudo a 25°C.



Figura 3.2 – Ovos fecundados de *Astyanax altiparanae* durante o monitoramento e distribuição de ovos para as placas de cultivo celular.



Figura 3.3 – Exemplar de *Astyanax altiparanae* apresentando completa pigmentação das pupilas, pigmentação do sangue (região cardíaca totalmente avermelhada) e desenvolvimento de dois arcos branquiais, durante o monitoramento em temperatura de 25°C.

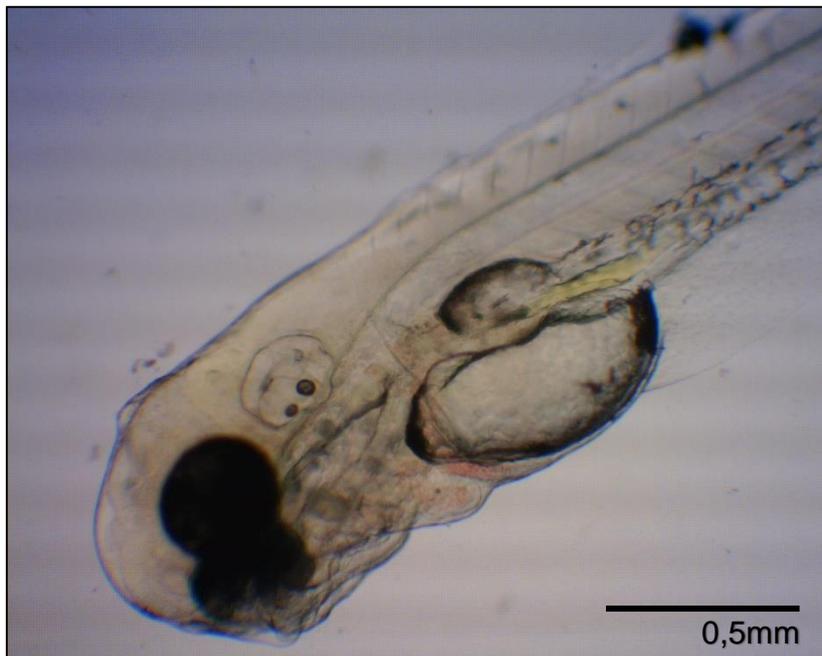


Figura 3.4 – Coração pigmentado de *Astyanax altiparanae*, apresentando ainda maior desenvolvimento da vesícula óptica e bexiga natatória inflada, com início do desenvolvimento do intestino.



Figura 3.5 – Maior desenvolvimento do trato digestório (intestino) de *Astyanax altiparanae* durante o período de pré-flexão da notocorda, em temperatura de 25°C.



Figura 3.6 – Desenvolvimento completo das nadadeiras peitorais e dos arcos branquiais de *Astyanax altiparanae* durante o estágio de pré-flexão em temperatura de 25°C.



Figura 3.7 – Bexiga natatória inflada e vestígio de alimento no trato digestório de *Astyanax altiparanae* durante o estágio de pré-flexão (7dpe) em temperatura de 25°C.

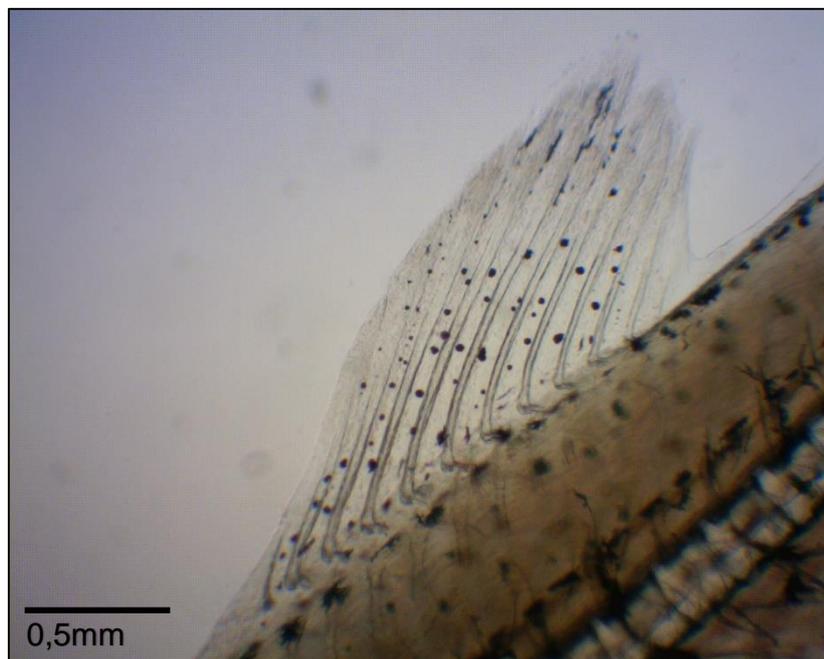


Figura 3.8 – Seguimentação completa dos raios da nadadeira dorsal de *Astyanax altiparanae* durante o estágio de flexão da notocorda (9dpe) em temperatura de 25°C.

