

KINULPE HONORATO SAMPAIO

SUPERFÍCIE OVOCITÁRIA E DESENVOLVIMENTO INICIAL
DE QUATRO ESPÉCIES DE PEIXES DE INTERESSE
COMERCIAL DA BACIA DO RIO SÃO FRANCISCO.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
BELO HORIZONTE – MG

2006

KINULPE HONORATO SAMPAIO

SUPERFÍCIE OVOCITÁRIA E DESENVOLVIMENTO INICIAL
DE QUATRO ESPÉCIES DE PEIXES DE INTERESSE
COMERCIAL DA BACIA DO RIO SÃO FRANCISCO.

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

BELO HORIZONTE – MG

2006

Essa dissertação foi realizada no Laboratório de Ictiohistologia do Departamento de Morfologia ICB/UFMG, Estação de Hidrobiologia e Piscicultura de Três Marias, CODEVASF-MG, Centro de Microscopia Eletrônica (CEMEL) ICB/UFMG e Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálises do Departamento de Física ICEX/UFMG, sob orientação do Professor Dr. Nilo Bazzoli, co-orientação da Professora Dra. Elizete Rizzo e colaboração do Dr. Yoshimi Sato, com apoio das seguintes instituições:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG);
- Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba (CODEVASF).

Dedico esta dissertação às mulheres da
minha vida: minha mãe Maristela, minha
avó Gilda e minha amada Maria Elvira.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as oportunidades concedidas para meu desenvolvimento espiritual, moral e intelectual;

A meus pais e meu irmão Pahan que apesar da distância sempre incentivaram minha busca pelo conhecimento;

A todos meus familiares, especialmente ao meu padrinho Marcos, à minha avó Gilda, aos meus tios Aimã e Jeová, e à minha irmãzinha Dayana pelo incentivo e pelo apoio;

À minha amada Maria Elvira, pelo amor, amizade e cumplicidade;

Aos professores, orientadores e amigos, Dra. Elizete Rizzo e Dr. Nilo Bazzoli que confiaram no meu trabalho e se dedicaram para realização desse projeto;

Ao Dr. Yoshimi Sato pela colaboração constante e aos funcionários da Estação de Hidrobiologia e Piscicultura de Três Marias pelo apoio logístico;

A todos do laboratório de Ictiohistologia: aos que acabaram de chegar (Flávia e Fabrício), aos que ainda estão presentes (Hélio, Santer, Fábio, Ralph, Paula, Heder), aos que fizeram parte da história do laboratório (Érika, Regina, Wesley, Renato, Ramón, Emmanuel e Fernanda) e especialmente à Mônica que muitas vezes desempenhou o papel de mãe e amiga.

Aos amigos do laboratório de Genética Molecular e de Microorganismos, pois foi lá que senti pela primeira vez o sabor de fazer ciência;

Aos amigos do curso de graduação em Ciências Biológicas e aos de pós-graduação em Biologia Celular;

Aos professores do curso de Pós-graduação em Biologia celular;

Aos funcionários e professores do Departamento de Morfologia;

A todos que estiveram presentes em minha vida e que contribuíram de forma direta ou indireta para meu crescimento profissional.

“O rio somente alcança seus objetivos porque aprendeu a contornar obstáculos”. (Lao-Tsé)

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
I. INTRODUÇÃO	1
1. Espécies em estudo.....	1
2. Ovócitos de peixes.....	2
3. Desenvolvimento embrionário.....	4
4. Ontogênese larval.....	6
II. OBJETIVOS	8
1. Objetivo geral.....	8
2. Objetivos específicos.....	8
III. MATERIAL E MÉTODOS	9
1. Desova induzida.....	9
2. Histologia e histoquímica de carboidratos.....	9
3. Microscopia eletrônica de varredura.....	10
4. Morfometria e análise estatística.....	10
IV. RESULTADOS	12
1. Histologia e histoquímica de ovócitos.....	12
2. Ultra-estrutura da superfície ovocitária.....	15
3. Desenvolvimento embrionário.....	17
4. Ontogênese Larval.....	23
V. DICUSSÃO	34
1. Ovócitos.....	34
2. Desenvolvimento embrionário.....	36
3. Ontogênese Larval.....	39
VI. CONCLUSÕES	43
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

RESUMO

Em peixes, o desenvolvimento inicial compreende as etapas do ciclo biológico que abrange ovos, embriões e larvas até a reabsorção total do saco vitelínico, sendo importante por fornecer subsídios para aqüicultura, identificação de ovos e larvas na natureza, estudos taxonômicos/filogenéticos e de biologia do desenvolvimento. Características ultra-estruturais dos ovos estão relacionadas aos padrões de comportamento reprodutivo das espécies e acompanham a filogênese, e as moléculas de carboidratos presentes na superfície ovocitária participam nos processos de fertilização e de interação do ovo com o meio. O objetivo do presente trabalho foi analisar comparativamente a superfície e os resíduos de açúcares terminais de ovócitos e a morfogênese durante embriogênese e ontogênese larval de *Brycon orthotaenia*, *Leporinus obtusidens*, *Prochilodus argenteus* e *Salminus brasiliensis*, peixes de interesse comercial da bacia do rio São Francisco. Análises histológicas e histoquímicas de carboidratos mostraram características ovocitárias similares nas células foliculares, zona radiata interna e glóbulos de vitelo. Alvéolos corticais e zona radiata externa foram espécie-específicos quanto à constituição histoquímica. A ultra-estrutura da superfície ovocitária mostrou espécie-especificidade na densidade e distância entre poros-canais da zona radiata de *B. orthotaenia*, *L. obtusidens* e *S. brasiliensis*, presença de rede fibrilar em *P. argenteus* e micrópilas distintas nas quatro espécies. O desenvolvimento embrionário e a organogênese foram semelhantes, com embriogênese rápida, variando entre 17h e 21h em temperatura média de 25°C. As larvas recém-eclodidas das quatro espécies são pouco desenvolvidas, com mandíbulas não formadas, olhos despigmentados e saco vitelínico grande. A reabsorção total do saco vitelínico variou de 2 dias após eclosão em *S. brasiliensis* até 5 dias em *L. obtusidens* e a abertura da boca precedeu um dia a reabsorção total do saco vitelínico. *S. brasiliensis* e *B. orthotaenia* apresentaram similaridades quanto à morfologia de ovos e larvas, tais como pregas no vestíbulo micropilar, órgão adesivo na cabeça das larvas, canibalismo e ultra-estrutura dos neuromastos, provavelmente devido à maior proximidade filogenética entre essas espécies.

ABSTRACT

In fishes, early development includes stages of life history, which comprise eggs, embryos and yolk-sac larvae, being important for providing subsidies for aquaculture, egg and larval identification, taxonomic/phylogenetic and developmental biology studies. Ultrastructural features of eggs are related to reproductive behavior and phylogeny, and carbohydrate molecules at oocyte surface play a role in fertilization and egg-environment interaction. The present work had the purpose of analyzing comparatively egg surface, sugar terminal residues in oocytes and the morphogenetic events of embryogenesis and larval ontogenesis in *Brycon orthotaenia*, *Leporinus obtusidens*, *Prochilodus argenteus* and *Salminus brasiliensis*, commercial fishes from São Francisco River basin. Histological analyses and carbohydrate histochemistry showed similar characteristics in follicular cells, inner layer of zona radiata and yolk globules among all species. Cortical alveoli and outer layer of zona radiata were species-specific. The oocyte surface ultrastructure showed species-specificity for density and distance of zona radiata pore-canal in *B. orthotaenia*, *L. obtusidens* and *S. brasiliensis*, fibrillar net in *P. argenteus* and different micropyles in all species. The embryonic and organ development were similar, with a brief embryogenesis, ranging from 17h to 21h (mean temperature of 25°C). The hatching larvae are poorly developed in all species, showing no jaws, depigmented eyes and a big yolk sac. The total yolk sac reabsorption ranged from 2^{sd} day post-hatching in *S. brasiliensis* to 5th day post-hatching in *L. obtusidens* and the larval mouth opened one day prior to total yolk sac reabsorption. *S. brasiliensis* and *B. orthotaenia* showed similarities in egg and larval morphology, such as ridges at micropylar vestibule, attachment organ on larval head, cannibalism and neuromast ultrastructure, which is probably due to phylogenetic proximity between both species.

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Lectinas utilizadas para caracterização histoquímica de resíduos de carboidratos.....	10
Tabela II: Reatividade as estruturas ovocitárias à histoquímica de carboidratos em quatro espécies de peixes de interesse comercial da bacia do rio São Francisco.....	12
Tabela III: Reatividade das lectinas na zona radiata externa (ZRE) e alvéolos corticais (AC) de ovócitos de quatro espécies de peixes de interesse comercial da bacia do rio São Francisco.....	13
Tabela IV: Morfometria (média \pm desvio-padrão) da superfície de ovócitos recém-desovados de espécies de interesse comercial da bacia do rio São Francisco ao MEV....	15
Tabela V: Início (<i>hh:mm</i>) dos principais eventos da morfogênese durante embriogênese de quatro espécies de interesse comercial da bacia do rio São Francisco após fertilização à temperatura 23-27°C.....	19
Tabela VI: Dados biométricos (média \pm desvio-padrão) (mm) de larvas de peixes de interesse comercial da bacia do rio São Francisco em condições experimentais até a reabsorção total do saco vitelínico.....	27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Histologia e histoquímica de carboidratos em ovócitos de peixes de interesse comercial da bacia do rio São Francisco.....	14
Figura 2: Superfície de ovócitos recém-desovados de espécies de peixes de interesse comercial da bacia do São Francisco ao MEV.....	16
Figura 3: Desenvolvimento embrionário de peixes de interesse comercial da bacia do rio São Francisco ao MEV (A-E) e estereomicroscópio (F-G).....	20
Figura 4: Gastrulação de <i>L. obtusidens</i> ao MEV.....	21
Figura 5: Somitogênese e camada sincicial vitelínica em embriões de peixes de interesse comercial da bacia do rio São Francisco ao MEV (A) e histologia (B-D).....	22
Figura 6: Secções histológicas de larvas de peixes de interesse comercial da bacia do rio São Francisco durante organogênese.....	28
Figura 7: Secções histológicas de larvas de peixes de interesse comercial da bacia do rio São Francisco durante organogênese.....	29
Figura 8: Secções histológicas de larvas de peixes de interesse comercial da bacia do rio São Francisco durante organogênese.....	30
Figura 9: Fossa nasal e botões gustativos de larvas de peixes de interesse comercial da bacia do rio São Francisco ao MEV.....	31
Figura 10: Neuromastos livres na superfície de larvas de peixes de interesse comercial da bacia do rio São Francisco ao MEV.....	32
Figura 11: Órgão adesivo (seta) na cabeça de larvas de peixes de interesse comercial da bacia do rio São Francisco ao MEV.....	33

I. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento inicial de peixes compreende as etapas do ciclo biológico que abrange ovos, embriões e larvas até a reabsorção total do saco vitelínico, cujo estudo fornece subsídios para aquicultura, para identificação de ovos e larvas na natureza, para estudos taxonômicos (NAKATANI *et al.*, 2001) além de oferecer parâmetros importantes nas análises das relações evolutivas entre espécies (FUTUYMA, 2002; SILVEIRA, 2004). A maioria dos embriões de peixes são excelentes modelos experimentais no estudo dos mecanismos de desenvolvimento por apresentarem desenvolvimento relativamente rápido, fertilização e embriogênese externas e facilidade de manipulação e observação (LANGELAND & KIMMEL, 1997; HELFMAN *et al.*, 2000).

Na piscicultura, os eventos da embriogênese são freqüentemente monitorados através de estereomicroscópio tendo em vista a determinação das taxas de fertilização e de anormalidades larvais que indicam a qualidade de ovos e larvas produzidos (SATO, 1999). Poucos estudos utilizaram a microscopia eletrônica na caracterização dos estágios dos desenvolvimentos embrionário e larval (MATSUOKA, 2001; SILVEIRA, 2004). Estes estudos permitem identificar alterações morfológicas no padrão normal de desenvolvimento, uma vez que embriões e larvas são sensíveis às variações ambientais e experimentais (MEIJIDE & GUERRERO, 2000; OWENS & BAER, 2000).

Zebrafish, *Danio rerio*, é um dos organismos mais utilizados como modelo experimental para estudos de biologia do desenvolvimento (KIMMEL *et al.*, 1995; LANGELAND & KIMMEL, 1997). Considerando-se que os peixes representam aproximadamente 50% dos vertebrados e que apresentam grande diversidade de estratégias reprodutivas (NELSON, 1994), poucas espécies são estudadas. Com isso, análises dos desenvolvimentos embrionário e larval de outras espécies de peixes são relevantes para estudos dos mecanismos de desenvolvimento e determinação de modelos experimentais com estratégias reprodutivas diferentes.

1. Espécies em estudo

Os peixes em estudo são: matrinxã, *Brycon orthotaenia* Günther, 1864, piauí-verdadeiro, *Leporinus obtusidens* (Valenciennes, 1836), curimatá-pacu, *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 e dourado, *Salminus brasiliensis* Valenciennes, 1850. Todas as

quatro espécies são peixes migradores de importância econômica na bacia do rio São Francisco, pertencem à ordem Characiformes, apresentam desova total e período reprodutivo curto na estação chuvosa (BRITISKI *et al.*, 1984; REIS *et al.*, 2003; SATO *et al.*, 2003a). Estas espécies não se reproduzem em ambientes lênticos, e são rotineiramente submetidas à reprodução induzida na estação de Hidrobiologia e Piscicultura de Três Marias – CODEVASF, MG, visando o repovoamento de ambientes impactados (SATO *et al.*, 2003b).

