

O desenvolvimento embrionário da Piapara, *Leporinus elongatus* (Pisces, Anostomidae), utilizando técnicas de histologia, microscopia eletrônica de varredura e imunológicas empregando marcadores ósseos¹

Erika Z. Sousa², Lázaro W.O. Jesus³, Wesley A. Meireles², Maria I. Borella³, Pedro K.F.C. Bianchi², Maria L.B. Salvadori² e José R. Kfoury Júnior^{2*}

ABSTRACT- Souza E.Z., Jesus L.W.O., Meireles W.A., Borella M.I., Bianchi P.K.F.C., Salvadori M.L.B. & Kfoury Júnior J.R. 2014. [The embryonic development of Piapara, *Leporinus elongatus* (Pisces, Anostomidae), using histological techniques, electron microscopy and immunological techniques using bone markers.] O desenvolvimento embrionário da Piapara, *Leporinus elongatus* (Pisces, Anostomidae), utilizando técnicas de histologia, microscopia eletrônica de varredura e imunológicas empregando marcadores ósseos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 34(Supl.1):92-98. Setor de Anatomia, Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando Marques Paiva 87, Butantã, São Paulo, SP 05508-270, Brazil. E-mail: jrobertok@usp.br

The embryonic development of fishes has great importance in fish culture and on reintroduction of species at risk of extinction into their environment; its knowledge constitutes an important way to minimize diseases and mortality of these species. By using techniques like electron microscopy and immunohistochemistry for bone markers identification, it was possible to evaluate the developmental stages of *Leporinus elongatus* in more details, helping to clarify the habits and biology of this species. Results showed the ontogeny and osteogenesis of *Leporinus elongatus* this species from fecundation to juvenile, evidencing important structures as size of the yolk, essential to embryo nutrition, the blastopores closure, important event in embryogenesis because it indicates fertilization indexes, and the metamorphosis, which shows the main organs' development including bones. Bone morphogenetic markers 1 and 4, essential regulatory molecules for bone development, had their expression restricted from larva to fry stages, and were not observed in their previous stages. In sum, these results provided new data that may improve reproductive techniques for *L. elongatus*, and will support commercial and repopulation purposes.

INDEX TERMS: BMP, embryology, immunohistochemistry, osteogenesis, Piapara, *Leporinus elongatus*, Pisces, Anostomidae.

RESUMO.- O desenvolvimento embrionário dos peixes é de grande importância para a piscicultura e na reintrodução de espécies ameaçadas de extinção em seus ambientes, e seu conhecimento constitui uma importante maneira para

minimizar doenças e mortalidades dessas espécies. Com o auxílio de técnicas como a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e a imuno-histoquímica para identificar proteínas ósseas, foi possível avaliar as fases de desenvolvimento com mais riqueza de detalhes, facilitando a compreensão de hábitos e da biologia da espécie. Neste trabalho pudemos observar a ontogenia e osteogênese da Piapara (*Leporinus elongatus*), desde a fecundação até a fase juvenil, sendo evidenciadas estruturas importantes como o tamanho do vitelo, essencial para a nutrição do embrião; o fechamento do blastóporo, evento principal da embriogênese, que indica as taxas de fertilização; a metamorfose, que indica a formação dos primeiros e principais órgãos do

¹ Recebido em 23 de julho de 2014.

Aceito para publicação em 13 de janeiro de 2015.

² Departamento de Cirurgia, Setor de Anatomia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP), Av. Prof. Dr. Orlando Marques Paiva 87, Butantã, São Paulo, SP 05508-270, Brasil. *Autor para correspondência: jrobertok@usp.br

³ Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Ciências Biomédicas, USP, Av. Prof. Lineu Prestes 1524, sala 426, Butantã, São Paulo, SP 05508.

animal e a formação de sua estrutura óssea. As Proteínas Ósseas Morfogênicas (BMP-2 e BMP-4), moléculas essenciais reguladoras no desenvolvimento embrionário e na formação óssea, foram observadas apenas no estágio larval até o período juvenil, não sendo evidenciadas nos estágios anteriores. Os resultados desse trabalho trouxeram novas informações quanto à biologia do desenvolvimento dessa espécie, que certamente poderão auxiliar no aprimoramento de técnicas reprodutivas visando uma melhora na sua produção seja para fins comerciais ou de repovoamento.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: BMP, embriologia, imuno-histoquímica, osteogênese, Piapara, *Leporinus elongatus*, Pisces, Anostomidae.

INTRODUÇÃO

O conhecimento da ontogênese de peixes brasileiros é escasso, especialmente das espécies migradoras, sendo seu estudo importante para o conhecimento da história de vida inicial, para taxonomia e larvicultura (Godinho & Godinho et al. 2003). Considerando a grande diversidade das espécies de peixes e a conseqüente diferenciação morfofisiológica, vários estudos vêm sendo realizados, procurando relacionar as características estruturais, anatômicas, histológicas dos sistemas digestório, reprodutor e esquelético dos peixes com seus hábitos e comportamentos (Seixas-Filho et al. 2000).

A Piapara, *Leporinus elongatus* (Géry et al. 1987) apresenta coloração prateada, caracterizada por três manchas pretas nas laterais do corpo acima da linha lateral e pelas colorações amareladas de suas nadadeiras. Tem o corpo alongado, alto e fusiforme, com hábito de formar cardumes e frequentar as partes médias e inferiores de águas paradas (Reis et al. 2003).