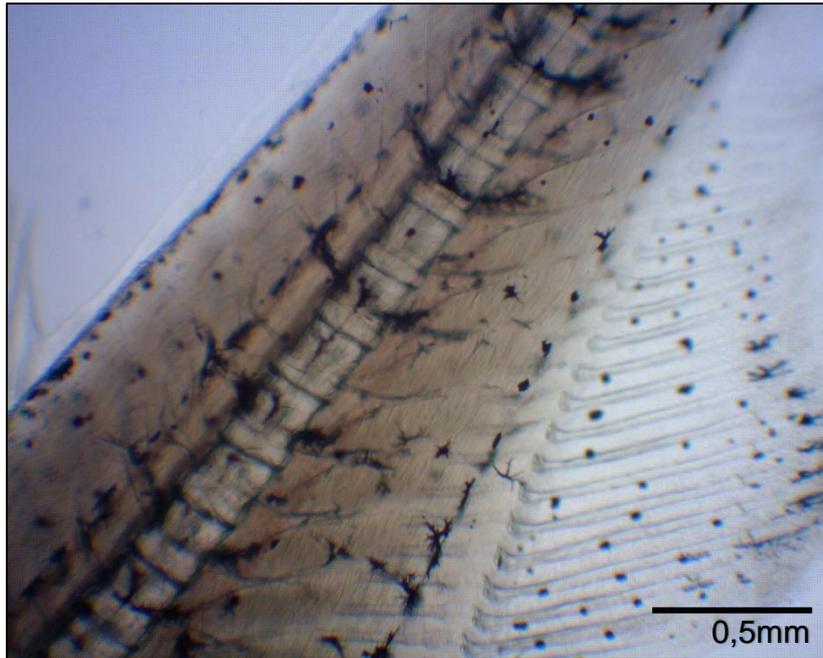


Figura 3.9 – Seguimentação completa dos raios da nadadeira anal de *Astyanax altiparanae* em temperatura de 25°C.

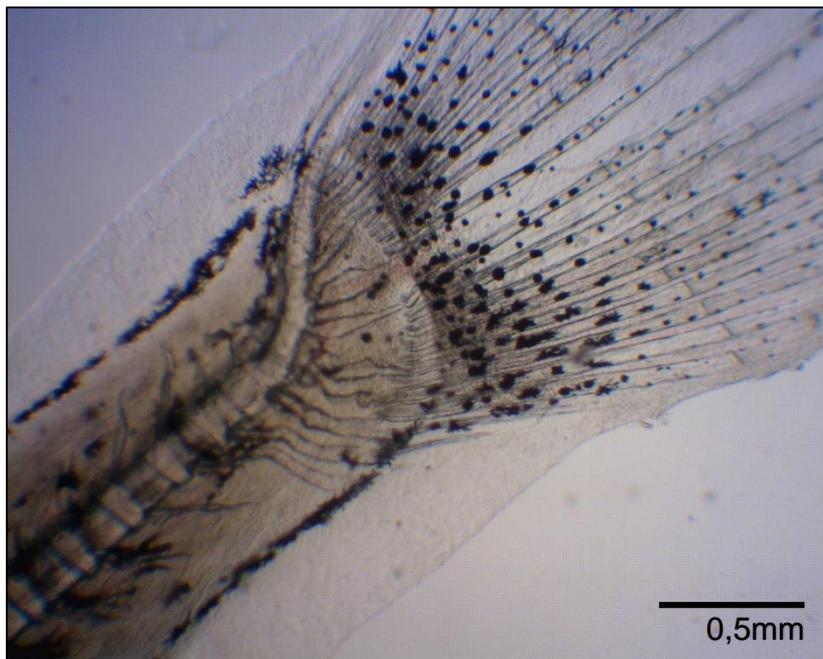


Figura 3.10 – Flexão total da porção final da notocorda de *Astyanax altiparanae* (10dpe) durante o desenvolvimento em temperatura de 25°C.



Figura 3.11 – Completo desenvolvimento dos olhos e pigmentação puntiforme na cabeça de *Astyanax altiparanae* durante o período de pós-flexão (18dpe).



Figura 3.12 – Exemplar de *Astyanax altiparanae*, no estágio de pós-flexão (20dpe), apresentando completo desenvolvimento dos raios das nadadeiras peitorais, anal, dorsal e caudal.