O matrinxã é espécie endêmica da bacia do rio São Francisco e pertence à família Characidae (REIS *et al.*, 2003). Tem hábito alimentar onívoro e pode atingir 7 Kg de peso corporal. Devido à degradação ambiental, esta espécie está ameaçada de extinção em algumas regiões do rio São Francisco (BRITISKI *et al.*, 1984; SATO, 1999).

O piau-verdadeiro é encontrado também na bacia do Paraná e pertence à família Anostomidae (REIS *et al.*, 2003). Têm hábito alimentar preferencialmente herbívoro (NELSON, 1984) e pode alcançar 7,5 Kg, sendo provavelmente a espécie que atinge maior porte dentro da família (BRITISKI *et al.*, 1984; SATO, 1999; REIS *et al.*, 2003).

O curimatã-pacu, também encontrado na bacia do Paraná, pertence à família Prochilodontidae e é peixe iliófago (BRITISKI *et al.*, 1984; SATO, 1999; REIS *et al.*, 2003). Já foram registrados indivíduos com mais de 9 Kg de peso corporal, sendo, possivelmente, a espécie de maior porte dentro da família (SATO, 1999).

O dourado, assim como o matrinxã, pertence à família Characidae e encontra-se ameaçado de extinção em algumas regiões da bacia do São Francisco, como à jusante da barragem de Sobradinho e à montante da barragem de Três Marias (BRITISKI *et al.*, 1984; SATO, 1999; REIS *et al.*, 2003). É espécie piscívora e pode atingir 1,4 m de comprimento e cerca de 30 Kg (SATO, 1999).

2. Ovócitos de peixes

A ovogênese é marcada por eventos sequenciais de diferenciação e maturação dos folículos ovarianos, iniciando com a diferenciação das células germinativas primordiais (PGCs) em ovogônias. Estas entram em meiose originando os ovócitos que passarão pelas fases pré-vitelogênica e vitelogênica, finalizando-se com a maturação final ovocitária que culmina com a ovulação (SELMAN & WALLACE, 1989; TYLER & SUMPTER, 1996, PATIÑO & SULLIVAN, 2002).

Durante o crescimento do folículo, ocorre a formação da zona pelúcida que consiste na deposição de matriz extracelular entre ovócito e células foliculares. Na maioria dos peixes, a zona pelúcida é formada por duas camadas atravessadas por poros-canais, sendo também denominada zona radiata (ZR) (GURAYA, 1996). A camada interna consiste principalmente de proteínas, sendo homóloga a zona pelúcida de mamíferos (MURATA *et al.*, 1997; SCAPIGLIATI *et al.*, 1999) e a camada externa mostra uma combinação de proteínas e polissacarídeos (GURAYA, 1996), sendo responsável pelas interações dos ovos no meio aquático, além de proteger o embrião contra microorganismos patogênicos (KUDO & YAZAWA, 1997). Nos teleósteos, os folículos ovarianos desenvolvem-se de forma semelhante, havendo variações na composição, distribuição e grau de desenvolvimento dos alvéolos corticais, zona radiata e células foliculares, dependendo das estratégias reprodutivas das espécies (BAZZOLI & RIZZO, 1990; BAZZOLI, 1992; BAZZOLI & GODINHO, 1994; RIZZO *et al.*, 1998).

Após desova, os ovos de peixes de água doce podem ser livres ou apresentar vários graus de adesividade, sendo geralmente livres em espécies migradoras e adesivos em espécies sedentárias (SATO, 1999). Análises dos padrões de superfície em ovos recém-desovados mostraram projeções da ZR como glóbulos, vilos e filamentos em ovos adesivos, e ZR lisa com poros-canais ou rede fibrilar em ovos não adesivos (RIZZO *et al.*, 2002). Esses estudos mostram que as características do ovo estão relacionadas aos padrões de comportamento reprodutivo das espécies e acompanham a filogenia. Além dos arranjos de superfície, outros critérios também são necessários para caracterização e identificação dos ovos de peixes, tais como distância entre os poros-canais da ZR, diâmetro dos poros e morfologia da micropila (RIEHL, 1993; LI *et al.*, 2000).

Moléculas presentes na superfície de ovócitos têm papel determinante na fertilização e na interação do ovo com o meio. A presença de polissacarídeos ácidos na ZR torna os ovos adesivos quando em contato com a água (GURAYA, 1996). Em teleósteos, os espermatozóides ligam-se à parede do canal micropilar como primeiro nível de reconhecimento entre os gametas, ocorrendo a adesão e a fusão das membranas dos gametas na base do canal micropilar (HART, 1990; YU *et al.*, 2002). Neste reconhecimento, como em outras interações celulares, há mediação de carboidratos presentes em glicoproteínas da ZR com receptores complementares pertencentes à família das lectinas na superfície dos espermatozóides (DELL *et al.*, 1999, MENGERINK & VACQUIER, 2001; YU *et al.*, 2002).

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas naturais descritas em todos os reinos, desde de microorganismos até animais e plantas (NOSEK *et al.*, 1984; SINGH *et al.*, 1999; KILPATRICK, 2002) e apresentam sítios de ligações com açúcares específicos de polissacarídeos ou com glicoproteínas e glicolipídios (LIS & SHARON, 1998; RHODES & MILTON, 1998). Estas moléculas são excelentes ferramentas para identificação de resíduos de carboidratos, permitindo o esclarecimento de processos biológicos como vias de síntese e de endocitose de glicoconjugados, diagnósticos clínicos e determinação da estrutura de carboidratos e seus conjugados (KENNEDY *et al.*, 1995; RHODES & MILTON, 1998; SINGH *et al.*, 1999). Recentemente, uma lectina foi isolada de alvéolos corticais do peixe *Carassius auratus gibelio*, sendo a mesma lançada na superfície da ZR após fertilização, sugerindo sua participação no bloqueio da polispermia (DONG *et al.* 2004). Devido sua importância na fertilização, a glicobiologia de gametas tem sido investigada em várias classes de vertebrados, no entanto, pouca atenção tem sido atribuída aos peixes (SCHINDLER & VRIES, 1989; DELL *et al.*, 1999, MENGERINK & VACQUIER, 2001; YU *et al.*, 2002).

3. Desenvolvimento embrionário

O desenvolvimento embrionário em peixes compreende eventos morfogênicos que ocorrem desde o ovo fertilizado até a eclosão da larva (KIMMEL *et al.*, 1995). A duração da embriogênese varia entre as espécies, dependendo do tamanho dos ovos e das estratégias reprodutivas das espécies (SATO 1999; NAKATANI *et al.*, 2001).

O desenvolvimento embrionário inicia-se após a fertilização dos ovos com a segregação dos pólos animal e vegetativo e clivagem do blastodisco (LANGELAND & KIMMEL, 1997). Os blastômeros nessa fase inicial estão unidos por junções do tipo *gap* e junções de adesão (LANGELAND & KIMMEL, 1997; PELEGRI, 2003). As cateninas e caderinas, antes presentes nas junções de adesão entre ovócito e células foliculares, não são degradadas durante a maturação do ovócito, e sim estocadas como complexos protéicos para serem reutilizadas durante a embriogênese (PELEGRI, 2003). Nessa fase, as funções celulares básicas do embrião como metabolismo e divisão celular dependem dos produtos gênicos maternos processados durante a ovogênese e presentes nos ovos no momento da fertilização (PELEGRI, 2003).

Na transição entre blástula e gástrula ocorre o início da ativação do genoma do embrião com mudança gradual do padrão de divisões celulares sincrônicas para assincrônicas e início da motilidade celular, caracterizando a epibolia (WARGA & KIMMEL, 1990; KANE & KIMMEL, 1993; HILL & JOHNSTON, 1997; PELEGRI, 2003). Durante epibolia há participação do citoesqueleto, com formação de dois arranjos distintos de microtúbulos. Um dos arranjos forma uma rede densa na camada sincicial vitelínica (YSL), originada da união de blastômeros marginais, e outro se estende da YSL em direção ao pólo vegetativo (SOLNICA-KREZEL & DRIEVER, 1994).

Em zebrafish, no início da gastrulação ocorre a segregação de células que mantiveram o plasma germinativo, dando origem às células germinativas primordiais (PGCs). Essas células estão localizadas em 4 pontos aleatórios do eixo do embrião, à margem da blastoderme, mais especificamente no hipoblasto (BRAAT *et al.* 1999; RAZ, 2002). O plasma germinativo é de origem materna, sendo evidenciado, através microscopia eletrônica de transmissão, pela presença de estruturas eletrodensas conhecidas como nuages, onde mitocôndrias associam-se a moléculas de RNAs e proteínas específicas da linhagem germinativa (HOGAN JR., 1978; WYLIE, 1999, 2000; HASHIMOTO *et al.*, 2004). Na microscopia de luz, as PGCs são reconhecidas por seu grande tamanho, citoplasma levemente corado, núcleo altamente vesiculoso e nucléolo evidente (HAMAGUCHI, 1982; BRAAT *et al.* 1999). O RNA *vasa*, que codifica uma RNA helicase ATP-dependente da família DEAD Box, é um exemplo de molécula encontrada no plasma germinativo e utilizada como marcador molecular das PGCs (BRAAT *et al.*, 1999; RAZ, 2003).

Durante a gastrulação ocorre o deslocamento das células do blastodisco, levando à separação do epiblasto e hipoblasto, formação da notocorda e a diferenciação dos folhetos germinativos (MULLINS, 1999; STICKNEY *et al.*, 2000). Na epibolia, o epiblasto e a YSL expandem sobre o vitelo até ocorrer o fechamento do blastóporo (KIMMEL *et al.*, 1995). Este evento é importante na aqüicultura para determinar a taxa de fertilização, uma vez que ovos não fertilizados dividem-se por partenogênese e degeneram durante desenvolvimento embrionário e os ovos gorados não são facilmente identificados antes desta fase (WOYNAROVICH & HORVÁT, 1980; RIZZO *et al.*, 2003; SATO *et al.*, 2003b).

O primeiro somito é geralmente formado logo após a gastrulação (STICKNEY *et al.*, 2000). Evidências recentes sugerem que a via sinalizadora Notch, a qual está envolvida

na somitogênese de camundongo e de galinha, também participa na somitogênese de zebrafish (STICKNEY *et al.*, 2000). Notch é um receptor transmembrana que se liga às proteínas da família Delta e Serrate. A união do ligante ao receptor Notch faz com que este seja clivado proteoliticamente, resultando na translocação de seu domínio citoplasmático para o núcleo, o qual regulará a expressão de outros genes (STRUHL & ADACHI, 1998; STICKNEY *et al.*, 2000).

Em zebrafish, durante a fase inicial de segmentação do embrião, as PGCs migram até alcançarem o primeiro somito, formando lateralmente dois grupos. Em seguida, as PGCs migram até alcançarem o oitavo somito, onde encontram os primórdios das gônadas (BRAAT *et al.* 1999; RAZ, 2002). Estudos recentes sugerem que as células somáticas indicam a via migratória através de sinais atrativos e repulsivos (KUNWAR & LEHMAN, 2003). Um exemplo de molécula que atua durante a migração das PGCs em *zebrafish* é a quimiocina SDF-1, que é sinalizada pelas células somáticas e que se liga ao receptor Cxcr-4 encontrado nas PGCs (KNAUT *et al.*, 2002; KUNWAR & RUTH, 2003).

4. Ontogênese larval

O período larval inicia-se após a eclosão e termina com a reabsorção do vitelo e início da alimentação exógena (HELFMAN *et al.*, 2000). O grau de diferenciação da larva recém-eclodida varia entre as espécies, dependendo do tamanho do ovo (BLAXTER, 1969). A maioria das larvas de peixes de água doce eclode com boca e mandíbulas ainda não formadas, olhos despigmentados e saco vitelínico grande (NAKATANI *et al.*, 2001). Poucas espécies, como o peixe-lobo, *Anarhichas lupus*, eclode com características externas semelhantes aos juvenis e órgãos internos já diferenciados, mantendo poucas características larvais como a presença do saco vitelínico (FALK-PETERSEN & HANSEN, 2001).

Antes da abertura da boca, as larvas nutrem-se do vitelo, que é reabsorvido constantemente através de endocitose via camada sincicial vitelínica (SHAHSAVARANI, *et al.*, 2002). Para evitar aumento da mortalidade larval, alimentação exógena deve iniciar a partir do momento em que o vitelo foi completamente reabsorvido (TENGGJAROENKUL *et al.*, 2002).

O trato digestivo é originado do endoderma durante a embriogênese, havendo também a formação do fígado e do pâncreas a partir de células do endoderma (OBER *et*

al., 2003). Durante ontogênese larval, ocorre proliferação de células secretoras de muco e aumento do tamanho do fígado e do pâncreas (GORDON & HECHT, 2002). As larvas de peixes são divididas em 3 grupos de acordo com o desenvolvimento, morfologia, e secreção de enzimas no trato alimentar. O primeiro grupo apresenta um estômago funcional antes da mudança da alimentação endógena (vitelo) para exógena, como encontrado em Salmonidae e Cichlidae. O segundo incluem os que não tem um estômago funcional ou glândulas gástricas durante a fase larval, enquanto o terceiro permanece sem estômago durante a vida adulta, tais como Labridae e Cyprinidae (GORDON & HECHT, 2002). O desenvolvimento do sistema digestivo tem importância prática na piscicultura para determinação do tipo de alimentação a ser utilizada nessa fase do cultivo (TENGGAROEK *et al.*, 2002) e tem sido pouco explorado para espécies brasileiras de importância comercial (VEGA-ORLLANA, *et al.*, 2005).

O desenvolvimento do sistema circulatório tem início com o surgimento do coração no período de somitogênese do embrião, continuando durante o desenvolvimento da larva (LANGELAND & KIMMEL, 1997; YELON & STAINIER, 1999; HU *et al.*, 2000). Neste período, as células sanguíneas são bombeadas através de sinusóides presentes no saco vitelínico e nas membranas das nadadeiras (HELFMAN *et al.*, 2000).