Considerado como um peixe ameaçado de extinção nas bacias em que estão presentes devido à sobre pesca (Machado et al. 2008), o que justifica seus estudos reprodutivos, ecológicos e zootécnicos.

Em peixes, o desenvolvimento ontogenético compreende todo o período do ciclo biológico que abrange ovos, embriões, larvas até a diferenciação histológica, sendo importante por fornecer subsídios para aquicultura, identificação de ovos e larvas na natureza, estudos taxonômicos/filogenéticos e de biologia do desenvolvimento (Nakatani et al. 2001).

Com o surgimento de novas tecnologias de pesquisa, como a imuno-histoquímica e a hibridização *in situ*, tornou-se possível estudar a osteogênese de peixes nos níveis da biologia celular e molecular (Tam et al. 2003), incluindo vários fatores de crescimento, como o fator de crescimento e transformação (TGF- β), o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), as proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs), entre outros, que participam do processo de desenvolvimento do tecido ósseo (Chandler et al. 2007). A principal função das BMPs de 2 a 16 é induzir a transformação de células mesenquimais indiferenciadas em condroblastos, tanto na fase embriogênica como durante o crescimento e cicatrização. Ripamonti & Reddi (1994), afirmaram que, além de suas funções na osteogênese pós-fetal, as BMPs podem exercer múltiplas funções no desenvolvimento em-

briogênico e organogênico, incluindo esqueletogênese, desenvolvimento crânio facial e dos tecidos dentais.

Visando suprir essa carência de informações sobre a ontogenia da Piapara (*Leporinus elongatus*) e buscando obter subsídios para incrementar a reprodução da mesma, investigou-se o desenvolvimento embrionário deste animal, utilizando diferentes técnicas e com foco na expressão das BMP-2 e BMP-4 durante a embriogênese.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Exemplares de *Leporinus elongatus* foram capturados no rio Pardo e mantidos na Estação de Piscicultura da Usina Hidrelétrica de Machado Mineiro localizada no Município de Águas Vermelhas, Minas Gerais; em tanques de 120 m² sendo alimentados com ração comercial contendo 36% de proteína bruta, diariamente, na proporção de 2% do peso vivo. Para reprodução, foram empregados três casais de reprodutores de Piapara no mês de janeiro de 2012 e três em janeiro de 2013, os casais foram submetidos à reprodução induzida por hipofiseação, utilizando três injeções de Extrato Bruto de Hipófise de Carpa (*Cyprinus carpio*) na dosagem de 0,25/0,5 e 5,0mg/kg em intervalo de 10 horas entre aplicações. Estes animais possuíam um comprimento total de 26,4 \pm 7,91cm e 1,25 \pm 0,35 kg de peso corporal. A fertilização foi realizada a seco, misturando-se sêmen aos ovócitos estruídos 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 embriogênese e a ontogênese larval foram monitoradas até a reabsorção do saco vitelínico com auxílio de estereomicroscópio MBC-10 (MBC, Rússia). A reprodução foi realizada durante os meses de janeiro de 2012 e janeiro de 2013, com uma temperatura da água de 24 \pm 3 °C durante o período de incubação. Amostras de ovos, larvas, pós-larvas e juvenis foram fixados em solução de Bouin (750mL de solução saturada de ácido pícrico, 250mL de formol 40% e 50mL de ácido acético glacial) e solução de formalina 10% para posterior avaliação através da microscopia de luz, imuno-histoquímica e microscopia eletrônica de varredura. Foram utilizados 10 juvenis, sendo anestesiados com solução de hidrocloreto de benzocaína 28 na dose de 200mg/L de água, de acordo com Resolução CFMV nº 714 (2002) e posteriormente mergulhados em solução fixadora, por razões humanitárias. Todos os procedimentos desse trabalho foram aprovados pelo CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais) da FMVZ-USP, com o protocolo de número 2369.

Microscopia de Luz

As amostras de ovos, larvas, pós-larvas e juvenis foram fixadas em solução de Bouin durante 12 horas, e então transferidas e conservadas em álcool 70%. Foram então desidratadas em uma série de soluções crescentes de etano e xileno, respectivamente, para o processo de inclusão em parafina segundo técnicas histológicas de rotina. Após este período, os blocos de parafina foram cortados com utilização do micrótomo Leica RM2125 (Leica, Alemanha) em cortes seriados com 5 μ m de espessura e logo após, os cortes foram capturados com lâminas de vidro em um banho histológico a 45°C.

As lâminas foram colocadas em estufas de histologia para secagem Quimis 317B242 (Quimis, Brasil) na temperatura de 40°C por 24 horas. Em seguida, mergulhadas em berços histológicos contendo uma série de soluções decrescentes de xilol e álcool para realização do processo de desparafinização, foram então coradas em solução de Hematoxilina de Mayer por 1 minuto, sendo retirado o excesso em água corrente, e logo, corada com solução

de Eosina durante 30 segundos. As lâminas passaram por um processo de desidratação em soluções crescentes de etanol e diafanizadas em solução de xileno, para posterior montagem das lâminulas com o emprego da resina Entellan (Merck, Brasil).

Os resultados foram analisados e fotografados utilizando o Microscópio Olympus BX3 acoplado à câmera AxioCam HCr com software de captura Axio Visio (Olympus, Japão).