ANEXO II

Edemas e malformações foram registradas nos estágios larval vitelino e pré-flexão de *A. altiparanae*, durante o acompanhamento ontogenético nas temperaturas de 20 e 30°C.

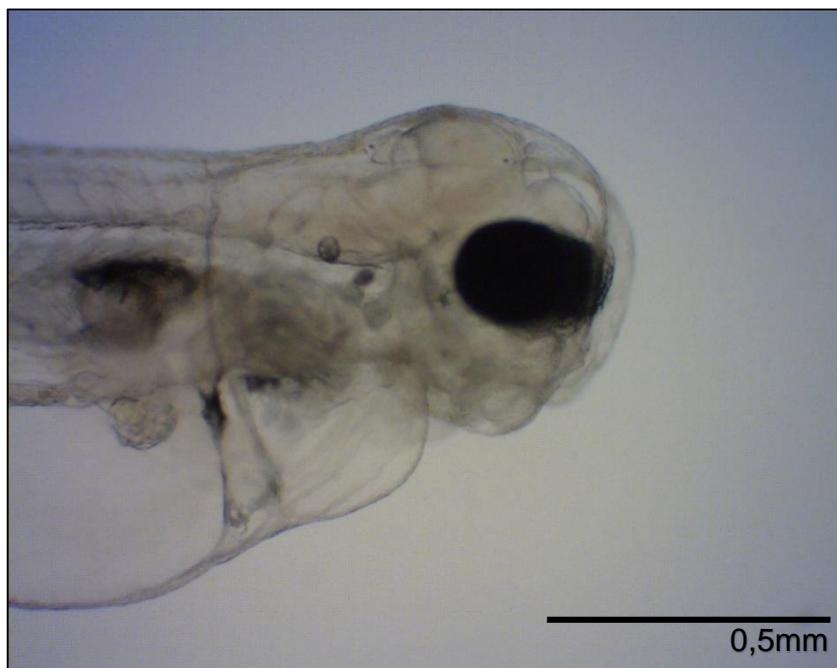


Figura 4.1 – Exemplar de *Astyanax altiparanae* apresentando edema cardíaco (72hpe) em temperatura de 30°C.



Figura 4.2 – Malformação da porção final da notocorda de *Astyanax altiparanae* em temperatura de 30°C (64hpe).

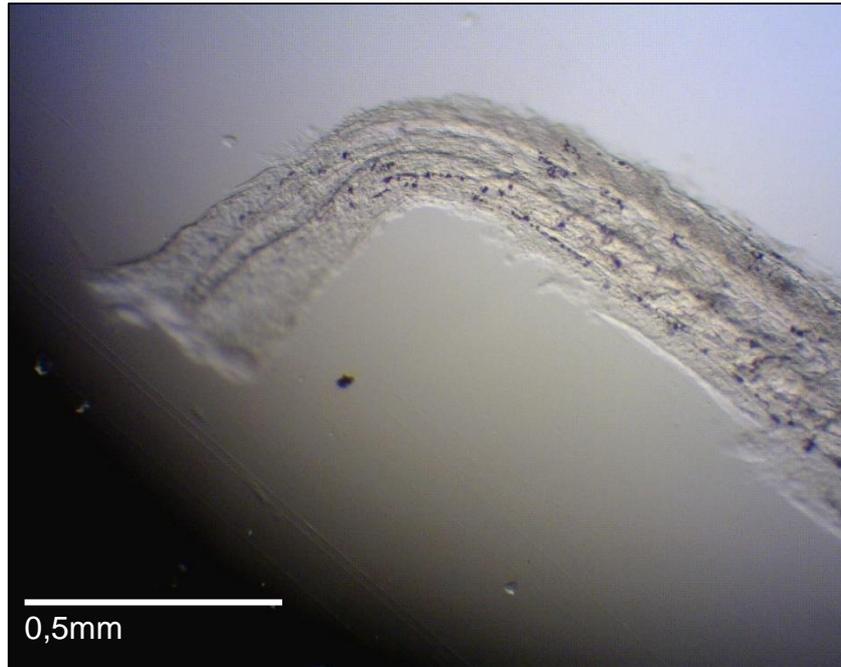


Figura 4.3 – Malformação da notocorda de *Astyanax altiparanae*, durante o estágio larval vitelino em temperatura de 20°C.



Figura 4.4 – Malformação da notocorda de um exemplar de *Astyanax altiparanae*, durante o estágio de pré-flexão (86hpe) em temperatura de 30°C.



Figura 4.5 – Exemplar apresentando completo desenvolvimento da pupila (56hpe) porém com maldesenvolvimento da cabeça, observado em temperatura de 20°C.

