



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP  
(CAUNESP)**

*São Paulo State University - Aquaculture Center*



**Ontogenia do trato digestório e  
desenvolvimento gonadal de *Betta splendens*:  
aspectos morfológicos**

**REGIANE CRISTINA DA SILVA**

**Bióloga**

**Jaboticabal  
São Paulo - Brasil  
2013**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP  
(CAUNESP)**

*São Paulo State University - Aquaculture Center*



**Ontogenia do trato digestório e  
desenvolvimento gonadal de *Betta splendens*:  
aspectos morfológicos**

**Mestranda: Regiane Cristina da Silva**

**Orientadora: Profa. Dra. Laura Satiko Okada Nakaghi**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), Campus de Jaboticabal como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Aquicultura.

**Jaboticabal  
São Paulo - Brasil  
2013**

*“Viver é acalentar sonhos e esperanças, fazendo da fé a nossa inspiração maior. É buscar nas pequenas coisas, um grande motivo para ser feliz!”.*

*Mário Quintana*

## *Homenagem e Dedicatória*

### *À minha guerreira e amada MÃE ...*

*Ela tem a capacidade de ouvir o silêncio.  
Adivinhar sentimentos.  
Encontrar a palavra certa nos momentos incertos.  
Nos fortalecer quando tudo ao nosso redor parece ruir.  
Sabedoria emprestada dos deuses para nos proteger e amparar.  
Sua existência é em si um ato de amor.  
Gerar, cuidar, nutrir.  
Amar, amar, amar...  
Amar com um amor incondicional que nada espera em troca.  
Afeto desmedido e incontido, Mãe é um ser infinito.*

*(Trecho do livro Minha mãe, meu mundo).*

### *Ao meu saudoso PAI...*

#### *Ao meu pai*

*Quatorze anos já se passaram  
Desde que seu rosto vi pela última vez,  
Mas seus ensinamentos permaneceram  
Para sempre, seguidos com altivez.*

*Que felicidade ter um pai amigo,  
Sempre alegre do trabalho voltando,  
Atencioso com todos e carinhoso comigo,  
Que por ser a caçula o ficava esperando.*

*Partiu cedo, não chegou a envelhecer,  
Sua clarineta ninguém mais tocou,  
Acabou o encanto do nosso entardecer.*

*A saudade tomou lugar do meu sorriso,  
As lágrimas vertidas o tempo secou  
E Ele faz parte da Orquestra do paraíso!...*

*Hilda Persiani, adaptado por Regiane C. da Silva*

***AMO VOCÊS!***



## *Agradecimento Especial*

*À Prof<sup>a</sup>. Dra. Laura Satiko Okada Nakaghi,*

*A você que me ensinou não só como pesquisar, mas me ensinou a lidar com as dificuldades que a vida impõe para nos testar, você me deu oportunidades que possibilitaram o meu crescimento pessoal e intelectual.*

*Em nosso primeiro contato você me passou tranquilidade e competência, senti naquela hora que mulher dedicada você é, e ao passar dos anos só confirmei o que senti naquele instante.*

*Além de amiga, professora, orientadora é também uma grande companheira. Agradeço a Deus por colocar você, Laura, em meu caminho para nortear-me e mostrar-me este mundo incrível que é o da pesquisa.*

*Agradeço por ter conhecido uma pessoa tão especial para todos que o cercam, que sendo determinada cumpre seus objetivos com classe e seriedade, obrigada por me ensinar este caminho...Você fez parte da minha vida e fará pela eternidade.*

*Obrigada!*

*Agradeço também à Francine Faustino, Fernanda Nogueira Valentin, Maria do Carmos Faria Paes, Matheus Pereira dos Santos e Nivaldo Ferreira do Nascimento pelas valiosas contribuições, sem vocês este trabalho não teria sido concretizado. Valeu meus amigos! Obrigada.*

*“Para mim, sábio não é aquele que proclama palavras de sabedorias, mas sim aquele que demonstra sabedoria em seus atos”.*

*São Gregório*

## ***Agradecimentos***

*Agradeço a todos que me apoiaram quando estava em busca da realização deste sonho.*