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras de ovos, larvas, pós-larvas e juvenis foram fixadas em solução de formaldeído 4% por 24 horas, e então transferidas para em álcool 70% por tempo indeterminado, foram lavadas em solução de PBS 0,1 M, sendo pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio 2%. Novamente foram lavadas em uma série de solução de PBS 0,1M, água destilada e ácido tânico 1x, respectivamente. Em seguida, foram desidratadas em uma série crescente de etanol e secadas em estufa à temperatura de 60°C durante 24 horas. Após o seco, o material foi montado em Stubs de alumínio e cobertos com ouro, através do aparelho Iom Sputter Balzer SCD - 040 e analisados ao microscópio eletrônico de varredura Zeiss Leo 435 VP do Setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Imuno-histoquímica

As amostras de ovos, larvas, pós-larvas e juvenis foram fixadas em formaldeído 4% por 24 horas, e então transferidas para álcool 70% por tempo indeterminado. Foram então incluídas em parafina, conforme técnicas histológicas de rotina. Após realizados os cortes seriados de 5 µm de espessura, foram montados em lâminas silanizadas, sendo desparafinizadas e hidratadas em soluções decrescentes de xileno e etanol. Em seguida, foram lavadas em PBS e realizado a recuperação antigênica em tampão citrato de sódio a 90°C em uma panela comum com água destilada. Após esfriado em temperatura ambiente, o material foi lavado em água corrente, PBS e então realizado bloqueio de peroxidase com solução de peróxido de hidrogênio no escuro à temperatura ambiente, foi então realizado o bloqueio inespecífico com utilização de leite em pó 5% em PBS à temperatura ambiente. Os cortes foram incubados com anticorpo primário diluído anti- BMP-2 DSV0512011, Monoclonal IGC2B, (R&D System, USA) e BMP-4 - ab124715 (Abcam, USA) em uma câmara úmida em geladeira, de 4 a 8°C, overnight. Os cortes do grupo controle negativo, não foram incubados com o anticorpo primário, e sim com Tampão fosfato salino (PBS 0,1M pH 7,4); No dia seguinte, os cortes foram lavados em solução de PBS e então incubado com anticorpo secundário (Polimer DAKO Advanced, Estados Unidos da América) em temperatura ambiente, os cortes foram lavados com solução de PBS e realizada a revelação com DAB, parando a revelação em água destilada e realizada a contra-coloração com Hematoxilina de Mayer durante 2 minutos, sendo lavadas em água corrente e realizada a diferenciação em solução saturada de carbonato de lítio, lavadas novamente e realizada uma desidratação com soluções crescentes de etanol e xileno. As lâminas foram montadas junto com as lâminulas com utilização da resina Entellan (Merck, Brasil).

RESULTADOS

Ovos

Leporinus elongatus produz ovos esféricos, pelágicos, de coloração amarelo palha e translúcidos, possuem a presença do córion com superfície lisa (Fig.A1 e C1).

Os ovos recém-fecundados apresentam diâmetro médio de 2,60 mm; com amplo espaço perivitelino (aprox. 28%), tamanho médio de 0,73mm e diâmetro médio do

vitelo de 1,10mm. Quanto à quantidade e padrão de distribuição de vitelo, os ovos de *L. elongatus* podem ser classificados como telolécitos, uma vez que exibem grande quantidade de vitelo concentrado no polo vegetativo, enquanto o citoplasma e organelas são distribuídos ao longo do polo animal (Fig.A1 e B1). O córion é liso, sem órgãos