Durante o desenvolvimento larval, a presença dos órgãos sensoriais é importante para a procura de alimento e fuga de predadores (MOORMAN, 2001). O olho é o primeiro a se desenvolver, principalmente em larvas pelágicas (SHAND, 1997). O desenvolvimento dos botões gustativos em peixes é pouco conhecido, bem como a descrição completa de sua formação e morfologia. Em peixes, o padrão de distribuição dos botões gustativos varia entre as espécies, podendo ser encontrados, além da cavidade orofaríngea e da boca, na superfície de barbatanas, lábios, cabeça ou sobre todo o corpo (MATSUOKA, 2001; HANSEN *et al.*, 2002). Em peixes, os neuromastos são constituídos por mecanorreceptores responsáveis por perceber movimentos na água, estando localizados superficialmente na epiderme, constituindo os neuromastos livres, e/ou em sulcos e canais, formando o sistema da linha lateral (MATSUOKA, 2001; DIAZ *et al.*, 2003).

A presença de órgão adesivo em larvas de peixes varia entre as espécies, dependendo das estratégias reprodutivas (BRITZ, *et al.*, 2000). Em espécies sedentárias, como *Cichlasoma dimerus*, o órgão adesivo ajuda a prevenir a dispersão pelas correntes, facilitando o cuidado parental (MEIJIDE & GUERRERO, 2000).

II. OBJETIVOS

1. Objetivo geral

Analisar comparativamente superfície ovocitária, resíduos de açúcares terminais de estruturas ovocitárias, e a morfogênese durante embriogênese e ontogênese larval de *B. orthotaenia*, *L. obtusidens*, *P. argenteus* e *S. brasiliensis*, peixes de interesse comercial da bacia do rio São Francisco.

2. Objetivos específicos

- Comparar a morfologia, densidade e distância entre os poros-canais da zona radiata, ao microscópio eletrônico de varredura (MEV), na superfície dos ovócitos recém-desovados.
- Identificar açúcares terminais em ovócitos através de técnicas histoquímicas de carboidratos;
- Identificar e estabelecer a duração das diferentes fases do desenvolvimento embrionário ao estériomicroscópio;
- Analisar o desenvolvimento embrionário ao MEV;
- Determinar o comprimento corporal, e o comprimento e a altura do saco vitelínico durante ontogênese larval;
- Analisar a organogênese através de histologia;
- Determinar a fase em que ocorrem a reabsorção total do saco vitelínico e a abertura da boca;
- Analisar o desenvolvimento e a distribuição de órgãos sensoriais e órgãos adesivos;
- Comparar a morfologia de ovos, embriões e larvas com as estratégias reprodutivas das espécies em estudo.

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. Desova induzida

Reprodutores de *B. orthotaenia*, *L. obtusidens*, *P. argenteus* e *S. brasiliensis* foram submetidos à reprodução induzida por hipofiseção, utilizando 2 injeções de extrato bruto de hipófise de carpa comum na Estação de Hidrobiologia e Piscicultura de Três Marias – CODEVASF, de acordo com a rotina da Estação (SATO *et al.*, 2003b). A fertilização foi realizada a seco, misturando-se sêmen aos ovócitos extruídos e adicionando, em seguida, água à mistura. Os ovos fertilizados foram mantidos em incubadoras do tipo funil com 30L de capacidade, com água circulante a 23-27°C. A embriogênese e a ontogênese larval foram monitoradas até a reabsorção do saco vitelínico com auxílio de estereomicroscópio.

2. Histologia e histoquímica de carboidratos

Amostras de ovários maduros e ovócitos recém-desovados foram fixadas em líquido de Bouin por 8-12 h, incluídas em parafina, seccionadas com 5-7 µm de espessura, coradas com hematoxilina e eosina, e submetidas às seguintes técnicas histoquímicas: ácido periódico Schiff (PAS), Alcian blue pH 2,5 e Alcian blue pH 0,5 (PEARSE, 1985).

Para identificação de resíduos terminais de carboidratos nos ovócitos, secções de 5-7 µm foram submetidas à histoquímica de lectinas conjugadas com peroxidase (Sigma Aldrich) em concentrações determinadas previamente por SCARPELLI (2005) (Tab. I). O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com peróxido de hidrogênio 3% em metanol por 30 min e o bloqueio de sítios inespecíficos, com gelatina tipo A 3% de pele suína (Sigma Aldrich Co.) em tampão tris-HCl pH 7,6 por 1 h, com traços de cloreto de cálcio e magnésio (RHODES & MILTON, 1998). A incubação com lectinas foi realizada em câmara úmida por 1h 30 min à temperatura ambiente e a revelação com 3-3'-diaminobenzidina (DAB) em solução tampão Tris-HCl, pH 7,6, contendo 0,2 µg/ml de peróxido de hidrogênio, durante 10 min à temperatura ambiente. O controle da reatividade das lectinas foi realizado com lâminas incubadas apenas com o tampão, omitindo-se as lectinas.

Tabela I: Lectinas utilizadas para caracterização histoquímica de resíduos de carboidratos.

Lectina	Sigla	Especificidade	µg/mL
<i>Canavalia ensiformes</i>	ConA	α-manose/α-glicose	10
<i>Maclura pomifera</i>	MPA	α-galactose/α-GalNAc	20
<i>Psophocarpus tetragonolobus</i>	PTL	galactose/GalNAc	40
<i>Helix pomatia</i>	HPA	GalNAc	20
<i>Artocarpus integrifolia</i>	JFL	α-galactose	40
<i>Arachis hypogea</i>	PNA	Galβ1-3 GalNAc	40
<i>Glycine max</i>	SBA	GalNAc	20
<i>Tetragonolobus purpurea</i>	LTA	α-L-fucose	20
<i>Ulex europaeus</i>	UEA-I	α-L-fucose	20
<i>Triticum vulgaris</i>	WGA	GlcNAc /ácido siálico	40

GalNAc: N-Acetil Galactosamina; β-GlcNAc: N-Acetil β-Glicosamina.

Para estudo da organogênese, larvas fixadas em líquido de Bouin por 8-12 h foram incluídas em glicol-metacrilato, seccionadas em série com 5 µm de espessura e coradas com azul de toluidina-borato de sódio 1%.

3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Ovócitos recém-desovados, embriões e larvas foram fixados em glutaraldeído 3% ou solução Karnovsky modificado (glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 2%), ambos em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3 durante 12 a 24 h a 4 °C. Em seguida, as amostras foram submetidas à dupla pós-fixação com tetróxido de ósmio 1% durante 2h à temperatura ambiente, intercaladas com solução de ácido tânico 1% como mordente, durante 20 min. Os espécimes foram desidratados e submetidos à secagem em ponto crítico com CO₂, montados em suportes de alumínio, metalizados com ouro e analisados ao MEV, modelos DSM-950 da Zeiss e JSM-840A da JEOL, a 20-25 KV. As imagens obtidas foram digitalizadas, armazenadas e tratadas para ajuste de contraste e brilho.

4. Morfometria e análise estatística

Amostras de larvas foram coletadas diariamente (n=10) a partir do momento da eclosão (dia 0) até a reabsorção total do saco vitelínico, fixadas em formol neutro 4% e submetidas à biometria, utilizando-se ocular micrométrica acoplada ao estereomicroscópio. Mediram-se o comprimento total, e comprimento e altura do saco vitelínico, calculando, em seguida a média e o desvio-padrão.

Imagens digitalizadas de ovócitos recém-desovados ao MEV foram submetidas à morfometria pelo programa *UTHSCSA-Image Tool* versão 3.00 para *Windows*. Foram mensuradas a densidade e a distância entre os poros-canais da zona radiata, utilizando-se de 10 imagens de 4 a 10 ovócitos de cada espécie.

Os dados biométricos das larvas e dos ovócitos foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov and Smirnov, à análise de variância ANOVA e ao teste de Tukey com $p < 0,05$, utilizando *GraphPad InStat* versão 3.00 e *GraphPad Prism* versão 4.00, ambos para *Windows*.

IV. RESULTADOS

1. Histologia e histoquímica de ovócitos

Ovários maduros de *B. orthotaenia*, *L. obtusidens*, *P. argenteus* e *S. brasiliensis* apresentaram predominância de folículos vitelogênicos com alvéolos corticais concentrados no ooplasma periférico, glóbulos de vitelo acidófilos preenchendo a maior parte do ooplasma, núcleo central ou ligeiramente excêntrico e zona radiata acidófila com camadas interna e externa distintas, células foliculares pavimentosas e teca delgada (Fig. 1A-B). Micrópila em forma de funil ocluída por célula micropilar ocorreu no pólo animal dos ovócitos vitelogênicos das quatro espécies (Fig. 1G).

Através da histoquímica de carboidratos (Tab. II) (Fig. 1C-D) detectaram-se polissacarídeos neutros nos glóbulos de vitelo e zona radiata interna e polissacarídeos neutros e carboxilados nas células foliculares das quatro espécies. A zona radiata externa apresentou polissacarídeos neutros, carboxilados e sulfatados em *S. brasiliensis*, enquanto as demais espécies apresentaram polissacarídeos neutros e carboxilados. Os alvéolos corticais em *L. obtusidens* apresentaram polissacarídeos neutros, enquanto em *B. orthotaenia*, *P. argenteus* e *S. brasiliensis* apresentaram polissacarídeos carboxilados.

Tabela II: Reatividade das estruturas ovocitárias à histoquímica de carboidratos em quatro espécies de peixes de interesse comercial da bacia do rio São Francisco.

	<i>B. orthotaenia</i>			<i>L. obtusidens</i>			<i>P. argenteus</i>			<i>S. brasiliensis</i>		
	PAS	AB 2,5	AB 0,5	PAS	AB 2,5	AB 0,5	PAS	AB 2,5	AB 0,5	PAS	AB 2,5	AB 0,5
CF	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-
GV	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
ZRE	++	+	-	++	+	-	++	+	-	++	+	+
ZRI	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
AC	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-

+: reação positiva; ++: reação fortemente positiva; -: reação negativa; CF: Célula folicular; GV: Glóbulo de vitelo; ZRE: Zona radiata externa; ZRI: Zona radiata interna; AC: Alvéolo cortical; PAS: Periodic Acid Schiff; AB 2,5: Alcian Blue em pH 2,5; AB 0,5: Alcian Blue em pH 0,5.

A reatividade das estruturas ovocitárias às lectinas (Tab. III) (Fig. 1E-G) evidenciou células foliculares positivas para todas as lectinas utilizadas, e glóbulos de vitelo e zona radiata interna negativos nas quatro espécies. Zona radiata externa apresentou reação positiva para MPA, HPA, JFL, PNA, SBA e WGA em todas as espécies e positivas para LTA e UEA-I apenas em *L. obtusidens* e *P. argenteus*. Os alvéolos corticais apresentaram reação positiva para UEA-I em todas as espécies, para MPA e LTA em *L. obtusidens* e para MPA, PTL e PNA em *S. brasiliensis*.

Tabela III: Reatividade das lectinas na zona radiata externa (ZRE) e alvéolos corticais (AC) de ovócitos de quatro espécies de peixes de interesse comercial da bacia do rio São Francisco.

	<i>B. orthotaenia</i>		<i>L. obtusidens</i>		<i>P. argenteus</i>		<i>S. brasiliensis</i>	
	ZRE	AC	ZRE	AC	ZRE	AC	ZRE	AC
ConA	+	-	+	-	+	-	+	-
MPA	+	-	+	+	+	-	+	+
PTL	-	-	-	-	-	-	-	+
HPA	+	-	+	-	+	-	+	-
JFL	+	-	+	-	+	-	+	-
PNA	+	-	+	-	+	-	+	+
SBA	+	-	+	-	+	-	+	-
LTA	-	-	+	+	+	-	-	-
UEA-I	-	+	+	+	+	+	-	+
WGA	+	-	+	-	+	-	+	-

+: reação positiva; -: reação negativa; ZRE: Zona radiata externa; AC: Alvéolo cortical; ConA: *Canavalia ensiformes*; MPA: *Maclura pomifera*; PTL: *Psophocarpus tetragonolobus*; HPA: *Helix pomatia*; JFL: *Artocarpus integrifolia*; PNA: *Arachis hypogea*; SBA: *Glycine Max*; LTA: *Tetragonolobus purpúrea*; UEA-I: *Ulex europaeus*; WGA: *Triticum vulgare*.

2. Ultra-estrutura de superfície ovocitária

A micrópila apresentou vestíbulo com 12 pregas em *B. orthotaenia* e 9 em *S. brasiliensis* (Fig. 2A-B). Não foram observadas pregas no vestíbulo da micrópila de *L. obtusidens* e *P. argenteus* (Fig. 2C-D). A micrópila de *L. obtusidens* apresentou formato irregular do vestíbulo e a de *P. argenteus* apresentou-se com vestíbulo circular (Fig. 2C-D).

A superfície dos ovócitos recém-desovados de *P. argenteus* apresentou rede fibrilar recobrando os poros-canais da zona radiata, enquanto as demais espécies apresentaram poros-canais circundados por pequenos grânulos (Fig 2E-F). A rede fibrilar dos ovócitos de *P. argenteus* foi caracterizada por densa rede de delicadas fibrilas concentradas no pólo vegetativo (Fig. 2F), tornando-se progressivamente menos densa em direção à micrópila (Fig 2E).

Os poros-canais do pólo vegetativo apresentaram maior densidade e menor distância entre si nos ovócitos de *L. obtusidens*, e menor densidade e maior distância em *B. orthotaenia* e *S. brasiliensis* (Tab. IV). A quantificação dos poros-canais na superfície dos ovócitos de *P. argenteus* não foi realizada devido a presença da rede fibrilar encobrindo totalmente os poros-canais no pólo vegetativo.