*Agradeço a Deus por me dar a vida, saúde perfeita e todas as possibilidades de realizar este trabalho.*

*Ao meu pai (in memoriam) José Nivaldo da Silva e minha mãe Claudete Cune da Silva pelo amor incondicional.*

*Aos meus irmãos Éderson A. da Silva e Cristiane da Silva que tiveram muita paciência e me auxiliaram nos momentos difíceis.*

*Ao meu amor... Samuel dos Reis Junior... por ser minha fonte de força e calma, mostrando-me que cada dia é um novo recomeço!*

*Aos amigos da República Balalaika que me acolheram com muito carinho.*

*Aos amigos ... Angélica Cristina Gimenez, Breno Manzini, Cleonice Cristina Hilbig, Fernanda Nogueira Valentin, Francine Faustino, Lílian Cristina Makino, Maria do Carmo Faria Paes, Marcelo Henrique Correa Assunção, Matheus Pereira dos Santos e Nivaldo Ferreira do Nascimento pelas horas de convivência, amizade, momentos de descontração e aprendizagem que ficarão para sempre em minha memória.*

*Andrea Cristina Scarpa Bosso pelas horas de ensinamentos, paciência e compreensão. E sua linda cachorrinha Nina pelos momentos de descontração.*

*José Roberto Ferreira Alves Junior pelos jogos imperdíveis de vôlei, tempos de risadas e sustos.*

*Lílian Cristina Makino e Márcio Alves dos Santos pelas alegrias.*

*Ao Luiz Gustavo Giannecchini pela ajuda, amizade e dedicação.*

*Fernanda Borges pelos momentos divertidos e agradáveis.*

*Marcio R. Reche e Cleber Fernando Menegasso Mansano que me apoiaram, me incentivaram encorajando-me para a realização da prova de seleção do mestrado.*

*William Carlos dos Santos por trazer felicidade ao nosso ambiente de trabalho.*

*Letícia Higuchi e Adriana Bordignon pelas alegrias compartilhadas.*

*Ao Patrick Hainfellner, Thiago Gonçalves de Souza, Rafael Yutaka Kuradomi, Camila Nomura Pereira Boscolo, Thiago Scremin Pereira, Eduardo Criscuolo Urbinati e Marcelo Maia Pereira pelas orientações, trocas de experiências e amizade.*

*Ao amigo Sr. Orandi Mateus, histotécnico do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAV/UNESP pelas horas de dedicação, pelo esforço, paciência, atenção e apoio para conseguirmos bons cortes histológicos para este trabalho e também pelos momentos de alegria e experiências transmitidas.*

*Ao Valdecir F. de Lima que além de um grande profissional é um grande amigo e, que em todos os momentos se prontificou e me ajudou para que tudo ocorresse perfeitamente durante este trabalho.*

*Ao amigo Pedro H. de Oliveira Viadanna pela compreensão e paciência durante a leitura das lâminas e pelo valioso auxílio.*

*À Jéssica Cristina dos Santos Marques e Marina Carla Bezerra da Silva pela preciosa ajuda.*

*Aos amigos e colegas de pós-graduação do CAUNESP pela companhia, trocas de experiências, festas, viagens, momentos inesquecíveis e amizade.*

### ***Agradeço também:***

*Ao Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP) que me proporcionou uma oportunidade de ingressar no mundo da pesquisa.*

*À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias “Universidade Estadual Paulista” Campus de Jaboticabal, pelo auxílio.*

*À diretoria, coordenadores e funcionários da Pós-Graduação do CAUNESP, especialmente à Veralice Cappatto e David Oliveira Lorente pela atenção e dedicação.*

*A todos os profissionais do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAVJ/UNESP, em especial, àqueles do Laboratório de Histologia com os quais convivi durante todo esse período.*

*Aos funcionários do Laboratório de Microscopia Eletrônica da FCAVJ/UNESP, em especial à Cláudia Aparecida Rodrigues (Claudinha) e Cláudia Regina Sanches Ribeirinho pelo auxílio durante o processamento das amostras de microscopia eletrônica de varredura e amizade.*