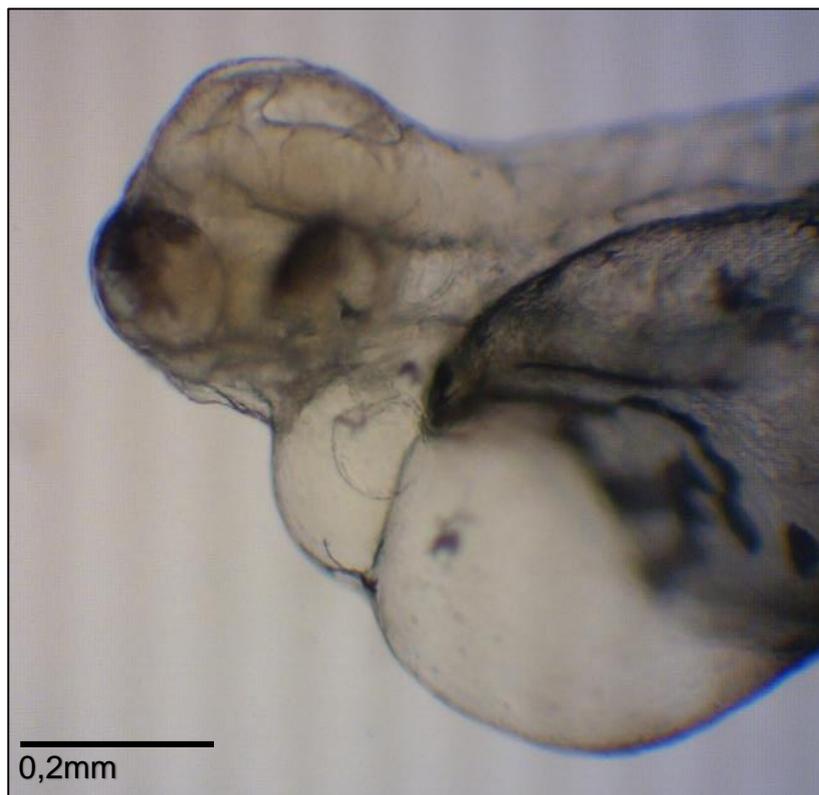


Figura 4.6 – Malformação da cabeça e edema cardíaco no mesmo exemplar de *Astyanax altiparanae* durante o estágio larval vitelino em temperatura de 20°C.

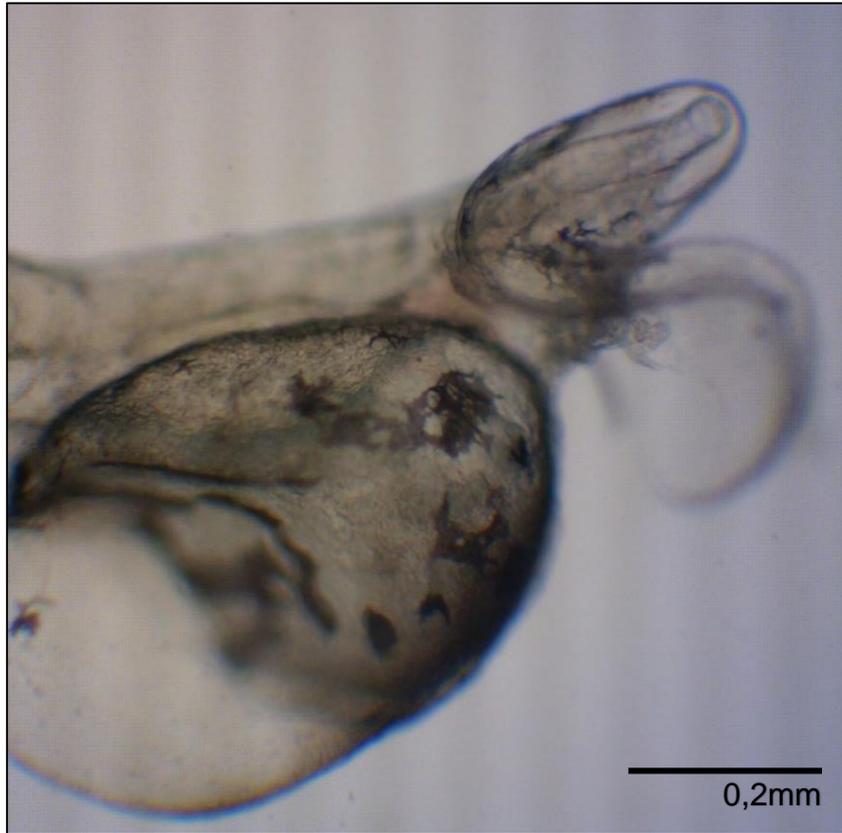


Figura 4.7 – Edema cardíaco e malformação da notocorda de *Astyanax altiparanae*, durante o desenvolvimento morfológico (64hpe) ocorrido a 20°C.