Tabela IV: Morfometria (média \pm desvio-padrão) da superfície de ovócitos recém-desovados de espécies de interesse comercial da bacia do rio São Francisco ao MEV.

	N	<i>B. orthotaenia</i>	<i>S. brasiliensis</i>	<i>L. obtusidens</i>
Nº poros-canais / μm^2	10	3,64 \pm 0,66 a	3,59 \pm 0,52 a	4,22 \pm 0,55 b
Distancia poros-canais (μm)	10*	0,61 \pm 0,06 a	0,62 \pm 0,07 b	0,51 \pm 0,05 c
Nº de pregas vestíbulo	4	12	9	-

N: Número de campos/espécies analisados. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas ($p < 0,05$); Asterisco: foram mensuradas 10 estruturas de cada campo.

3. Desenvolvimento embrionário

A embriogênese ocorreu de forma semelhante nas quatro espécies, sendo dividida nos principais eventos da morfogênese (Tab. V).

Clivagem

Após a fertilização, o ooplasma acumulou-se no pólo animal, originando uma protuberância em forma de disco, o blastodisco unicelular (zigoto). Divisões mitóticas sincrônicas originaram blastômeros de tamanhos regulares (Fig. 3A-B). Durante essa fase, encontraram-se embriões com 2, 4 e 8 blastômeros numa mesma amostra. A partir de 32 blastômeros, as clivagens tornaram-se assimétricas (Fig. 3C).

Blástula alta

Nessa fase, a blastoderme apresentou forma de cúpula (Fig. 3D). Os blastômeros continuaram a se dividir em vários planos de clivagem. Os blastômeros externos achataram-se, originando as células envelopadoras (EVC), enquanto os blastômeros mais internos formaram as *deep cells* (Fig. 4A-C). Ao final dessa fase, os blastômeros que estavam à margem do blastodisco fundiram-se, formando a camada sincicial vitelínica (YSL) constituída de faixa citoplasmática contínua e vários núcleos (Fig. 5D). Ao final dessa fase, iniciou a epibolia com migração da YSL e dos blastômeros em direção a extremidade do pólo vegetativo. Não foi observado processo de cavitação da blástula.

Gástrula

Iniciou-se quando a YSL se encontrava no equador do compartimento vitelínico, 50% de epibolia. Essa fase caracterizou-se pelo movimento de involução, no qual as *deep cells* que se moviam em direção ao pólo vegetativo retornaram ao pólo animal originando os folhetos germinativos, epiblasto e hipoblasto. Durante a gastrulação, as EVC permaneceram com forma achatada, enquanto as *deep cells* apresentaram forma irregular, com projeções citoplasmáticas semelhantes a pseudópodes (Fig. 4B-C). A YSL apresentou microvilosidades interagindo com as expansões citoplasmáticas das *deep cells* (Fig. 4C). Durante gastrulação, ocorreram também formação do eixo embrionário, diferenciação do epiblasto em ectoderma e do hipoblasto em mesoderma e endoderma. No término da

gastrulação, 100% de epibolia, ocorreu o fechamento do blastóporo (Fig. 3E) com 7-8 h para *B. orthotaenia* e *S. brasiliensis*, e 8-9 h para *L. obtusidens* e *P. argenteus* a 23-26°C.

Somitogênese

Essa fase iniciou-se logo após o fechamento do blastóporo, ocorrendo simultaneamente o crescimento diferenciado da porção cranial da haste neural. Em seguida, cavitação e constrictões da haste neural originaram o tubo neural, subdividindo-se em: prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo. Observou-se o desenvolvimento da vesícula óptica entre 11 e 14 somitos. Na fase de 21-24 somitos observaram-se a formação do cálice óptico, da vesícula ótica (Fig. 5A-D) e contrações entre a cabeça e o saco vitelínico, indicando o início do desenvolvimento do coração.

Entre 24 e 28 somitos, ocorreu a liberação da cauda (Fig. 3F), culminando no início da movimentação dos embriões. Nessa fase, as células da notocorda apresentaram aspecto vacuolizado e as células dos somitos alongaram-se (Fig. 5C).

Eclosão

A eclosão ocorreu entre 17 e 18 h para *B. orthotaenia* e *S. brasiliensis* entre 20 e 21 h para *L. obtusidens* e *P. argenteus* a 23-27°C (Fig. 3G). Após a eclosão, todas as larvas apresentaram início do desenvolvimento das fossas nasais. As larvas de *S. brasiliensis* e *B. orthotaenia* apresentaram órgão adesivo. A YSL apresentou projeções citoplasmáticas durante o desenvolvimento embrionário e ontogênese larval para a reabsorção do vitelo (Fig. 5D).

Tabela V: Início (*hh:mm*) dos principais eventos da morfogênese durante embriogênese de quatro espécies de interesse comercial da bacia do rio São Francisco após fertilização à temperatura 23-27°C.

Fases do desenvolvimento	<i>B. orthotaenia</i>			<i>L. obtusidens</i>			<i>P. argenteus</i>			<i>S. brasiliensis</i>		
	Tempo	T	HG	Tempo	T	HG	Tempo	T	HG	Tempo	T	HG
Clivagem	00:40	25	17,0	00:40	23	16,0	00:35	23	14,0	00:40	25	20
Blástula	03:40	25	92,5	03:30	23	80,5	03:10	23	73,6	02:20	26	56,4
Gástrula	06:10	25	155,0	05:30	23	126,5	05:10	23	119,6	04:30	25,5	115,1
Fechamento do blastóporo/Somitogênese	07:40	25	192,5	08:15	23	188,6	09:00	23	207,0	07:00	26	180,1
Formação da vesícula óptica	09:40	26	244,5	11:00	23	253,0	11:20	23	257,0	09:00	27	234,1
Formação do cálice óptica e vesícula ótica	11:10	27	285,0	13:30	23	310,5	14:00	23	322,0	11:00	26	286,1
Liberação da cauda	13:00	27	333,5	15:50	23	363,4	16:30	23	379,5	13:00	24	334,1
Eclosão da larva	17:10	27	447,0	20:30	23	471,5	20:10	23	464,6	18:00	24	454,1

T: temperatura em °C; HG: Horas-graus após fertilização (HG = Σ temperatura x tempo em horas).

4. Ontogênese Larval

Durante o desenvolvimento larval, o comprimento e a altura do saco vitelínico diminuíram, enquanto o comprimento corporal aumentou, ocorrendo mais rapidamente em *S. brasiliensis*, seguido por *B. orthotaenia*, *P. argenteus* e *L. obtusidens* (Tab. VI).

A reabsorção total do saco vitelínico variou de acordo com a espécie, ocorrendo após o 2º dia em *S. brasiliensis*, 3º em *B. orthotaenia*, 4º em *P. argenteus* e 5º em *L. obtusidens*. A abertura da boca ocorreu um dia antes da reabsorção total do saco vitelínico em todas as espécies.

Durante ontogênese larval, observam-se os desenvolvimentos de:

Arcos branquiais

O esboço dos arcos branquiais em *B. orthotaenia* e *S. brasiliensis* formou-se logo após a eclosão das larvas, em *P. argenteus* no 1º dia após eclosão, e em *L. obtusidens* após o 2º dia (Fig. 6A). Para as quatro espécies, o início da condrogênese e da irrigação sanguínea dos arcos branquiais ocorreu concomitantemente ao desenvolvimento da boca (Fig. 6C-D).

Bexiga gasosa

Esboço da bexiga gasosa surgiu com 2 dias para *B. orthotaenia* e *S. brasiliensis*, e com 3 dias para *L. obtusidens* e *P. argenteus*, apresentando epitélio de revestimento simples pavimentoso (Fig. 6C).

Pronefro: rim primitivo

Nas quatro espécies, o pronefro se desenvolveu de forma semelhante, apresentando, logo após a eclosão, dois túbulos laterais de epitélio simples cúbico sem lume aparente, o qual tornou-se evidente no 1º dia após eclosão. A região cranial tornou-se enovelada (Fig. 6D), e a região caudal retilínea (Fig. 6I), acompanhando dorsalmente o intestino (Fig. 7A). Os túbulos do pronefro caudal se uniram e desembocaram, junto ao intestino, na papila urogenital (Fig. 7B).

Células Germinativas Primordiais

As células germinativas primordiais (PGCs) foram identificadas a partir 1º após eclosão das larvas entre o intestino e o rim (Fig. 7A) por apresentarem-se volumosas, núcleo vesiculoso com nucléolo evidente e citoplasma basófilo. Dorsalmente às PGCs, observaram-se melanóforos dendríticos.

Coração

A formação do coração iniciou-se durante a somitogênese. Com 1 dia após eclosão das larvas, o coração apresentava constrição de suas paredes formando seio venoso, átrio, ventrículo e bulbo arterial. O miocárdio do átrio era constituído por uma monocamada celular, enquanto no ventrículo, o miocárdio tinha de 2 a três camadas de células. Ao longo do desenvolvimento larval, apenas o miocárdio do ventrículo aumentou sua espessura (Fig. 7C-D).

Trato digestivo

Observou-se início da formação do fígado na região dorsal do saco vitelínico logo após a eclosão em *B. orthotaenia* e *S. brasiliensis* e com 1 dia após eclosão em *L. obtusidens* e *P. argenteus* (Fig. 6B). Antes da completa reabsorção do saco vitelínico das quatro espécies, o pâncreas já continha ilhota pancreática única (Fig. 6D, G) e o fígado apresentava-se vascularizado (Fig. 6E-F).

Logo após a eclosão das larvas, o intestino apresentava-se apenas como um túbulo com epitélio de revestimento simples sem lume evidente. O intestino das quatro espécies apresentou epitélio de revestimento simples, prismático com borda estriada e células caliciformes, e presença de pregueamento da mucosa em *B. orthotaenia* e *S. brasiliensis* (Fig. 6H).

Com a abertura da boca, observou-se o desenvolvimento de alvéolos germe dentários nas larvas de *B. orthotaenia* e *S. brasiliensis* a partir do 1º dia após a eclosão (Fig. 7E-F), e estruturas de apreensão em larvas *P. argenteus* a partir do 4º dia (Fig. 9E), evidenciadas apenas ao MEV. Na histologia, observou-se o desenvolvimento de base cartilaginosa abaixo alvéolos germe dentários de *B. orthotaenia* e *S. brasiliensis*. *L. obtusidens* não apresentou dentes ou estruturas de apreensão durante o período amostrado. Antes da reabsorção do saco vitelínico, observou-se canibalismo entre as larvas de *B. orthotaenia* e *S. brasiliensis*.

Sistema nervoso/sensorial

Para as quatro espécies a diferenciação de regiões do tubo neural em prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo ocorreu simultaneamente à somitogênese. A diferenciação da massa cinzenta e branca ocorreu a partir do 1º dia após a eclosão das larvas (Fig. 6A). Após a reabsorção do saco vitelínico, observaram-se neurônios com núcleo vesiculoso, nucléolo evidente e presença de manchas basófilas no citoplasma (Fig. 8B).

A partir da vesícula ótica houve o desenvolvimento do ouvido interno. As larvas com 1 dia já apresentaram estruturas semelhantes a neuromastos livres no interior do ouvido. Antes a reabsorção total do saco vitelínico, o ouvido interno já apresentava os canais anterior, lateral e posterior definidos (Fig. 8C).

Logo após a eclosão observou-se o desenvolvimento inicial da fossa nasal, com células olfativas contendo pequenos cílios (Fig. 9A-B). A partir de 1-2 dias, as fossas nasais eram constituídas por epitélio estratificado com células prismáticas ciliadas e início da invaginação da fossa nasal (Fig. 9C-D).

Os botões gustativos surgiram após a abertura da boca, localizando-se apenas na superfície dos lábios (Fig. 9E-F).

A presença de neuromastos livres na superfície das larvas ocorreu a partir do 1º dia após a eclosão para todas as espécies, localizando-se na cabeça, principalmente próximo às orbitais dos olhos, e na região médio-lateral do tronco. Os neuromastos foram caracterizados histologicamente por um grupo de células sensitivas com citoplasma fortemente basófilo recobertas externamente por uma cúpula gelatinosa, e um grupo de células de suporte com citoplasma fracamente corado (Fig. 8D). Na ultraestrutura, as células sensitivas apresentaram abaixo da cúpula gelatinosa um cinocílio e uma fileira de estereocílios por célula sensitiva (Fig. 10A-B). Os neuromastos variaram morfológicamente entre as espécies, apresentando maior similaridade entre *L. obtusidens* e *P. argenteus*, cujos neuromastos eram mais achatados, com cúpula gelatinosa alongada e base da cúpula com forma amendoada (Fig. 10C-D), e entre *B. orthotaenia* e *S. brasiliensis*, cujos neuromastos eram mais esféricos, com cúpula gelatinosa mais curta e base da cúpula arredondada (Fig. 10E-F).

Órgãos adesivos

S. brasiliensis e *B. orthotaenia* apresentaram órgão adesivo na cabeça a partir da eclosão das larvas, com seu desenvolvimento máximo no 1º e 2º dias (Fig. 8E-I e 11A-E),

regredindo totalmente após o 3º dia. Os órgãos adesivos de ambas espécies eram histologicamente semelhantes, apresentando células prismáticas com núcleo basal e projeções citoplasmáticas na porção apical (Fig. 8E-I). Observaram-se, na ultraestrutura, microrrugosidades na superfície dessas células, havendo maior heterogeneidade em *S. brasiliensis* (Fig. 11C-F).