*Ao Prof. Dr. Sergio Ricardo Batlouni por colaborar com suas valiosíssimas dicas.*

*Ao Prof. Dr. João Batista Kochenborger Fernandes pela gentileza de fornecer o espaço físico e os animais para que eu pudesse realizar minhas coletas e também pelas dicas fornecidas durante a qualificação.*

*A Profa. Dra. Maria Célia Portella pelas experiências transmitidas a mim, contribuindo com minha carreira profissional e acadêmica durante a qualificação.*

*Ao Prof. Dr. Gilson Volpato pela instrução e norteamto no projeto.*

*Ao Prof. Dr. João Ademir de Oliveira pelo auxílio, comprometimento e paciência para realização das análises estatísticas.*

*Ao Professor Dr. Sérgio Fonseca Zaiden pela correção e ensinamentos durante a defesa da dissertação e pelo período de convivência.*

*A Dra. Lilian Cristina Makino pelas valiosas sugestões fornecidas durante a defesa da dissertação.*

*Aos professores do CAUNESP por transmitir experiências de vida e formação profissional.*

*Ao CNPq, pelo auxílio financeiro concedido, em forma de bolsa de Mestrado possibilitando a realização deste trabalho.*

*A todos aqueles que contribuíram de alguma forma, aqui omitidos, mas não esquecidos... meu Muito Obrigada!!!*

><(((°> \*.\* ><(((°>

***“Eslege para teu amigo o homem mais virtuoso que conheces”.***

***Pitágoras***

## Sumário

LISTA DE FIGURAS .....	III
LISTA DE TABELAS .....	VI
Resumo geral .....	VII
General abstract .....	VIII
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	1
1.1 Espécie em estudo .....	4
1.2 Morfologia do trato digestório.....	7
1.3 Desenvolvimento das gônadas.....	12
2. REFERÊNCIAS .....	16
<b>ARTIGO 1: Ontogenia do trato digestório de <i>Betta splendens</i> .....</b>	<b>23</b>
Resumo .....	23
Abstract.....	24
1. INTRODUÇÃO.....	25
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
2.1 Manejo reprodutivo .....	26
2.2 Coletas amostrais.....	27
2.3 Análise estereomicroscópica e morfometria.....	28
2.4 Processamento das amostras e análise histológica (Microscopia de luz - ML).....	28
2.4.1 Inclusão em Histosec® .....	28
2.4.2 Inclusão em Historresina .....	28
2.5 Processamento das amostras e análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	29
3. RESULTADOS .....	29
4. DISCUSSÃO .....	45
5. CONCLUSÕES .....	52
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	52
7. AGRADECIMENTOS .....	53
8. REFERÊNCIAS .....	54

---

<b>ARTIGO 2: Desenvolvimento Gonadal em <i>Betta splendens</i>: aspectos morfológicos. .</b>	<b>60</b>
Resumo .....	60
Abstract.....	61
1. INTRODUÇÃO.....	62
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	63
2.1 Manejo reprodutivo .....	63
2.2 Coletas amostrais.....	63
2.3 Análise estereomicroscópica e morfometria.....	64
2.4 Processamento das amostras e análise em microscopia de luz (ML) .....	64
2.4.1 Inclusão em Historec® .....	64
2.4.2 Inclusão em Histeresina.....	65
2.5 Processamento das amostras e análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	65
3. RESULTADOS .....	66
4. DISCUSSÃO.....	78
5. CONCLUSÃO.....	80
6. AGRADECIMENTOS .....	80
7. REFERÊNCIAS .....	82
8. ANEXOS .....	84
8.1 Certificado de Comissão de Ética no uso de Animais .....	84

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO GERAL

**Figura 1:** Exemplares adultos de *Betta splendens*. **A:** Fêmea; **B, C e D:** Machos.....5

### ARTIGO I

**Figura 1:** Média de comprimento total (CT) e padrão (CP) em milímetros (mm) de larvas de *Betta splendens* a partir da eclosão.....30