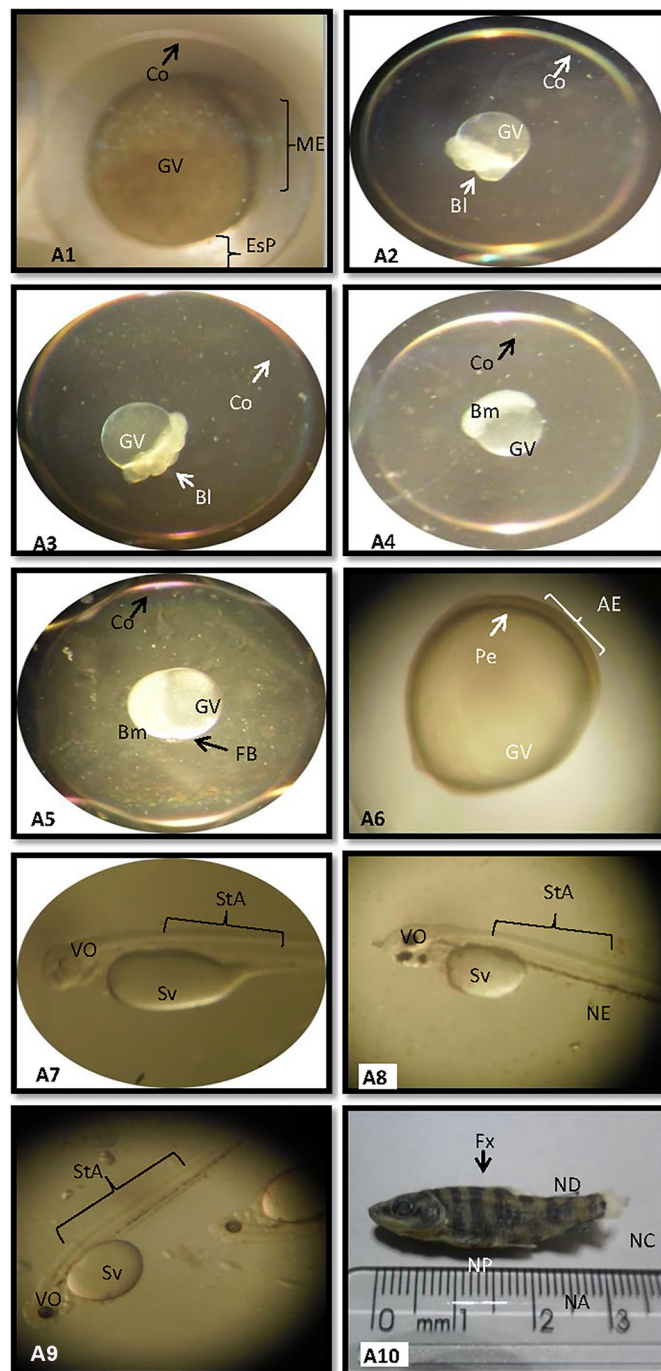


Fig.A. Imagens capturadas utilizando um Microscópio estereoscópio. Nota-se presença do Córion (Co), Glóbulo de vitelo (GV), Movimento de Epibolia (ME), Blastômeros (BI), Blastoderme (Bm), Saco vitelínico (SV), Espaço Perivitelínico (EsP), Fechamento do Blastóporo (FB), Periblasto (Pe), Anel Embrionário (AE), Somitos (St), Vesícula Óptica (VO), Nadadeira Embrionária (NE), Faixas Transversais (Fx), Nadadeira Caudal (NC), Nadadeira Dorsal (ND), Nadadeira Peitoral (NP) Nadadeira Anal (NA).

adesivos conforme análise através da Microscopia Eletrônica de Varredura (Fig.C1).

Embriogênese

A primeira clivagem durante a embriogênese de *L. elongatus* foi de 42 minutos após fertilização (Fig.A2 e B2). Onde foi possível observar claramente o movimento de epibolia na microscopia eletrônica (Fig.C2). A segunda, terceira e quarta clivagens ocorreram aproximadamente seis minutos após a anterior, no entanto, na quinta clivagem,

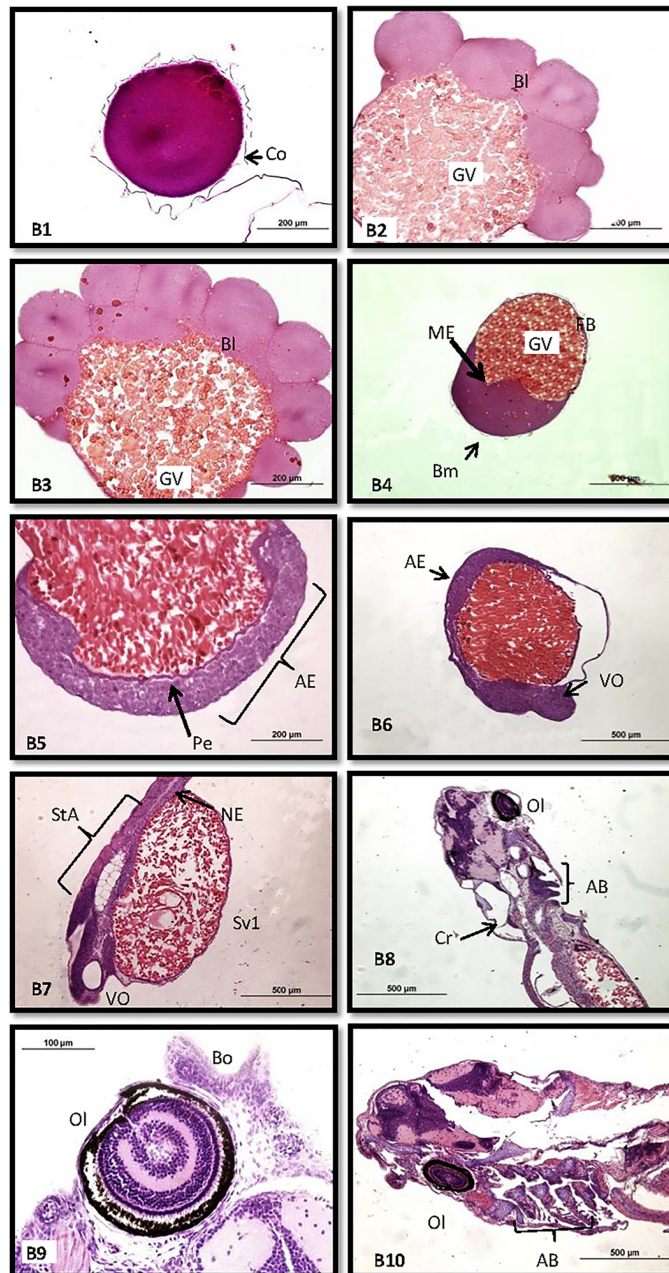


Fig.B. Imagens capturadas utilizando um Microscópio de luz. Nota-se presença do Córon (Co), Glóbulo de vitelo (GV), Movimento de Epibolia (ME), Blastômeros (Bl), Blastoderme (Bm), Saco vitelínico (SV), Fechamento do Blastoporo (FB), Periblasto (Pe), Anel Embrionário (AE), Somitos (St), Vesícula Óptica (VO), Nadadeira Embrionária (NE), Arcos Branquiais (AB), Coração (Cr), Olhos (Ol) e Abertura de boca (Bo).

ocorreu em aproximadamente 35 minutos após a anterior, originando 32 blastômeros (Fig.A3 e B3).