Tabela VI: Dados biométricos (média ± desvio-padrão) (mm) de larvas de peixes de interesse comercial da bacia do rio São Francisco em condições experimentais até a reabsorção total do saco vitelínico, com temperatura entre 23-26°C.

DPH	<i>B. orthotaenia</i>			<i>L. obtusidens</i>			<i>P. argenteus</i>			<i>S. brasiliensis</i>		
	CT	CSV	ASV	CT	CSV	ASV	CT	CSV	ASV	CT	CSV	ASV
0	3,27±0,11a	1,15±0,03a	0,71±0,03a	3,16±0,11a	0,96±0,13a	0,65±0,04a	4,39±0,07a	1,52±0,04a	0,76±0,05a	4,13±0,02a	1,41±0,05a	0,72±0,03a
1	3,87±0,17b	1,12±0,05a	0,67±0,04a	4,10±0,10b	0,99±0,04a	0,53±0,05b	5,84±0,10b	1,69±0,04b	0,68±0,03b	7,74±0,12b	1,06±0,05b	0,43±0,07b
2	5,94±0,23c	0,98±0,10b	0,53±0,05b	4,58±0,15c	0,87±0,03b	0,42±0,05c	6,48±0,12c	1,35±0,04c	0,54±0,05c	8,61±0,45c	-	-
3	6,07±0,30c	-	-	4,84±0,18d	0,82±0,06b	0,39±0,05cd	6,78±0,23d	1,14±0,04d	0,45±0,04d	-	-	-
4	7,28±0,19d	-	-	4,84±0,09d	0,52±0,07c	0,34±0,05d	7,00±0,31d	-	-	-	-	-
5	-	-	-	4,94±0,08d	-	-	8,60±0,20e	-	-	-	-	-

DPH: dias após eclosão; CT: comprimento total; CSV: comprimento do saco vitelínico; ASV: altura do saco vitelínico; Letras diferentes: diferença significativa ($p < 0,05$; N = 10).

V. DISCUSSÃO

No presente trabalho, analisou-se a superfície de ovócitos e o desenvolvimento inicial de quatro espécies de peixes da bacia do rio São Francisco através de análises histológicas, histoquímica de carboidratos e ao MEV. Apesar de vários estudos terem analisado a dinâmica da ovogênese, poucas investigações identificaram os resíduos de carboidratos presentes nos ovócitos de peixes (NOSEK *et al.*, 1984; SCHINDLER & VRIES, 1989; MANDICH *et al.*, 2002; YU *et al.*, 2002; SCARPELLI, 2005) e o desenvolvimento inicial de peixes neotropicais (NAKATANI *et al.*, 2001). Além de contribuir para o conhecimento da biologia de ovócitos de peixes, este tipo de abordagem fornece subsídios para compreensão dos mecanismos de interação entre gametas, entre ovo e meio ambiente e o relacionamento filogenético entre Characiformes.

1. Ovócitos

Os ovócitos vitelogênicos das quatro espécies estudadas apresentaram padrão morfológico e histoquímico semelhantes quanto aos glóbulos de vitelo, zona radiata interna e células foliculares, variando quanto à constituição dos alvéolos corticais e zona radiata externa que foram espécie-específicos como também detectado por outros autores (BAZZOLI & RIZZO, 1990; BAZZOLI, 1992; BAZZOLI & GODINHO, 1994; RIZZO *et al.*, 1998; MOTTA *et al.*, 2005).

Polissacarídeos ácidos são comumente encontrados na superfície de ovos adesivos, como na pirambeba *Serrasalmus brandtii* (RIZZO & BAZZOLI, 1991), em *Romanichthys valsanicola* (RIEHL & PATZNER, 1998), e em traíras (SCARPELLI, 2005). Apesar da presença de polissacarídeos neutros e ácidos na zona radiata externa, os ovos das espécies estudadas não são adesivos (SATO *et al.*, 2003a). Estas moléculas também estão presentes nos alvéolos corticais, sendo liberados no espaço perivitelínico durante a reação cortical, interagindo com a zona radiata, evitando a polispermia (TYLER & SUMPTER, 1996).

A zona radiata interna e glóbulos de vitelo não apresentaram reatividade para nenhuma das lectinas analisadas. De fato, a camada interna da zona radiata, que confere proteção mecânica ao embrião em desenvolvimento, é constituída predominantemente por proteínas, contendo poucos resíduos de carboidratos (BRIVIO *et al.*, 1991;

BONSIGNORIO *et al.*, 1996; GURAYA, 1996; MURATA *et al.*, 1997), sendo homóloga à zona pelúcida de mamíferos (MURATA *et al.*, 1997; SCAPIGLIATI *et al.*, 1999).

A zona radiata externa mostrou reatividade para quase todas as lectinas utilizadas. Reação positiva para LTA e UEA-I, específica para α -L-fucose, foi detectada em *L. obtusidens* e *P. argenteus*. Há evidências que os carboidratos tem papel na ligação espécie-específica entre gametas de vertebrados (MENGERINK & VACQUIER, 2001). Estudos têm demonstrado que oligossacarídeos de fucose podem mediar a ligação inicial entre gametas e início da reação acrossômica em ouriço do mar (DELL *et al.*, 1999). A interação carboidrato-carboidrato foi demonstrada em truta entre gametas de truta arco-íris, mais especificamente entre o gangliosídeo (KDN)GM3 ($\text{KDN}\alpha 2 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 4\text{Glc}\beta 1$), abundante na superfície do espermatozóide, e Gg3 ($\text{GalNAc}\beta 4\text{Gal}\beta 4\text{Glc}\beta 1$), encontrado na região micropilar dos ovos dessa espécie (YU *et al.*, 2002). Fator de iniciação de motilidade espermática reconhecido pela lectina ConA na região micropilar de ovos de arenque marinho já foi identificado e isolado (PILLAI *et al.*, 1993).

Em *L. obtusidens*, os alvéolos corticais apresentaram polissacarídeos neutros, e em *B. orthotaenia*, *P. argenteus* e *S. brasiliensis*, polissacarídeos carboxilados, enquanto a histoquímica de lectinas evidenciou a presença de fucose para todas as espécies, galactose e GalNAc em *L. obtusidens* e *S. brasiliensis*, e Gal β 1-3 GalNAc apenas para *S. brasiliensis*. Estudo recente utilizando lectinas com diferentes especificidades também demonstrou variação no conteúdo dos alvéolos corticais em várias espécies de teleósteos nototenioides (MOTTA *et al.*, 2005). Além das variações espécie-específicas no conteúdo dos alvéolos corticais, também podem ocorrer variações na composição das vesículas corticais durante o desenvolvimento ovocitário (OHTA *et al.*, 1990).

Lectinas com mesma especificidade podem apresentar diferenças na afinidade de ligação pelo resíduo de carboidrato reconhecido (HAYAT, 1993; LIS & SHARON, 1998), como observado no presente trabalho pela reação positiva de UEA-I e negativa de LTA, ambas com especificidade para α -L-fucose, em alvéolos corticais de *B. orthotaenia*, *P. argenteus* e *S. brasiliensis*.

No presente estudo, além das diferenças observadas na constituição dos alvéolos corticais e da zona radiata externa, observou-se também diferenças ultra-estruturais na superfície dos ovócitos. A presença de rede fibrilar observada em *P. argenteus* foi relatada em *Prochilodus affinis* (RIZZO & BAZZOLI, 1993) e *Prochilodus scrofa* (RIZZO *et al.*, 2002), e a diferença na densidade entre poros-canais observada no presente estudo também

foi constatada entre ovos de algumas espécies de peixes Perciformes (LI *et al.*, 2000). Zona radiata com poros-canais ou rede fibrilar são geralmente encontradas em ovos não adesivos (RIZZO & BAZZOLI, 1993; RIZZO *et al.*, 1998; RIZZO *et al.*, 2002), ocorrendo também em ovos adesivos como na traíra, *Hoplias malabaricus* (SCARPELLI, 2005).

O aspecto ultraestrutural da micrópila é importante para identificação de ovos (RIEHL, 1993; LI *et al.*, 2000). A micrópila das quatro espécies em estudo apresentou forma de funil, similar a salmonídeos e truta (GROOT & ALDERDICE, 1985), *P. affinis* (RIZZO & BAZZOLI, 1993), alguns anostomídeos e *Salminus hilarii* (RICARDO *et al.*, 1996) sendo também o tipo mais freqüente relatado na literatura (HART, 1990; GURAYA, 1996). A micrópila de *B. orthotaenia* e *S. brasiliensis* mostraram maior similaridade, apresentando pregas no vestíbulo micropilar, que podem ser uma estratégia para facilitar a fertilização nestas espécies. Presença de pregas proeminentes em espiral na parede do vestíbulo micropilar foi relatado em zebrafish (HART & DONOVAN, 1983). Outras estruturas como filamentos de ancoragem circundando a micrópila são observados em várias espécies de peixes como Gobiesocidae (BREINING & BRITZ, 2000) e piranhas *Serrasalmus spilopleura* (RIZZO *et al.* 2002; BARRETO, 2001) e *Serrasalmus nattereri* (WIRZ-HLAVACEK & HART, 1990), sendo responsável pela fixação do ovo ao substrato nessas espécies. Embora o significado funcional das variações ultra-estruturais e dos açúcares presentes na superfície ovocitária não terem sido completamente esclarecidos, ambos podem ser importantes no processo de fertilização, na adesividade de ovos e proteção contra patógenos no meio ambiente.

2. Desenvolvimento embrionário

A embriogênese ocorreu de forma semelhante nas quatro espécies, como também relatado em outros teleósteos neotropicais (CARDOSO *et al.*, 1995; ANDRADE-TALMELLI *et al.*, 2001; LUZ *et al.*, 2001; MORRISON *et al.*, 2001; NAKATANI *et al.*, 2001; REYNALTE-TATAJE *et al.*, 2001; BORÇATO *et al.*, 2004). No presente estudo, durante a clivagem, os blastômeros sofreram divisões mitóticas simétricas e simultâneas, similar a zebrafish (KIMMEL *et al.*, 1995). Os blastômeros nessa fase mantêm-se unidos por junções do tipo *gap* e junções de adesão (LANGELAND & KIMMEL, 1997) e, enquanto as divisões mitóticas são simétricas e simultâneas, as funções celulares básicas do embrião como metabolismo e divisão celular dependem de produtos gênicos maternos

processados durante a ovogênese (PELEGRI, 2003). Nesse período, observaram-se embriões com diferenças no número de células, apesar de apresentarem o mesmo tempo de desenvolvimento. Essa assincronia durante a clivagem foi relatada em zebrafish (KIMMEL *et al.*, 1995) e na tilápia, *Oreochromis niloticus* (MORRISON *et al.*, 2001), mesmo para ovos fertilizados simultaneamente e mantidos sob ótimas condições. A partir de 32 blastômeros, as clivagens tornaram-se assimétricas nas quatro espécies em estudo. Essa heterogeneidade no tamanho das células foi constatada a partir da fase de 16 blastômeros para *O. niloticus* (MORISSON *et al.*, 2001) e 32 blastômeros em zebrafish (KIMMEL *et al.*, 1995; LANGELAND & KIMMEL, 1997).

A blástula alta das quatro espécies não apresentou cavitação do blastodisco. Em *O. niloticus* (MORRISON *et al.*, 2001) e zebrafish (KIMMEL *et al.*, 1995) foram observados apenas pequenos espaços extracelulares originados, provavelmente, pela perda de conexão entre as *deep cells* (FISHELSON, 1995). Assim como em zebrafish (KIMMEL *et al.*, 1995; LANGELAND & KIMMEL, 1997), no presente estudo, ocorreu fusão dos blastômeros marginais do blastodisco na fase de blástula alta, originando a camada sincicial vitelínica (YSL) (KIMMEL & LAW, 1985; KIMMEL *et al.*, 1995) e início da movimentação celular, caracterizando a epibolia (WARGA & KIMMEL, 1990).

Na gastrulação, ocorre o comprometimento do destino celular (KIMMEL *et al.*, 1990), e o movimento de involução das *deep cells* que origina os folhetos germinativos (LANGELAND & KIMMEL, 1997). Estudos com zebrafish mutantes e com super-expressão gênica sugerem a participação de fatores da família Nodal na diferenciação do hipoblasto em endoderma e mesoderma (OBER *et al.*, 2003). Durante epibolia, os microtúbulos contribuem para a migração YSL em direção ao pólo vegetativo, não havendo, entretanto, acoplamento da YSL e das células do blastoderma durante esse processo de migração. Mesmo inibindo a epibolia com taxol, estabilizador de microtúbulos, a gastrulação e a morfogênese parece prosseguir normalmente (SOLNICKA-KREZEL & DRIEVER, 1994). No presente trabalho, observaram-se projeções citoplasmáticas das *deep cells* ao MEV, indicando migração ativa dessas células. Projeções de filopódios em *deep cells* durante migração celular também foram relatadas em *Fundulus heteroclitus* (TRINKAUS & ERICKSON, 1983) e zebrafish (WARGA & NÜSSLEIN-VOLHARD, 1999).

A YSL está envolvida na mobilização de vitelo durante a embriogênese (KRIEGER & FLEIG, 1999; SHAHSAVARANI, *et al.*, 2002). No presente trabalho, observaram-se

através de histologia a emissão de projeções citoplasmáticas da YSL para o interior do compartimento vitelínico e a reabsorção de glóbulos de vitelo. Em *Perca fluviatilis*, o vitelo é degradado no compartimento vitelínico e a YSL participa apenas no transporte dos sub-produtos do vitelo para as demais células do embrião (KRIEGER & FLEIG, 1999).