**Figura 2:** Média de peso em microgramas ( $\mu\text{g}$ ) de larvas de *Betta splendens* a partir da eclosão.....30

**Figura 3:** Morfologia externa de larvas de *B. splendens*. **A:** Larva recém-eclodida com postura distendida, intestino primitivo (seta) e nadadeira embrionária (\*). **B:** 10 hpe. **C:** 20 hpe, abertura da boca (ponta de seta). **D:** 32 hpe, redução acentuada do saco vitelínico. **E:** 44 hpe. **F:** 56 hpe. **G:** 80 hpe. **H:** 308 hpe, boca na região dorso-terminal. **Legenda:** intestino primitivo (seta); nadadeira embrionária (\*); saco vitelínico (sv); deslocamento da cabeça (seta pontilhada) e boca (ponta de seta). Fotos de A-G apresentam barra de calibração de 0,5mm e H barra de 1mm.....32

**Figura 4:** Fotomicrografias de larvas de *B. splendens*. Coloração HF. **A:** Larva recém-eclodida. **B:** 6 hpe; primórdio da cavidade bucofaríngea e intestino posterior. **C:** 10 hpe; cavidade oral fechada, destaque em CI: (círculo) e, CII (retângulo) fissura do tubo digestório. **D:** 14 hpe; lúmem na região mediana do tubo digestório, surgimento do pronefro e porção final do intestino posterior. **E:** 32 hpe; olho; cavidade oral (círculo), lábios, língua, arcos branquiais e, em destaque camada sincicial (ponta de seta) absorvendo vitelo. **F:** 32 hpe; faringe; esôfago, intestino, vesícula gasosa com seu ducto pneumático, fígado, vesícula biliar e saco vitelínico com considerável redução. **Legenda:** saco vitelínico (sv); notocorda (no); olho (o); formação da cavidade bucofaríngea (\*); cavidade bucofaríngea (cb); faringe (fa); esôfago (es); intestino primitivo (seta); vesícula gasosa (vg); ducto pneumático (dp); pronefro ou rim primitivo (pro); fígado (f); vesícula biliar (vb); intestino (in); língua (l) e arcos branquiais (1, 2, 3 e 4). **Barra de calibração.** **A:** 100 $\mu\text{m}$ . **B:** 100 $\mu\text{m}$ . **C:** 100 $\mu\text{m}$ , em destaque: círculo (20 $\mu\text{m}$ ); destaque em retângulo (5 $\mu\text{m}$ ). **D:** 30 $\mu\text{m}$ . **E:** 30 $\mu\text{m}$ , em destaque (5 $\mu\text{m}$ ). **F:** 30 $\mu\text{m}$ .....38

**Figura 5:** Fotomicrografias de larvas de *B. splendens* com ênfase no trato digestório. Coloração HF com exceção da H. **A:** 56 hpe, intestino cefálico e anterior, fígado, brânquias com lamelas secundárias (seta). **B:** 56 hpe, cavidade bucal. **C:** 56 hpe, faringe e esôfago. Destaque: célula mucossecretora. **D:** 68 hpe, esôfago com pregas. **E:** 80 hpe, glândulas anexas ao trato digestório (vesícula biliar, fígado e pâncreas); intestino posterior (ânus). **F:** 86 hpe, epitélio intestinal. **G:** 86 hpe, célula caliciforme na mucosa intestinal. **H:** 308 hpe, *Artêmia* sp. no intestino. Coloração HE. **Legenda:** cavidade bucofaríngea (cb); botão gustativo (bg); Lamelas branquiais (seta fechada); brânquias (bq); faringe (fa); esôfago (es); estômago (st); camada muscular (m); vesícula gasosa (vg); fígado (f); pâncreas (p); vesícula biliar (vb); intestino (in); epitélio (ep); porção inicial (1), porção média (2) e porção final (3) do intestino; célula caliciforme (seta aberta); cisto de *Artêmia* sp. (cabeça de seta); reto (r) e ânus (\*). **Barra de calibração.** **A:** 100 $\mu\text{m}$ . **B:** 10  $\mu\text{m}$ . **C:** 20 $\mu\text{m}$ , em destaque (5 $\mu\text{m}$ ). **D:** 20 $\mu\text{m}$ . **E:** 30 $\mu\text{m}$ . **F:** 20 $\mu\text{m}$ . **G:** 10  $\mu\text{m}$ . **H:** 100  $\mu\text{m}$ .....40