Na microscopia eletrônica de varredura foram observados blastômeros com tamanhos diferentes, com clivagem meroblástica ou parcial, ocorrendo esse processo apenas no polo animal (Fig.C3) Na quarta clivagem, foi visualizada a formação de dezesseis blastômeros (Fig.C4), sendo observadas células contendo citoplasma acidofílico, com tamanhos diferentes localizados no polo animal.

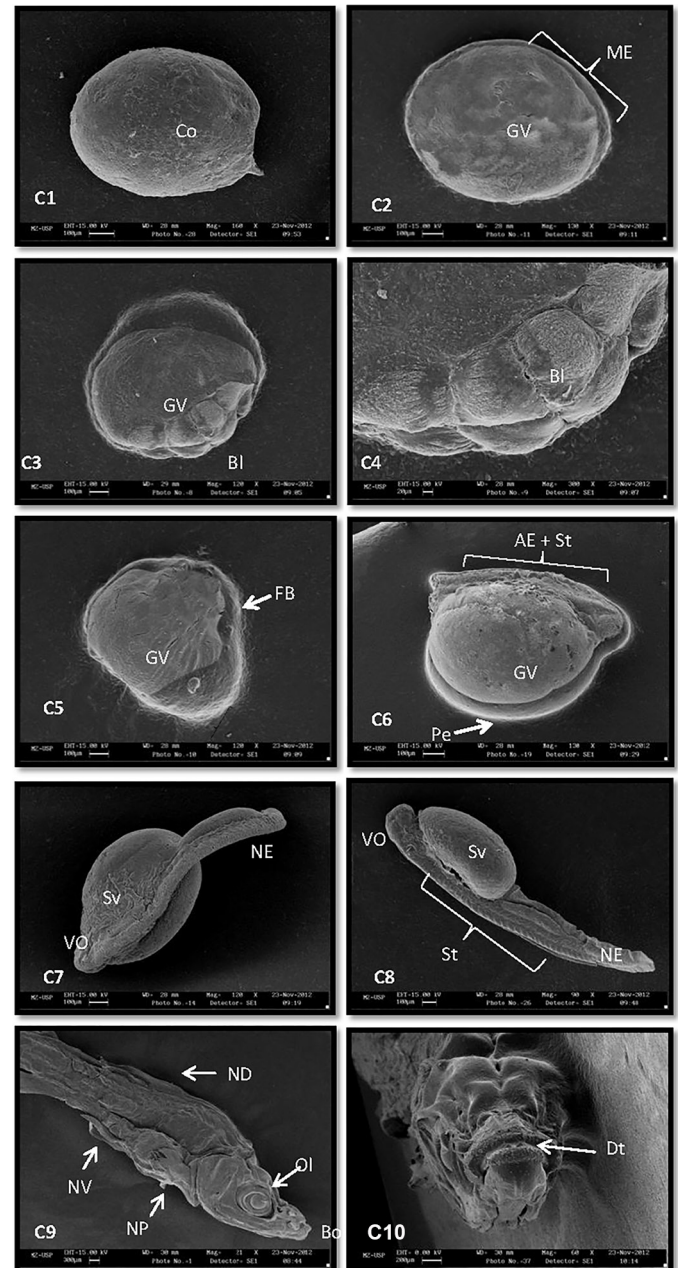


Fig.C. Imagens capturadas utilizando um Microscópio de Varredura (MEV). Nota-se presença do Córon (Co), Glóbulo de vitelo (GV), Movimento de Epibolia (ME), Blastômeros (Bl), Blastoderme (Bm), Saco vitelínico (SV), Fechamento do Blastoporo (FB), Periblasto (Pe), Anel Embrionário (AE), Somitos (St), Vesícula Óptica (VO), Nadadeira Embrionária (NE), Nadadeira Ventral (NV), Nadadeira Dorsal (ND), Nadadeira Peitoral (NP), Olhos (Ol), Boca (Bo) e Dentes (Dt).

A fase de blástula iniciou-se com cerca de três horas após fertilização e avançou até cerca de cinco horas e trinta minutos (Fig.A4 e B4). Nessa fase, a blastoderme apresentou uma forma de meia-lua no estágio avançado, com um padrão de clivagem bastante indeterminado, porém, contínuo. Na microscopia eletrônica de varredura foi observada uma camada sincicial de vitelo, também denominada de periblasto entre a blastoderme e os glóbulos de vitelo (Fig. C6).

A fase de gástrula iniciou-se com aproximadamente seis horas após fertilização, prorrogando-se até cerca de sete horas, com o fechamento do blastóporo (Fig.A5 e C4). Na histologia (Fig.B5) e na microscopia eletrônica de varredura (Fig.C6) evidenciou-se a presença de um periblasto e formação inicial de um anel embrionário. Em seguida foi observada a fase de nêurula, com diferenciação do embrião com formação do anel embrionário (Fig.A6 e B6) e surgimento da vesícula óptica e dos somitos (Fig.B6). Com 20,2 horas após a fertilização, houve o completo descolamento da cauda do embrião da vesícula vitelínica (Fig.A7, B7 e C7). Foi observada a presença de somitos, saco vitelínico e nadadeira embrionária (Fig.A8).