Com o termino da epibolia, que culminou com o fechamento do blastóporo, ocorreu o início da somitogênese, como também observado na maioria dos teleósteos (CARDOSO *et al.*, 1995; KIMMEL *et al.*, 1995; PRIVILEGGI *et al.*, 1997; MEIJIDE & GUERRERO, 2000; ANDRADE-TALMELLI *et al.*, 2001; LUZ *et al.*, 2001; NAKATANI *et al.*, 2001; REYNALTE-TATAJE *et al.*, 2001; PADILHA, 2003; BORÇATO *et al.*, 2004; GOMES, 2005), exceto em *O. niloticus* cuja somitogênese inicia-se antes do término da epibolia (MORRISON *et al.*, 2001). Isso pode ter ocorrido devido ao grande tamanho dos ovos dessa espécie quando comparados aos ovos das quatro espécies em estudo. Já foram identificados mais de 50 genes necessários para o desenvolvimento normal dos somitos, incluindo a via sinalizadora Notch que está envolvida na somitogênese de camundongo e galinha (STICKNEY *et al.*, 2000). A notocorda também parece estar envolvida na somitogênese através da secreção de moléculas sinalizadoras (STICKNEY *et al.*, 2000). Durante essa fase, as células dos somitos se diferenciam em esclerótomos e dermomiótomos (KIMMEL *et al.*, 1995). Os dermomiótomos originarão as células musculares e os esclerótomos a cartilagem vertebral (KIMMEL *et al.*, 1995; LANGELAND & KIMMEL, 1997). Nas quatro espécies em estudo, os desenvolvimentos do cálice óptico, vesícula ótica e tubo neural ocorreram, durante a somitogênese, semelhante ao descrito para outras espécies de teleósteos (CARDOSO *et al.*, 1995; KIMMEL *et al.*, 1995; HILL & JOHNSTON, 1997; MORRISON *et al.*, 2001; PADILHA, 2003; GOMES, 2005).

No presente estudo, a embriogênese das quatro espécies foi curta, ocorrendo entre 17h e 21h. Desenvolvimento embrionário rápido é característico de espécies migradoras, com estratégia reprodutiva sazonal, que apresentam alta fecundidade e ausência de cuidado parental (SATO *et al.*, 2003a). A diferença no tempo de desenvolvimento nas quatro espécies relacionou-se com a temperatura da água. As larvas de *L. obtusidens* e *P. argenteus*, que foram mantidas a uma temperatura menor, eclodiram mais tardiamente, enquanto larvas de *S. brasiliensis* e *B. orthotaenia* eclodiram com um tempo menor e foram mantidas a temperaturas mais altas. Estudos mostram que animais ectotérmicos apresentam desenvolvimento mais acelerado em temperaturas mais elevadas, devido a

alterações que a temperatura induz nas atividades enzimáticas durante organogênese (OJANGUREN & BRAÑA, 2003).

3. Ontogênese larval

As larvas recém-eclodidas das quatro espécies em estudo apresentaram mandíbulas não formadas, olhos despigmentados e saco vitelínico grande, semelhante ao observado para a maioria das larvas de peixes neotropicais de água doce (NAKATANI *et al.*, 2001). O grau de diferenciação da larva recém-eclodida varia entre as espécies, dependendo do tamanho do ovo (BLAXTER, 1969). Espécies que apresentam ovos pequenos e alta fecundidade têm o desenvolvimento embrionário mais rápido e larvas menos desenvolvidas, enquanto as que apresentam ovos grandes e baixa fecundidade têm desenvolvimento embrionário prolongado e maior grau de desenvolvimento das larvas (SATO *et al.*, 2003a). Nesse sentido, peixe-lobo, *Anarhichas lupus* apresenta ovos grandes e larvas recém-eclodidas semelhantes aos juvenis, mantendo poucas características larvais como a presença do saco vitelínico (FALK-PETERSEN & HANSEN, 2001), enquanto espécies com larvas pouco desenvolvidas apresentam ovos pequenos, tais como *Leporinus macrocephalus* (REYNALTE-TATAJE *et al.*, 2001); *Leporinus piau* (BORÇARTO *et al.*, 2004), *Leporinus taeniatus* (PADILHA, 2003), *Pimelodus maculatus* (LUZ *et al.*, 2001) e *Prochilodus lineatus* (SILVEIRA *et al.*, 2004). De acordo com SANCHES *et al.* (1999), larvas de peixes com baixa fecundidade são geralmente mais desenvolvidas, apresentando, conseqüentemente, vantagens ecológicas, pois são capazes de explorar mais nichos e são menos susceptíveis a predação.

A reabsorção do saco vitelínico variou entre as quatro espécies em estudo, desde 2 dias para *S. brasiliensis* até 5 dias para *L. obtusidens*, e a abertura da boca precedeu 1 dia a total reabsorção do saco vitelínico, semelhante ao observado em outros estudos (NOGUEIRA, 2000; GODINHO *et al.*, 2003). Com a abertura da boca, observou-se o desenvolvimento de dentes nas larvas de *B. orthotaenia* e *S. brasiliensis*. Através de análises ao MEV, também foi possível visualizar delicadas estruturas de apreensão em larvas de *P. argenteus*. No presente estudo, observou-se canibalismo nas larvas de *B. orthotaenia* e *S. brasiliensis* como também relatado por outros autores (ANDRADE-TALMELLI, 2001; SANTOS & GODINHO, 2002; GODINHO *et al.*, 2003; VEGA-ORELLANA *et al.*, 2005). Devido ao alto índice de canibalismo, larvas de *S. brasiliensis*

são rotineiramente alimentadas com larvas de *Prochilodus ssp*, aumentando a sobrevivência das larvas cerca 85% (VEGA-ORELLANA *et al.*, 2005). A mudança da alimentação endógena para exógena é uma fase crítica do desenvolvimento inicial, apresentando, freqüentemente, altos índices de mortalidade das larvas (GORDON & HECHT, 2002). Na maioria das larvas, durante a fase de primeira alimentação, o trato digestivo é curto, está relativamente indiferenciado e apresenta baixa atividade de enzimas digestivas (GORDON & HECHT, 2002). No presente estudo, o trato digestivo apresentou maior similaridade entre *B. orthotaenia* e *S. brasiliensis*, que apresentaram intestino com pregueamento da mucosa, e entre *L. obtusidens* e *P. argenteus*, que não apresentaram tais pregueamentos. Essa característica pode está relacionada com o tipo de alimentação das pós-larvas, já que as primeiras se alimentam de ictioplânctons, e as últimas de zooplânctons. No estudo do desenvolvimento de proteinases digestiva em larvas de dourado *S. brasiliensis*, ocorreu baixa atividade enzimática no início da alimentação exógena, sugerindo que a morfologia do trato digestivo não implica na sua funcionalidade (VEGA-ORELLANA *et al.*, 2005). Ao contrário, larvas de arenque, que se desenvolvem mais tardiamente, eclodem com intestino funcional (HILL & JOHNSTON, 1997). Em larvas de tilápia, *O. niloticus*, detectaram-se atividade de seis enzimas digestivas antes do início da alimentação exógena, indicando que enterócitos podem produzir enzimas digestivas nesta fase, particularmente peptidase e fosfatase alcalina (TENJAROENKUL, 2002).

A diferenciação e morfogênese do fígado ocorreram logo após eclosão em *B. orthotaenia* e *S. brasiliensis* e com 1 dia após eclosão em *L. obtusidens* e *P. argenteus*. De acordo com OBER *et al.* (2003), a diferenciação das células endodérmicas da porção ventral do intestino em hepatócitos requer a interação dessas células com tecidos adjacentes, como o mesoderma cardíaco, através da sinalização de proteínas da família das BMP (*Bone Morphogenic Proteins*) e membros da família das FGF (*Fibroblast Growth Factor*). No presente estudo, antes da reabsorção total do saco vitelínico, as larvas já apresentavam o pâncreas com porção exócrina e endócrina diferenciadas e apenas uma ilhota pancreática, assim como observado em zebrafish (OBER *et al.*, 2003). O pâncreas também necessita da interação com tecidos adjacentes para sua diferenciação, sugerindo que a notocorda é requerida, em parte, para o desenvolvimento do mesmo através da supressão da expressão do gene *Shh* do endoderma (OBER *et al.*, 2003). Fígado e pâncreas já diferenciados são observados em larvas que iniciam a alimentação exógena logo após

eclosão tais como em peixe-palhaço *Amphiprion percula* (GORDON & HECHT, 2002) e peixe-lobo, *A. lupus* (FALK-PETERSEN & HANSEN, 2001).

O pronefro se desenvolveu de forma similar nas quatro espécies, sendo observado desde a eclosão das larvas. De acordo com KIMMEL *et al.* (1995), o pronefro desenvolve-se na fase inicial da somitogênese entre o segundo e o terceiro somito. Nos peixes, o pronefro se diferencia em mesonefro apenas nos indivíduos juvenis/adultos (DRUMMOND *et al.* 1998). As células germinativas primordiais foram identificadas a partir do 1º dia após eclosão das larvas entre o intestino e o rim. Sua localização e características morfológicas foram semelhantes ao descrito para outros teleósteos (SATOH & EGAMI, 1972; HAMAGUCHI, 1982; BRAAT *et al.*, 1999; MORISSON *et al.*, 2001). Esboço da bexiga gasosa surgiu com 2 dias para *B. orthotaenia* e *S. brasiliensis*, e com 3 dias para *L. obtusidens* e *P. argenteus*, apresentando epitélio de revestimento simples pavimentoso, similar ao relatado em outros (SANTOS, 1992; SANTOS & GODINHO, 1996; NOGUEIRA, 2000; SANTOS & GODINHO, 2002; GODINHO *et al.*, 2003). O desenvolvimento do coração foi semelhante ao observado em zebrafish, com seu aparecimento durante a somitogênese, e espessamento somente do miocárdio do ventrículo ao longo da ontogênese larval (YELON & STAINIER, 1999; HU *et al.*, 2000). O coração é primeiro órgão definitivo a se desenvolver e tornar-se funcional durante a embriogênese (HU *et al.*, 2000).

O desenvolvimento dos órgãos sensoriais é importante para a sobrevivência das larvas e está intimamente relacionado com o início da alimentação exógena, fuga de predadores e migração vertical na coluna d'água (MATSUOKA, 2001). Nas quatro espécies em estudo, os olhos, o ouvido interno, a fossa nasal e os neuromastos do sistema da linha lateral, foram as primeiras estruturas sensitivas a se desenvolverem e os botões gustativos os últimos, sendo identificados após a abertura da boca, localizando-se apenas nos lábios. Os botões gustativos podem estar situados no epitélio dos lábios, cavidade orofaríngea, barbilhões, cabeça e algumas vezes por todo o corpo (HANSEN *et al.*, 2002). Em zebrafish, os botões gustativos foram observados com 3-4 dias nos lábios e com 4-5 dias nos arcos branquiais (HANSEN *et al.*, 2002). De acordo com FALK-PETERSEN & HANSEN (2000) a presença dessa estrutura é um indicador que as larvas de peixe-lobo, *A. lupus*, já estão prontas para início da alimentação exógena.

A distribuição dos neuromastos, responsáveis pela percepção de vibração na água, é espécie-específica e acompanha a filogenia (GHYSEN & DAMBLY-CHAUDÈRE, 2004).

Em algumas espécies, o neuromasto está envolvido com o sistema eletro-sensorial através de uma especialização das células sensitivas (DAMBLY-CHAUDÈRE, *et al.*, 2004). Nas quatro espécies em estudo, observaram-se diferenças ultra-estruturais dos neuromastos, indicando que além da sua localização na superfície, padrões morfológicos dessas estruturas também podem apresentar espécie-especificidade e acompanhar a filogenia, já que foram observadas maiores similaridades entre espécies pertencentes ao mesmo grupo taxonômico, *B. orthotaenia* e *S. brasiliensis* (REIS, *et al.*, 2003).

A presença de órgão adesivo ocorreu em *B. orthotaenia* e *S. brasiliensis*, como registrado previamente por NOGUEIRA (2000) e SANTOS & GODINHO (2002), sendo observado pela primeira vez ao MEV no presente trabalho. Esse órgão apresentou-se histologicamente semelhante em ambas espécies, com variações quanto a sua ultra-estrutura de superfície. A estrutura anatômica dos órgãos adesivos é muito diversa nos peixes, podendo ser constituída de numerosas células adesivas separadas, como em *Nandus nandus* (BRITZ, 1997) e *Cichlasoma dimerus* (MEIJIDE & GUERRERO, 2000), até uma glândula multicelular complexa como em alguns Gymnotiformes (BRITZ *et al.*, 2000). Em espécies sedentárias, como *C. dimerus*, o órgão adesivo ajuda a prevenir a dispersão das larvas pelas correntes, facilitando o cuidado parental (MEIJIDE & GUERRERO, 2000). Há, ainda, outras funções para os órgãos adesivos: evitar que as larvas sejam lançadas para habitats menos favoráveis, tais como locais com menor concentração de oxigênio, e mantê-las aderidas a locais seguros contra predadores (BRITZ *et al.*, 2000). De acordo com GODINHO *et al.* (2003), o órgão adesivo das larvas de espécies migradoras teria um papel importante na dispersão larval, aderindo-as à superfície da água, permitindo que sejam conduzidas pela correnteza. Em espécies migradoras, após a fecundação, os ovos são levados pelas águas em direção a remansos e lagoas marginais formadas durante a estação chuvosa, permanecendo nesses locais até o fim da fase juvenil (CAROLSFELD *et al.*, 2003; POMPEU & GODINHO, 2003). Com isso, o órgão adesivo também poderia manter as larvas aderidas a substratos encontrados em remansos e lagoas marginais durante a fase inicial do desenvolvimento, período em que estão mais susceptíveis a predação.