**Figura 6:** Fotomicrografias de *B. splendens*, coloração HE. **A:** 74 hpe, fígado com vacúolos (seta). **B:** 80 hpe, fígado com vacúolos (seta). **C:** 86 hpe, fígado com aspecto normal. **D:** Ácinos pancreáticos (em destaque). **E:** 74 hpe, alguns componentes do trato digestório. **F:** 80 hpe, cavidade bucofaríngea apresentando botões gustativos (em destaque). **Legenda:** vesícula gasosa (vg); cavidade bucofaríngea (cb); língua (l); melanóforos (cabeça de seta); faringe (fa); esôfago (es); estômago (st); fígado (f); vacúolos no fígado (seta); vesícula biliar (vb); pâncreas (p) e intestino (in). **Barra de calibração.** **A:** 30µm. **B:** 30µm. **C:** 30µm. **D:** 5µm. **E:** 100µm. **F:** 30µm, em destaque 10µm.....42

**Figura 7:** Eletronmicrografias de varredura de *B. splendens*. **A:** Larva recém-eclodida. **B:** 8 hpe, formação do sulco bucal (destaque) **C:** 16 hpe, boca. **D:** 18 hpe, boca com lábios separados e cílios no lábio superior (destaque). **E:** 20 hpe, visão lateral da larva, redução do saco vitelínico. **F:** 40 hpe, dentículos maxilares. **G:** 80 hpe, Abertura oral com a valva superior (\*) e, em destaque um neuromasto. **H:** 308 hpe, visão lateral e, em destaque a boca com numerosos dentes no lábio inferior. **I:** 308 hpe, dentes pontiagudos. **Legenda:** nadadeira embrionária (ponta de seta); saco vitelínico (sv); boca (b); cavidade oral (co); membrana branquiostegial (mb); nadadeira peitoral (np) e dentículos (seta).....43

## ARTIGO II

**Figura 1:** Fotomicrografias de gônadas indiferenciadas de larvas *B. splendens*. Coloração HE. (A, B, C, D: peixes com 4 dpe; E, F peixes com 13 dpe). **Ai, Aii, Bi e Bii:** Corte longitudinal: primórdio gonadal dorsalmente ao trato intestinal. **CI e CII:** Corte sagital: gônadas aos pares. **DI:** Gônada compacta. **DII:** Em detalhe, gônias e células foliculares. **E:** Células foliculares com formato pavimentoso. **FI:** Células foliculares apresentando formato triangular. **FII:** Em detalhe, células somáticas e ovogônias. **Legenda:** gônada (g); gônias (go); fígado (f); vesícula gasosa (vgs); intestino (in) e células somáticas (cs).....67

**Figura 2:** Fotomicrografias de ovário de *B. splendens*. **A e B:** 20 dpe, cavidade na região central da gônada, ovogônias indiferenciadas e diferenciadas. **C, D, E e F:** 34 dpe, ovócitos em crescimento primário, lamelas ovíferas, espaço interlamelar, túnica albugínea e cavidade ovariana. **G:** 41 dpe, ninhos de ovogônias próximos ao epitélio germinativo (seta). **H e I:** 76 dpe, ovócitos em crescimento primário, núcleo com nucléolos perinucleolares, grânulos de vitelogenina e células foliculares. **Legenda:** gônada (g); ovogônia (og); ovogônia indiferenciada (ogi); ovogônia diferenciada (ogd); cavidade ovariana (cvo); células somáticas (cs); ovócito em crescimento primário (op); lamela ovífera (lo); túnica albugínea (ta); espaço interlamelar (ei); vitelogenina (vg); núcleo (n); nucléolos perinucleolares (np) e células foliculares (cf).....72