As larvas eclodiram em aproximadamente 32 horas após a fecundação (Fig.A9, B8, e C8), medindo em média 3,0mm de comprimento total, possuindo ainda um saco vitelínico pequeno e olhos pouco pigmentados, ocorre nessa fase também a formação do coração (Fig.B8). O olho é grande e se torna pigmentado com 4,60mm e a nadadeira peitoral aparece com aproximadamente 4,50mm, onde também já ocorre o surgimento dos arcos branquiais. Com cinco dias de incubação, foi evidenciada a abertura da boca, período em que a larva passa a alimentar-se, dependendo do ambiente externo para sobrevivência (Fig. B9).

Juvenil

Houve uma mudança ou metamorfose, onde a nadadeira embrionária originou as nadadeiras caudal e anal, sendo identificada a fase juvenil ou de alevinagem, aos dez dias após a fertilização, sendo observadas oito faixas transversais na região dorsal (Fig.A10). Na histologia foi observada a formação da lente e retina, além da presença de tecido cartilaginoso na formação de alguns ossos do crânio (Fig. B10).

Na microscopia eletrônica de varredura, foi observada a presença das nadadeiras caudal, anal, peitoral e ventral já formadas, assim como os olhos, dentes e sistema branquial (Fig.C9 e C10).

Imuno-histoquímica

Nas fases iniciais do desenvolvimento embrionário de *L. elongatus* não foram encontradas marcações dos anticorpos BMP2 e BMP4, sendo estas, observadas apenas à partir da fase larval nas regiões da boca (Figuras D2, D4 e D8), formação do encéfalo, maxilar e mandíbula (Fig.D4), intestino primitivo e coração (Fig.D6).

*Os anticorpos BMP-2 e BMP-4 apresentaram a mesma marcação, portanto, neste trabalho, optamos por colocar apenas as imagens das expressões de BMP-2.

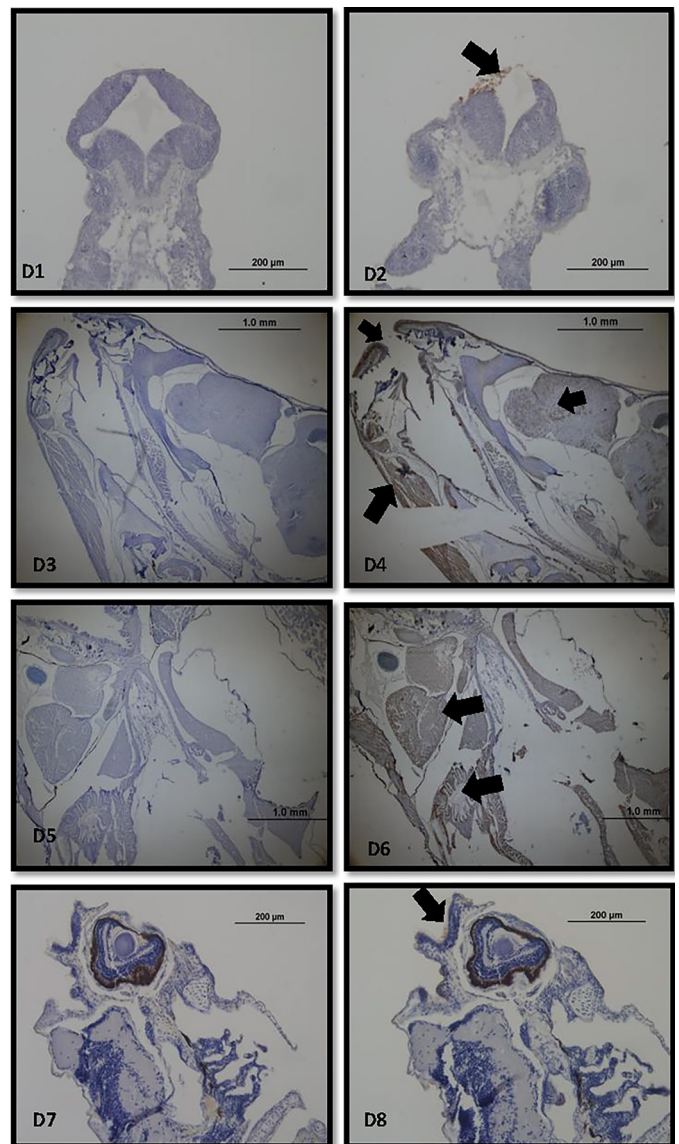


Fig.D. Imuno-histoquímica da fase larval (D1 e D2) e Juvenil (D3 à D8) de *L. elongatus*, onde a coluna da esquerda (D1, D3, D5, D7) representam o grupo controle, incubado com PBS e a coluna da direita (D2, D4, D6 e D8) o grupo incubado com o anticorpo BMP-2. (Os anticorpos BMP-2 e BMP-4 obtiveram a mesma marcação; portanto, neste trabalho optamos por colocar apenas as imagens das expressões de BMP-2).

DISCUSSÃO

Este trabalho mostrou a ontogenia da Piapara e as fases de destaque da osteogênese, além da expressão das proteínas morfogenéticas BMP-2 e BMP-4. As principais características encontradas nesta espécie foram o fechamento do blastóporo, formação de órgãos iniciais como coração, olhos e intestino primitivo, também descritas para *Brycon gouldingi* (Faustino 2010) e *Hypophthalmichthys molitrix Valenciennes* (Sividanes et al. 2012).