VI. CONCLUSÕES

Ovócitos vitelogênicos e recém-desovados de *B. orthotaenia*, *L. obtusidens*, *P. argenteus* e *S. brasiliensis* foram semelhantes quanto à histologia e o conteúdo histoquímico das células foliculares, zona radiata interna e glóbulos de vitelo, e apresentaram espécie-especificidade quanto à constituição dos alvéolos corticais e zona radiata externa, e à ultra-estrutura de superfície.

O desenvolvimento embrionário e a organogênese foram semelhantes para as quatro espécies, com embriogênese rápida e larvas pouco desenvolvidas, podendo estar relacionadas com a estratégia reprodutiva das mesmas.

A reabsorção total do saco vitelínico ocorreu com 2 dias após eclosão das larvas para *S. brasiliensis*, 3 para *B. orthotaenia*, 4 para *P. argenteus* e 5 para *L. obtusidens*, e a abertura da boca precedeu 1 dia à reabsorção total do saco vitelínico.

Larvas de *S. brasiliensis* e *B. orthotaenia* apresentaram maiores semelhanças quanto ao desenvolvimento e morfologia das larvas, tais como presença de órgão adesivo, canibalismo e maior similaridade ultra-estrutural dos neuromastos, sugerindo maior proximidade filogenética entre essas espécies.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE-TALMELLI, E. F.; KAVAMOTO, E. T.; ROMAGOSA, E.; FENERICH-VERANI, N. Embryonic and larval development of the “piabanha”, *Brycon insignis*, Steindachner, 1876 (Pisces, Characidae). *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 27, n. 1, p. 21-28, 2001.

BARRETO, B. P. *Gametogênese e biologia reprodutiva de Serrasalmus spilopleura Kner, 1860 (Pisces, Characidae) do reservatório de Itumbiara – GO*. 2001. 117p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular), Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

BAZZOLI, N. *Ovogênese em peixes teleósteos neotropicais de água doce*, 1992. 191 p. Tese (Doutorado em Morfologia), Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1992.

BAZZOLI, N.; GODINHO, H. P. Cortical alveoli in oocytes of freshwater neotropical teleost fish. *Bolletino di Zoology*, v. 61, p. 301-308, 1994.

BAZZOLI, N.; RIZZO, E. A comparative cytological and cytochemical study of the oogenesis in ten teleost fish species. *European Archives of Biology*, v. 101, p. 399-410, 1990.

BLAXTER, H. H. S. Development: eggs and larval, p. 178-252. In: HOAR W. S.; RANDALL, D. J (Ed.) *Fish Physiology*. San Diego: Academic Press, 1969, 485p.

BONSIGNORIO, D.; PEREGO, L.; GIACCO, L. D.; COTELLI, F. Structure and macromolecular composition of the zebrafish egg chorion. *Zygote*, v. 4, p. 101-108, 1996.

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

BRAAT, A. K.; ZANDBERGEN, T.; VAN DE WATER, S.; T.H. GOOS, H. J.; ZIVKOVIC, D. Characterization of zebrafish primordial germ cell: morphology and early distribution of *vasa* RNA. *Developmental dynamics*, v. 216, p. 153-167, 1999.

BREINING, T.; BRITZ, R. Egg surface structure of three clingfish species, using scanning electron microscopy. *Journal of Fish Biology*, v. 56, p. 1129-1137, 2000.

BRITISKI, H. A.; SATO, Y.; ROSA, A. B. S. *Manual de identificação de peixes da região de Três Marias: com chaves de identificação para peixes da Bacia do São Francisco*, Brasília: Câmara dos Deputados, Coordenação de Publicações – CODEVASF, Divisão de Piscicultura e Pesca, 1984, 143 p.

BRITZ, R.; KIRSCHBAUM, F.; HEYD, A. Observations on the structure of larval attachment organs in three species of gymnotiforms (Teleostei: Ostariophysi). *Acta Zoologica*, v. 81, p. 57-67, 2000.

- BRIVIO, M. F.; BASSI, R.; COTELLI, F. Identification and characterization of the major components of the *Oncorhynchus mykiss* eggs chorion. *Molecular Reproduction Development*, v. 28, p. 85-93, 1991.
- CARDOSO, E. L.; ALVES, M. S. D.; FERREIRA, R. M. A.; GODINHO, G. P. Embryogenesis of the neotropical freshwater Siluriforme *Pseudoplatystoma coruscans*. *Aquatic Living Resources*, v. 8, n. 4, p. 343-346, 1995.
- CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.; ROSS, C.; BAER, A. *Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation status*. Victoria: Alaris Design, Canadá, 2003, 372 p.
- DAMBLY-CHAUDIÈRE, C.; SAPÈDE, D.; SOUBIRAN, F.; DECORDE, K. GOMPEL, N.; GHYSEN, A. The lateral line of zebrafish: a model system for the analysis of morphogenesis and neural development in vertebrates. *Biology of the Cell*, v. 95, p. 579-587, 2003.
- DELL, A.; MORRIS, H. R.; EASTON, R. L.; PATANKAR, M.; CLARK, G. F. The glycobiology of gametes and fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1473, p. 196-205, 1999.
- DIAZ, J. P.; PRIÉ-GRANIÉ, M.; KENTOURI, M.; VARSAMOS, S.; CONNES, R. Development of the lateral line system in the sea bass. *Journal of Fish Biology*, v. 62, p. 24-40, 2003.
- DONG, C. H.; YANG, S. T.; ZHONG-AN, Y.; GUI, J. F. A C-type lectin associated and translocated with cortical granules during oocyte maturation and egg fertilization in fish. *Developmental Biology*, v. 265, p. 341-354, 2004.
- DRUMMOND, I. A.; MAJUMDAR, A.; HENTSCHEL, H.; ELGER, M.; SOLNIKA-KREZEL, L.; SCHIER, A. F.; NEUHAUSS, S. C. F.; STEMPEL, D. L.; ZWARTKRUIS, F.; RANGINI, Z.; DRIEVER, W. FISHMAN, M. C. Early development of the zebrafish pronephros and analysis of mutations affecting pronephric function. *Development*, v. 125, p. 4655-4667, 1999.
- FALK-PETERSEN, I. B.; HANSEN, T. K. Organ differentiation in newly hatched common wolfish. *Journal of Fish Biology*, v. 59, p. 1465-1482, 2001.
- FISHELSON, L. Ontogenesis of cytological structures around the yolk sac during embryologic and early larval development of some cichlid fishes. *Journal of Fish Biology*, v. 47, p. 479-491, 1995.
- FUTUYMA, D. J. *Biologia evolutiva*. 2ª ed., Ribeirão Preto: FUNPEC, 2002, 631 p.
- GHYSEN, A.; DAMBLY-CHAUDIÈRE, C. Development of the zebrafish lateral line. *Current Opinion in Neurobiology*, v. 14, p. 67-73, 2004.

- GODINHO, H. P.; SANTOS, J. E.; SATO, Y. Ontogênese larval de cinco espécies de peixes do São Francisco, p. 133-148. In: GODINHO, H. P.; GODINHO, A. L. (Ed.) *Águas, peixes e pecadores do São Francisco das Minas Gerais*, Belo Horizonte: CNPq/PADCT, Editora PUC Minas, 2003, 468 p.
- GOMES, B. V. C. *Embriogênese e ontogênese larval de três espécies de peixes Erythrinidae da bacia do rio São Francisco*. 2005. 30p. Dissertação (Mestrado em zoologia de vertebrados), Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.
- GORDON, A. K.; HECHT, T. Histological studies on the development of the digestive system of the clownfish *Amphiprion percula* and the time of weaning. *Journal of Applied Ichthyology*, v. 18, p. 113-117, 2002.
- GROOT, E. P.; ALDERDICE, D. F. Fine structure of the external egg membrane of five species of Pacific salmon and steelhead trout. *Canadian Journal of Zoology*, v. 63, p. 552-566, 1985.
- GURAYA, S. S. Recent advances in the functional morphology of follicular wall, egg-surface components, and micropyle in the fish ovary. In: MUNSHI, J. S. D.; DUTTA, H. M (Ed.) *Fish morphology – horizon of new research*, p. 114-144, 1996, 300p.
- HAMAGUCHI, S. A light- and electron-microscopic study on the migration of primordial germ cells in the teleost, *Oryzias latipes*. *Cell Tissue Research*, v. 227, p. 139-151, 1982.
- HANSEN, A.; KLAUS REUTTER, K.; ZEISKE, E. Taste bud development in the zebrafish, *Danio rerio*. *Developmental Dynamics*, v. 223, p. 483-496, 2002.
- HART, N. H. Fertilization in teleost fishes: mechanism of sperm – egg interactions. *International Review of Cytology*, v. 121, p. 1-66, 1990.
- HART, N. H.; DONOVAN, M. Fine structure of the chorion and site of sperm entry in the egg of *Brachydanio*. *Journal of Experimental Zoology*, v. 277, p. 277-296, 1983.
- HASHIMOTO, Y.; MAEGAWA, S.; NAGAI, T.; YAMAHA, E.; SUZUKI, H.; YASUDA, K.; INOUE, K. Localized maternal factors are required for zebrafish germ cell formation. *Developmental Biology*, v. 268, n. 1, p. 152-161, 2004.
- HAYAT, M. A. *Stains and cytochemical methods*. New York: Plenum Press, 455 p., 1993.
- HELFMAN, G. S.; COLLETTE, B. B.; FACEY, D. E. *The diversity of fishes*. Massachusetts: Blackwell Science, USA, 2000, cap. 9, p. 117-134.
- HILL, J.; JOHSTON, I. A. Photomicrographic atlas of Atlantic herring embryonic development. *Journal of Fish Biology*, v. 51, p. 960-977, 1997.
- HOGAN JR., J. C. An ultrastructural analysis of cytoplasmic markers in germ cells of *Oryzias latipes*. *Journal of Ultrastructure Research*, v. 62, p. 237-250, 1978.

- HU, N.; SEDMERA, D.; YOST, H. J.; CLARK, E. B. Structure and function of the developing zebrafish heart. *The Anatomical Record*, v. 260, p. 148-157, 2000.
- KANE, D. A.; KIMMEL, C. B. The zebrafish midblastula transition. *Development*, v. 119, p. 447-456, 1993.
- KENNEDY, J. F.; PALVA, P. M. G.; CORELLA, M. T. S.; CAVALCANTI, M. S. M.; COELHO, L. C. B. B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. *Carbohydrate Polymers*, v. 26, p.219-230, 1995.
- KILPATRICK, D. C. Animal lectin: a historical introduction and overview. *Biochemistry Biophysical Acta*, v. 1572, p. 187-197, 2002.
- KIMMEL, C. B.; BALLARD, W. W.; KIMMEL, S. R.; ULLMANN, B.; SCHILLING, T. F. Stages of Embryonic Development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, v. 203, p. 253-310, 1995.
- KIMMEL, C. G.; LAW, R. D. Cell lineage of zebrafish blastomeres. II. Formation of the yolk syncytial layer. *Developmental Biology*, v. 108, p. 86-93, 1985.
- KIMMEL, C. B.; WARGA, R. M.; SCHILLING, T. F. Origin and organization of the zebrafish fate map. *Development*, v. 108, p. 581-594, 1990.
- KNAUT, H.; WERZ, C.; GEISLER, R. A zebrafish homologue of the chemokine receptor Cxcr4 is a germ-cell guidance receptor. *Nature*, v. 421, p. 279-282, 2002.
- KRIEGER, J.; FLEIG, R. Yolk mobilization in perch, *Perca fluviatilis* L., embryos. *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 21, p. 157-165, 1999.
- KUDO, S.; YAZAWA, S. Biding of antibiotics to glycoproteins of vitelline and fertilization envelopes of cherry salmon eggs. *Histochemical Journal*, v. 29, p. 607-616, 1997.
- KUNWAR, P. S.; RUTH, L. Developmental biology: Germ-cell attraction. *Nature*. v. 421, p. 226-227, 2003.
- LANGELAND, J. A.; KIMMEL, C. B. Fishes In: GILBERT, S. F.; RAUNIO, A. M.(ed.) *Embryology: construting the organism*. Sunderland: Sinauer Associates, 1997. cap. 19, p. 383-407.
- LI, Y. H.; WU, C. C.; YANG, J. S. Comparative ultrastructural studies of the zona radiata of marine fish eggs in three genera in Perciformes. *Journal of Fish Biology*, v. 56, p. 615-621, 2000.
- LIS, H.; SHARON, N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chemical Reviews*, v. 98, n. 2, p. 637-674, 1998.