**Figura 3:** Fotomicrografias de ovário de *B. splendens*. **A:** 90 dpe, cavidade celomática preenchida pelo ovário. Observar ovócitos em crescimento primário. **B e C:** 111 dpe, ovócitos em crescimento primário com alvéolos corticais e nucléolos. **D:** 118 dpe, ovócito em crescimento primário, citoplasma com grânulos de vitelogenina e sem nucléolos evidentes **E:** 118 dpe, em detalhe, células foliculares hipertróficas. **F:** 118 dpe, ovócito em crescimento secundário, vesícula germinativa circundada por lipídios. **G:** 118 dpe, grânulos de vitelogenina. **H:** 118 dpe, grânulos de vitelogenina com formato esférico e alvéolos corticais. **I:** 118 dpe, ovócito em crescimento

secundário com vesícula germinativa migrando em direção à periferia. **J:** 118 dpe, ovócito apresentando reentrâncias e sulcos **K:** 118 dpe, sulcos no ovócito. **Legenda:** gônada (g); estômago (et); cavidade celomática (cc); túnica albugínea (ta); ovócito em crescimento primário (op); alvéolos corticais (ac); nucléolos perinucleolares (np); núcleo (n); teca (t); citoplasma (c); células foliculares (cf); ovócito em crescimento secundário (os); lipídios (lp); vesícula germinativa (vg) e vitelogenina (v).....73

**Figura 4:** Média de comprimento total (CT) e padrão (CP) em centímetros (cm) de *Betta splendens*.....74

**Figura 5:** Média de peso em miligramas (mg) de *Betta splendens*.....75

**Figura 6:** Ovários de fêmeas de *B. splendens* em diferentes estádios de desenvolvimento (macroscopicamente). **A:** Gônadas imaturas. **B:** Gônadas em maturação e **C:** Gônadas em maturação avançada. **Legenda:** gônadas (g); vísceras (vi) e gordura visceral (\*)......75

**Figura 7:** Ovário maduro de *B. splendens*.....75

**Figura 8:** Fotografias de fêmeas adultas de *B. splendens* com sinais secundários durante o período reprodutivo. **A:** Fêmea com papila urogenital proeminente e esbranquiçada; listras corporais verticais (seta). **B:** Papila urogenital localizou-se ventralmente e, entre as nadadeiras pélvicas.....76

**Figura 9:** Eletronmicrografia de varredura de *B. splendens* com ênfase na papila urogenital. **A:** Juvenil, posição do peixe. **B e C:** Ânus e papila urogenital iniciando sua protuberância. **D:** papila urogenital bem externalizada, indicando aptidão da fêmea para acasalamento. **E:** Início da regressão papilar. **F:** Papila regredida. **Legenda:** ânus (a); papila urogenital (p); cabeça de seta mostra papila urogenital iniciando regressão e seta indica papila urogenital regredida.....77



## LISTA DE TABELAS

### INTRODUÇÃO GERAL

**Tabela 1:** Classificação zoológica de *Betta splendens*.....5

### ARTIGO I

**Tabela 1.** Características estruturais do desenvolvimento larval de *B. splendens* de acordo com o tempo de desenvolvimento em horas pós-eclosão (hpe).....44

SILVA, R. C. (2013). Ontogenia do trato digestório e desenvolvimento gonadal de *Betta splendens*: aspectos morfológicos. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal-SP.