Por ser uma espécie que necessita de águas relativamente quentes para que sua prole possa se desenvolver, o período reprodutivo da espécie estudada foi de dezembro a janeiro, com temperatura de $24 \pm 3^\circ\text{C}$. A desova é total, sazonal e com pico, podendo haver um atraso de acordo com a

temperatura da água. A fecundação é externa, uma vez que são animais que realizam migração e por isso não cuidam da prole (Vazzoler 1996).

Conforme o evidenciado pelas técnicas de histologia e microscopia eletrônica de varredura, os ovos de *L. elongatus* são pelágicos, possuem grande espaço perivitelino após hidratação; são telolécitos, com um elevado suprimento de vitelo, o que garante a correta nutrição dos embriões conforme relatado por Woynarovich & Horváth (1983).

O desenvolvimento embrionário ocorreu nas fases de ovo, blástula, gástrula, nêurula, embrião, larva, pós-larva e alevino (juvenil), como descrito por Woynarovich & Horváth (1980). A segmentação dos ovos foi semelhante ao descrito para *Leporinus macrocephalus* (Reynalte-Tataje et al. 2001) em outras bacias hidrográficas.

O coração foi o primeiro órgão definitivo a se desenvolver e tornar-se funcional durante a embriogênese, ele se apresentava simples no momento da eclosão da larva, localizado na cavidade pericardial, anteriormente ao saco vitelínico e à cavidade abdominal, como também registrado em larvas recém-eclodidas de outros estudos (Morino 2005, Marques 2008).

A visão é fundamental para a sobrevivência dos peixes, pois a maioria aproveita este sentido para evitar predadores. O desenvolvimento do olho, em *L. elongatus* ocorreu de forma progressiva e, nas larvas com vitelo absorvido, no último momento avaliado, encontrava-se desenvolvido com os principais estratos formados e os núcleos dos cones e bastonetes começando a formar duas camadas, assim como observado em larvas de *Oreochromis niloticus* (Morrison et al. 2001) e em *Zungaro jahu* (Marques 2008).

Pela microscopia eletrônica de varredura foi possível acompanhar o desaparecimento do saco vitelínico, uma vez que este constitui um grande indicador de mortalidade, pois quanto menor o ovo e o saco vitelínico, maior as chances da larva não sobreviver por falta de nutrientes. Estes são indispensáveis durante o processo de metamorfose, alimentando o embrião e larva, até a abertura da boca, quando este passa então a possuir alimentação exógena, mecanismo também utilizado por outras espécies (Santos & Godinho 2002).

Seu corpo, é alongado, tornando-o mais ágil, podendo constituir uma manobra antipredatória. Os dentes de *L. elongatus* são característicos de espécies consideradas herbívoras, com tendência à onivoria, o que certamente reflete estratégias de sobrevivência em ambientes inundáveis como já fora observado por Resende et al (1996).

Sua boca é inferior, seu lábio superior é muito desenvolvido, diferentemente dos dados relatados por Reis et al. (2003) porém, em acordo com a descrição de Graziela et al. (2004); que enfatiza a alimentação herbívora com tendência a onivoria.

Não houve diferenciação significativa quanto ao tamanho dos ovos de *L. elongatus*. Foi possível observar o processo de metamorfose nas diversas técnicas, onde a nadadeira embrionária originou as nadadeiras caudal e anal; ossificação do esqueleto, abertura de boca, pigmentação dos olhos, aparecimento dos somitos, aparecimento de órgãos fundamentais, como o coração, sistema branquial, de-

saparecimento do saco vitelínico e descolamento da cauda, processo este descrito por Nakatani et al. (2001).

Com relação à imunohistoquímica, foi possível avaliar que a marcação das proteínas BMP-2 e BMP-4 ocorreu em localizações muito semelhantes, fato também relatado por Wozney (1992), que cita que estas são praticamente idênticas. Observou-se a expressão dessas proteínas somente a partir da fase larval, nas regiões da boca, coração e cartilagem cranial. Este comportamento da expressão das proteínas BMP-2 e BMP-4 deve-se provavelmente por ainda não ter havido diferenciação celular suficiente para essas proteínas exercerem seus papéis no processo de formação do tecido ósseo.

A presença da expressão dessas proteínas na cartilagem cranial deve-se possivelmente ao fato da BMP induzir a formação de osteoblastos e também por serem secretadas por esse tipo celular (Katagiri 1994); Matsumura et al. (1992) sugerem que a BMP é liberada para regular a proliferação e diferenciação das células mesenquimais de forma semelhante a sua função, como visto nas embrionárias. Portanto, acreditamos que as BMPs não foram expressas nas fases anteriores devido a não diferenciação das células ou ainda por não ocorrer ativação de tais proteínas nas fases iniciais do desenvolvimento embrionário da Piapara, sendo necessário um estudo mais aprofundado para o correto entendimento do resultado obtido.

Este trabalho trouxe informações importantes sobre a ontogenia de *L. elongatus*, descrevendo os principais acontecimentos que devem ser observados para evitar possíveis causas de mortalidade comuns durante a reprodução desses animais, como predação das larvas, vitelo reduzido em alguns indivíduos, ocasionando a má nutrição do embrião e sua morte e aumento da temperatura das águas alagadas, que levaria à uma eclosão tardia, Dessa forma, a melhora das estratégias reprodutivas, possibilitará um incremento da população da espécie, seja com objetivos comerciais ou de repovoamento da espécie.