- LUZ, T. K.; REYNALTE-TATAJE, D. A.; FERREIRA, A. A.; ZANIBONI, E. Desenvolvimento embrionário e estágios larvais do mandi-amarelo *Pimelodus maculatus*. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 27, n. 1, p. 49-55, 2001.
- MANDICH, A.; MASSARI, A.; BOTTERO, S.; MARINO, G. Histological and histochemical study of female germ cell development in the dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). *European Journal of Histochemistry*, v. 46, p. 87-100, 2002.
- MATSUOKA, M. Development of sense organs in the Japanese sardine *Sardinops melanostictus*. *Fisheries Science*, v. 67, p. 1036-1045, 2001.
- MEIJIDE, F. J.; GUERRERO, G. A. Embryonic and larval development of a substrate-brooding cichlid *Cichlasoma dimerus* (Heckel, 1840) under laboratory conditions. *Journal of Zoology (London)*, v. 252, p. 481-493, 2000.
- MENGERINK, K. J.; VACQUIER, V. D. Glycobiology of sperm-egg interactions in deuterostomes. *Glycobiology*, v. 11, n. 4, p. 37R-43R, 2001.
- MOORMAN, S. J. Development of sensory system in zebrafish (*Danio rerio*). *Institute for Laboratory Animal Resourch Journal*, v. 42, n. 4, p.292-298, 2001.
- MORRISON, C. M.; MIYAKE, T.; WRIGHT JR.; J. R.; Histological study of development of the embryo and early larva of *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae). *Journal of Morphology*, v. 247, p. 172-196, 2001.
- MOTTA, C. M.; TAMMARO, S.; SIMONIELLO, P.; PRISCO, M.; RICCHIARI, L.; ANDREUCETTI, P.; FILOSA, S. Characterization of cortical alveoli content in several species of Antarctic notothenioids. *Journal of Fish Biology*, v. 66, p. 442-453, 2005.
- MULLINS, M.C. Embryonic axis formation in the zebrafish. *Methods in Cell Biology*, v. 59, p. 159-178, 1999.
- MURATA, K.; SUGIYAMA, H.; YASUMASU, S.; IUCHI, I.; YASUMASU, I.; YAMAGAMI, K. Cloning of cDNA and estrogen-induced hepatic gene expression for choriogenic H, a precursor protein of the fish egg envelope (chorion). *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, v. 94, p. 2050-2055, 1997.
- NAKATANI, K.; AGOSTINHO, A. A.; BAUMGARTNER, G.; BIALETZKI, A.; SANCHES, P. V.; MAKRAKIS, M. C.; PAVANELLI, C. S. *Ovos e larvas de peixes de água doce – Desenvolvimento e manual de identificação*. Maringá: Editora da Universidade Estadual de Maringá, 2001, 378p.
- NELSON, J. S. *Fishes of The World*, terceira edição, New York: John Wiley & Sons, 1994, 523 p.
- NOGUEIRA, B. P. *Ciclo reprodutivo e desenvolvimento larval do matrinchã Brycon lundii Reinhardt, 1874, (Teleostei, Characidae) do rio São Francisco, Minas Gerais*, 2000, 88p. Dissertação (Mestrado em Zoologia de Vertebrados), Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.

- NOSEK, J.; KRAJHANZL, A.; KOCOUREK, J. Binding of the cortical granule lectin to the jelly envelope in mature perch ova. *Histochemical Journal*, v. 16, p. 429-431, 1984.
- OBER, E. A.; FIELD, H. A.; STAINIER, D. Y. R. From endoderm formation to liver and pancreas development in zebrafish. *Mechanisms of Development*, v. 120, p. 5-18, 2003.
- OHTA, T.; IWAMATSU, T.; TANAKA, M.; YOSHIMOTO, Y. Cortical alveolus breakdown in the eggs of the freshwater teleost *Rhodeus ocellatus ocellatus*. *The Anatomical Records*, v. 227, p. 486-496, 1990.
- OJANGUREN, A. F.; BRAÑA, F. Thermal dependence of embryonic growth and development in brown trout. *Journal of Fish Biology*, v. 62, p. 580-590, 2003.
- OWENS, K. D.; BAER, K. N. Modifications of the tropical Japanese medaka (*Oryzias latipes*) embryo larval assay for assessing developmental toxicity of pentachlorophenol and *p, p'*-dichlorodiphenyltrichloroethane. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 47, p. 87-95, 2000.
- PADILHA, G. E. V. *Maturação gonadal final, embriogênese e ontogênese larval do "piau-jejo" Leporinus taeniatus Lütken, 1874 (Pisces, Anostomidae) em condições experimentais*. 2003. 36p. Dissertação (Mestrado em zoologia de vertebrados), Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.
- PARILLO, R.; VERINI-SUPPLIZI, A. Glycohistochemistry of the zona pellucida of developing oocytes in the rabbit and hare. *Research in Veterinary Science*, v. 70, p. 257-264, 2001.
- PATIÑO, R.; SULLIVAN, C. V. Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 26, p. 57-70, 2002.
- PEARSE, A. G. E., *Histochemistry: Theoretical and Applied*. Quarta edição. 2º volume, Edinburgh: Churchill Livingstone, 1980, 1055p.
- PELEGRI, F. Maternal factors in zebrafish development. *Developmental Dynamics*, v. 228, p. 535-554, 2003.
- PILLAI, M. C.; SHIELDS, T. S.; YANAGIMACHI, R.; CHERR, G. N. Isolation and partial characterization of the sperm motility initiation factor from eggs of the Pacific Herring, *Clupea pallasii*. *Journal of Experimental Zoology*, v. 265, p. 336-342, 1993.
- POMPEU, P. S.; GODINHO, H. P. Ictiofauna de Três Lagoas Marginais do Médio São Francisco, p. 167-181. In: GODINHO, H. P.; GODINHO, A. L. (Ed.) *Águas, peixes e pecadores do São Francisco das Minas Gerais*, Belo Horizonte: CNPq/PADCT, Editora PUC Minas, 2003, 468 p.
- PRIVILEGGI, N.; OTA, D.; FERRERO, E. A. Embryonic and larval development of the grass goby *Zosterisessor ophiocephalus* (Teleostei, Gobiidae). *Italian Journal of Zoology*, v. 64, p. 201-207, 1997.

- RAZ, E. Primordial germ cell development in zebrafish. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 337, p. 1-7, 2002.
- RAZ, E. Primordial germ-cell development: the zebrafish perspective. *Nature Reviews genetics*, v. 4, n. 9, p. 690-700, 2003.
- REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C.J. *Check list of the freshwater fishes of South and Central America*. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003, 742 p.
- REYNALTE-TATAJE, D.; ZANIBONI-FILHO, E.; MUELBERT, B. Stages of the embryonic development of the piavuçu *Leporinus macrocephalus* (Garavello & Britski, 1988). *Acta Scientiarum*, v. 23, n. 4, p. 823-327, 2001.
- RICARDO, M. C. P.; AGUIAR, C. A.; RIZZO, E.; BAZZOLI, N. Morphology of micropyle and micropylar cell in freshwater neotropical teleost. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 48, p. 17-24, 1996.
- RIEHL, R. Surface morphology and micropyle as a tool for identifying fish eggs by scanning electron microscopy. *Microscopy and Analysis*, v. May, p.29-31, 1993.
- RIEHL, R.; PATZNER, R. A. The modes of egg attachment in teleosts fishes. *Italian Journal Zoology*, v. 65, p. 415-420, 1998.
- RIZZO, E.; BAZZOLI, N. The zona pellucida of the Brazilian white piranha, *Serrasalmus brandtii* Reinhardt 1874 (Pisces, Characidae): a cytological and cytochemical study. *Functional and Developmental Morphology*, v. 1, n. 4, p. 21-25, 1991.
- RIZZO, E.; BAZZOLI, N. Oogenesis, oocyte surface and micropylar apparatus of *Prochilodus affinis*, Reinhardt, 1874 (Pisces, Characiformes). *European Archives of Biology*, v. 104, n. 1, p. 1-6, 1993.
- RIZZO, E.; MOURA, T. F. C.; SATO, Y.; BAZZOLI, N. Oocyte surface in four teleosts fish species postspawning and fertilization. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 41, n. 1, p. 37-48, 1998.
- RIZZO, E.; SATO, Y.; BARRETO, B. P.; GODINHO, H. P. Adhesiveness and surface patterns of eggs in neotropical freshwater teleosts. *Journal of Fish Biology*, v. 61, n. 3, p. 615-632, 2002.
- RIZZO, E.; GODINHO, H. P.; SATO, Y. Short-term storage of oocytes from the neotropical teleost fish *Prochilodus marggravii*. *Theriogenology*, v. 60, p. 1059-1070, 2003.
- RHODES, J. M.; MILTON, J. D. *Lectin methods and protocols*. New Jersey: Humana Press, 1998, 616 p.
- SANCHES, P. V.; NAKATANI, K.; BIALETZKI, A. Morphological description of the developmental stages of *Parauchenipterus galeatus* (Linnaeus, 1766) (Siluriformes, Auchenipteridae) on the flood plain of the upper Paraná River. *Revista Brasileira de Biologia*, v. 59, n. 3, p. 429-438, 1999.

SANTOS, J. E. *Ontogênese e comportamento larvais de seis espécies de peixes de água doce sob condições experimentais*, 1992, 132 p. Dissertação (Mestrado em morfologia), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1992.

SANTOS, J. E.; GODINHO, H. P. Larval ontogeny and swimming behaviour of the leporin fish *Leporinus elongatus* (Valenciennes, 1874) under experimental conditions, *Aquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 48, p. 109-116, 1996.

SANTOS, J. E.; GODINHO, H. P. Ontogenic events and swimming behaviour of larvae of the characid fish *Salminus brasiliensis* (Cuvier) (Characiformes, Characidae) under laboratory conditions. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 19, n. 1, p. 163-171, 2002.

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

SATO, Y.; FENERICH-VERANI, N.; NUÑER, A. P. O.; GODINHO, H. P.; VERANI, J. R. Padrões reprodutivos de peixes da bacia do São Francisco, p. 229-274. In: GODINHO, H. P.; GODINHO, A. L. (Ed.) *Águas, peixes e pecadores do São Francisco das Minas Gerais*, Belo Horizonte: CNPq/PADCT, Editora PUC Minas, 2003a, 468 p.

SATO, Y.; FENERICH-VERANI, N.; GODINHO, H. P. Reprodução induzida de peixes da bacia do São Francisco, p. 275-290. In: GODINHO, H. P.; GODINHO, A. L. (Ed.) *Águas, peixes e pecadores do São Francisco das Minas Gerais*, Belo Horizonte: CNPq/PADCT, Editora PUC Minas, 2003b, 468 p.

SATOH, N.; EGANI, N. Sex differentiation of germ cells in the teleost, *Oryzias latipes*, during normal embryonic development. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, v. 28, n. 2, p. 385-395, 1972.

SCAPIGLIATI, G.; MELONI, S.; MAZZINI, M. A monoclonal antibody against chorion proteins of the sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758): studies of chorion precursors and applicability in immunoassays. *Biology of Reproduction*, v. 60, p. 783-789, 1999.

SCARPELLI, R. S. *Expressão de resíduos de açúcares e adesividade de ovos de Três espécies de peixes da família Erythrinidae*. 2004. 29 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2005.

SCHINDLER, J. F.; VRIES, U. Polarized distribution of binding sites for concavalin A and wheat-germ agglutinin in the zona pellucida of goodeid oocytes (teleostei). *Histochemistry*, v. 91, p. 413-417, 1989.

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

- SHAHSAVARANI, I. A.; THOMAS, Z. C.; BALLANTYNE, J. S.; WRIGHT, P. A. A novel technique for the separation of yolk from the developing embryonic tissue in a teleost fish, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 24, p. 321–326, 2002.
- SHAND, J. Ontogenetic changes in retinal structure and visual acuity: a comparative study of coral-reef teleosts with differing post-settlement lifestyles, *Environmental Biology of Fishes*, v. 49, p. 307–322, 1997.
- SILVEIRA, A. N. *Desenvolvimento embrionário e preservação criogênica de embriões do curimatá, Prochilodus lineatus (Valenciennes, 1836) (Teleostei; Prochilodontidae)*, 2004, 103 p., Tese (Doutorado em Ciências Biológicas. Área de concentração: Zoologia), Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.
- SINGH, R. S.; TIWARY, A. D.; KENNEDY, J. F. Lectins, sources, activities and applications. *Critical Review of Biotechnology*, v. 19, n. 2, p. 145-178, 1999.
- SOLNICA-KREZEL, L.; DRIEVER, W. Microtubule arrays of the zebrafish yolk cell: organization and function during epiboly. *Development*, v. 120, p. 2443-2455, 1994
- STICKNEY, H. L.; BARRESI, M. J. F.; DEVOTO, S. H. Somite Development in Zebrafish. *Developmental Dynamics*, v. 219, p. 287–303, 2000.
- STRUHL G.; ADACHI, A. Nuclear access and action of notch in vivo. *Cell*, v. 93, p. 649-660, 1998.
- TENGJAROENKUL, B.; SMITH, B. J.; SMITH, S. A.; CHATREEWOGSIN, U. Ontogenic development of the intestinal enzymes of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture*, v. 211, p. 241-251, 2002.
- TRINKAUS, J. P.; ERICKSON, C. A. Protrusive activity, mode and rate of locomotion and pattern of adhesion of *Fundulus* deep cells during gastrulation. *Journal of Experimental Zoology*, v. 228, p. 41-70, 1983.
- TYLER C.R.; SUMPTER, J.P. Oocyte growth and development in teleosts. *Reviews in fish biology and fisheries*, v. 6. p. 287-318, 1996.
- VEGA-ORELLANA, O. M.; FRACALOSSO, D. M.; SUGAI, J. K. Dourado (*Salminus brasiliensis*) larviculture: weaning and ontogenetic development of digestive proteinases. *Aquaculture*, v. 252, p. 484-493, 2005.
- WARGA, R. M.; KIMMEL, C. B.; Cell movements during epiboly and gastrulation in zebrafish. *Development*, v. 108, p. 569-580, 1990.
- WARGA, R. M.; NÜSSLEIN-VOLHARD, C. Origin and development of the zebrafish endoderm. *Development*, v. 126, p. 827-838, 1999.

WIRZ-HLAVACEK, J. S.; HART, N. H. Reproductive behaviour and egg structure of the piranha *Serrasalmus nattererri* (Kner, 1860). *Acta Biologica Benrodis*, v. 2, p. 19-38, 1990.

WOYNAROVICH, E.; HORVÁTH, L. *The artificial propagation of warm – water finfishes – manual of extension*. Rome: FAO Fisheries Technical Paper, v. 201, p. 1-183 1980.

WYLIE, C. Germ cell. *Cell*. v. 96, p. 165-174, 1999.

WYLIE, C. Germ cell. *Current Opinion in Genetics & Development*. v. 10, p. 410-413, 2000.

YELON, D.; STAINIER, D. Y. R. Patterning during organogenesis: genetic analysis of cardiac chamber formation. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, v. 10, p. 93-98, 1999.

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