## Resumo geral

O *Betta splendens* destaca-se como uma das espécies ornamentais mais cultivadas no mundo. Dentre os fatores que determinam o sucesso de criação, estão aqueles relacionados às alterações morfológicas do trato digestório e o desenvolvimento normal das gônadas. Este estudo objetivou acompanhar e registrar o desenvolvimento do trato digestório e gonadal do *B. splendens* por meio de técnicas de histologia e de microscopia eletrônica de varredura (MEV). As larvas foram obtidas a partir de reprodução natural, mantidas sob cuidado parental do macho e coletadas em tempos pré-estabelecidos durante o desenvolvimento. Em cada tempo de coleta, os peixes foram anestesiados em solução de bezoncaína, pesados e fixados em formol 4% tamponado e também em Karnovsky modificado. A temperatura da água durante a ontogênese foi de  $28,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$  e o pH  $6,9 \pm 0,3$ . A eclosão ocorreu 28 horas pós-fertilização. Neste momento, as larvas apresentavam-se com trato digestório incompleto, sendo visualizado um tubo reto e simples com um epitélio constituído por uma camada de células colunares na região ventral e posterior da larva, representando o intestino primitivo. Com 18 horas pós-eclosão (hpe) foi observada a abertura bucal e dentes maxilares. O tubo digestório estava totalmente aberto com 32 hpe e a língua apresentava botões gustativos e melanóforos na região dorsal com 40 hpe. A absorção total do saco vitelínico ocorreu com 74 hpe, quando foi observado conteúdo no estômago e intestino. Neste período, o trato digestório e glândulas anexas estavam totalmente diferenciados e funcionais. Levando em consideração o hábito alimentar e suas particularidades, o conhecimento morfofuncional do trato digestório se faz necessário para estabelecer dietas que atendam às exigências desta espécie, visando melhorias no desempenho produtivo e saúde dos animais. Em relação às gônadas, peixes com até três dias pós-eclosão (dpe) não foram visualizados vestígios gonadais, porém, com quatro dpe apresentavam gônadas indiferenciadas que foram localizadas dentro da cavidade celomática. Com 13 dpe foi observado um aumento na quantidade de gônias preenchendo a gônada. Com 76 dpe, os ovócitos em crescimento primário ou pré-vitelogênico apresentavam poucos grânulos de vitelogenina em seu citoplasma e células foliculares deram início à formação da teca. Ovários com ovócitos em crescimento primário, alvéolos corticais e núcleo centralizado com nucléolos perinucleolares foram visualizados com 111 dpe. Quando as fêmeas alcançaram 118 dpe, os ovários eram formados predominantemente por ovócitos em crescimento secundário ou vitelogênico. A vesícula germinativa se deslocou do sentido centro à periferia e não apresentava contornos nítidos. Gotículas de lipídios puderam ser visualizadas na região mais interna do citoplasma. Os alvéolos corticais dispostos em várias camadas se localizavam na periferia dos ovócitos. Em alguns ovócitos em crescimento secundário foram notadas reentrâncias na zona radiata. As fêmeas, quando alimentadas e manejadas adequadamente, podem reproduzir-se com quatro meses de idade. As informações deste estudo são importantes e contribuirão para o aperfeiçoamento da larvicultura, reprodução e criação em cativeiro do *B. splendens*.

**Palavras-chave:** ontogenia, peixe ornamental, desenvolvimento, ovário.

SILVA, R. C. (2013). Ontogeny of the digestive tract and gonadal development of *Betta splendens*: morphological aspects. Master Thesis (Master Degree in Aquaculture) – Aquaculture Center of São Paulo State University, Jaboticabal-SP.

### General abstract

The *Betta splendens* highlights like one of the most cultivated ornamental fish in the world. Among the factors that determine the success of rearing, are factors related to morphological changes of the digestive tract and normal development of the gonads. This study aimed to monitor and record changes in the digestive tract morphology and gonadal development of *B. splendens* by techniques of histology and scanning electron microscopy (SEM). The larvae were obtained from natural reproduction and were kept under male parental care and collected in pre-established time of development. At each sampling time, fish were anesthetized in a solution of bezoncaine, weighed and fixed in 4% buffered formaldehyde and either in modified Karnovsk solution. The water temperature during ontogeny was  $28.0 \pm 2.0$  °C and pH  $6.9 \pm 0.3$ . The hatching occurred at 28 hours after fertilization. At this time the larvae presented an incomplete digestive system, being viewed as a straight tube lined by a simple epithelium that consisted by a layer of columnar cells located in the ventral and posterior regions of the larva, representing the primitive gut. At 18 hours post-hatching (hph) was observed the mouth opening, and maxillary teeth. The digestive tract was totally opened at 32 hph and tongue showed taste buds and melanophores in the dorsal region at 40 hpe. The total absorption of the yolk sac occurred at 74 hph, when feed particles were observed into the stomach and intestine. In this period, the digestory tract and annexes glands were fully differentiated and functional. Taking in consideration the feeding habit and your peculiarities, the morphofunctional knowledge of the digestory tract becomes necessary for establish diets that meet the requirements of this species, looking for improvement in the productive performance and health of the animals. Regarding the gonads, fish with up to 3 days post-hatching (dph) was not visualized gonadal traces, however, with 4 dph undifferentiated gonads arose and were located within the coelomic cavity. At 13 dph were observed an increase in the amount of gônias filling the gonad. With 76 dph, the oocytes in primary growth or pre-vitellogenic presented a few granules of vitellogenin in their cytoplasm and the follicular cells initiated the formation of the teak. Oocytes in the ovaries with primary growth, cortical alveoli and central nuclei with nucleoli perinucleolares were visualized at 111 dph. When the females reached 118 dph, the ovaries were composed predominantly of secondary growth oocytes or vitellogenic ones. The germinal vesicle moved from the center towards the periphery and had no sharp edges. Lipid droplets could be located in the innermost region of the cytoplasm. The cortical alveoli arranged in several layers were located at the periphery of the oocytes. In some oocytes secondary growth was noted recesses in the zona radiata. Females, when appropriately feed and managed, can breed with four months of age. The information from this study are important and will contribute to the improvement of the hatchery, breeding and rearing of captive *Betta splendens*.