REFERÊNCIAS

- Chandler R.L., Chandler K.J., McFarland K.A. & Mortlock D.P. 2007. Bmp2 transcription in osteoblast progenitors is regulated by a distant 3' enhancer located 156.3 kilobases from the promoter. *Mol. Cell. Biol.* 27:2934-2951.
- Faustino F. 2010. Desenvolvimento embrionário e larval de *Brycon gouldingi* (Teleostei, Characidae). Dissertação de Mestrado, Unesp-Jaboticabal, 124p. <http://www.caunesp.unesp.br/publicacoes/dissertacoes_teses/dissertacoes/Dissertacao%20Francine%20Faustino.PDF>
- Géry J., Mahnert V. & Dlouhy C. 1987. Poissons characoïdes non Characidae du Paraguay (Pisces, Ostariophysi). *Revue Suisse Zool.* 94:357-464.
- Godinho H.P. & Godinho A.L. 2003. Águas, Peixes e Pescadores do São Francisco das Minas Gerais, Editora PUCMinas, Belo Horizonte. 468p.
- Graziela C.B., Rosemaria F., Norma S.H. & André B.G. 2004. Dieta de espécies de Anostomidae (Teleostei, Characiformes) na área de influência do reservatório de Manso, Mato Grosso, Brasil. *Iheringia, Sér. Zool.* 94(1), março.
- Katagiri T., Yamaguchi A., Komaki M., Abe E., Takahashi N., Ikeda T. & Suda T. 1994. Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J. Cell Biol.* 127(6):1755-1766.
- Machado A.B.M., Drummond G.M. & Paglia A.P. 2008. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Ministério do Meio Ambiente, Brasília.

- Marques C. 2008. Análise histológica e de microscopia eletrônica do desenvolvimento inicial de jaú (*Zungaro jahu*). Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP. 84p.
- Matsumura K., Tome F.M., Collin H., Azibi K., Chaouch M., Kaplan J.C., Ferdeau M. & Campbel K.P. 1992. Deficiency of the 50 K dystrophin-associated glycoprotein in severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy. *Nature* 359(6393):320-322.
- Morino K., Petersen K.F., Dufour S., Befroy D., Frattini J., Shatzkes N., Neschen S., White M.F., Bilz S., Sono S., Pypaert M. & Shulman G.I. 2005. Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents. *J. Clin. Invest.* 115(12):3587-3593.
- Morrison C.M., Miyake T. & Wright J.R. 2001. Histological study of the development of the embryo and early larva of *Oreochromis niloticus* (Pisces:Cichlidae) *J. Morphol.* 247:172-195.
- Nakatani K., Agostinho A.A., Baumgartner G., Bialecki A., Sanches P.V., Alralis M.C. & Pavanelli C.S. 2001. Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação. Editora da Universidade Estadual de Maringá, Maringá. 378p.
- Rana K.J. 1985. Influence of egg size on the growth, onset of feeding, point-of-no-return, and survival of unfed *Oreochromis mossambicus* fry. *Aquacult.* 46(2):119-131.
- Reis R.E., Kullander S.O. & Ferraris-Júnior C.J. 2003. Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. Editora PUC RGS, Porto Alegre.
- Resende E.K., Pereira R.A.C., Almeida V.L.L. & Silva A.D. 1996. Alimentação de peixes carnívoros da planície inundável do rio Miranda, Pantanal, Mato Grosso do Sul. *Bolm Pesquisa* 3, Embrapa-CPAP, Corumbá, MS. 36p.
- Reynalte-Tataje D., Zaniboni E.F. & Muelbert B. 2001. Stages of the embryonic development of the piavuçu *Leporinus macrocephalus*. *Acta Scientiarum* 23(4):823-827.
- Rippamonti U. & Reddi A.H. 1994. Periodontal regeneration: potential role of bone morphogenetic proteins. *J. Periodontal Res.* 29:225-235.
- Santos J.E. & Godinho H.P. 2002. Ontogenic events and swimming behavior of larvae of the characid fish *Salminus brasiliensis* (Cuvier, Characiformes, Characidae) under laboratory conditions. *Revta Bras. Zool.* 19(1):163-171.
- Seixas J.F., Brás T., Gomide J.M., Oliveira A.T.M., Donzele M.G.A. & Menin J.L.E. 2000. Anatomia funcional e morfometria dos intestinos e dos cecos pilóricos do Teleostei (Pisces) de água doce *Brycon orbignyanus*. *Revta Bras. Zootec.* 29(2):313-324.
- Sividanes V.P., Dutra F.M. & Mendonça P.P. 2012. Desenvolvimento embrionário da carpa prateada (*Hypophthalmichthys molitrix* Valenciennes, 1844). *Revta Bras. Ciênc. Vet.* 19(1):21-25.
- Tam P.P., Kanai-Azuma M. & Kanai Y. 2003. Early endoderm development in vertebrates: lineage differentiation and morphogenetic function. *Curr. Opin. Gen. Develop.* 13(4):393-400.
- Vazzoler A.E.A.M. 1996. *Biologia da Reprodução de Peixes Teleosteos: teoria e prática*. Editora UEM/SBI, Maringá. 169p.
- Wozney J.M. 1992. The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol. Reprod. Develop.* 32(2):160-167.
- Woynarovich E. & Horváth L.A. 1980. The artificial propagation of warm-water finfishes: manual of extensions. *FAO Fisheries Technical* 201:1-183.
- Woynarovich E. & Horváth L.A. 1983. Propagação artificial de peixes de águas tropicais: manual de extensão. *FAO/Codevasf/CNPq*, Brasília, DF. 80p.