**Keywords:** ontogeny, ornamental fish, development, ovary.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A produção de peixes ornamentais é uma modalidade da aquicultura em plena expansão nas últimas décadas (CHAPMAN *et al.*, 1997). O Brasil, além de apresentar grande potencial hídrico e climático, também possui uma ampla biodiversidade de organismos aquáticos (LUZ e ZANIBONI-FILHO 2001).

A piscicultura no Brasil tem se desenvolvido, fundamentalmente, com espécies exóticas (MIRANDA e RIBEIRO, 1997). Entre as espécies ornamentais mais cultivadas, destaca-se o *Betta splendens*, atualmente considerado um dos mais importantes peixes ornamentais do mundo, muito vendido apresentando grande popularidade (CHAPMAN *et al.*, 1997; LIMA, 2003), com diversidade de cores (MAURUS, 1987 *apud* GIANNECCHINI, 2010) e nadadeiras largas e compridas (DAMAZIO, 1992).

O setor produtivo de peixes ornamentais depende da intensificação dos sistemas de produção e da geração de tecnologias adequadas para que ocorra a expansão deste setor e conseqüentemente, o suprimento dos mercados interno e externo (ZUANON *et al.*, 2006). Segundo Ribeiro e Fernandes (2008), as tecnologias utilizadas para a produção de peixes ornamentais são muitas vezes similares às usadas na piscicultura convencional.

Durante a larvicultura, a sobrevivência das larvas depende da quantidade de suprimento alimentar endógeno e de disponibilidade de alimento adequado à primeira alimentação. Além disso, as prováveis mudanças ontogênicas refletem em alterações morfológicas e maturacionais, tais como alteração no tamanho e posição da boca, melhora da locomoção e habilidades sensoriais dentre outras (WOOTTON, 1998). De acordo com Beerli *et al.* (2004) muitos problemas precisam ainda ser resolvidos, principalmente com relação à larvicultura de peixes, que representa um forte ponto de estrangulamento na produção de grandes quantidades de alevinos.

Segundo Mangetti (2006), para o sucesso da criação racional de uma espécie de peixe é essencial o conhecimento de seus hábitos alimentares e das características morfológicas do trato digestório, em especial durante seu desenvolvimento inicial. Pois, Seixas-Filho *et al.*, (2001) afirmaram que as características anatômicas do sistema digestório dos peixes se encontram em estreita dependência com a natureza dos alimentos, as características do habitat, o estado nutricional e o desenvolvimento do indivíduo, sendo manifestadas especialmente neste sistema, através de adaptações e modificações. As mudanças estruturais do canal alimentar que ocorrem ao longo do desenvolvimento caracterizam diferentes adaptações funcionais (GOVONI *et al.*,1986). Durante o desenvolvimento larval, ocorrem mudanças nos processos de digestão, absorção e assimilação de compostos químicos (DABROWSKI, 1984).

Cestarolli (2005) afirmou que o período larval é um dos mais delicados e importantes, e de seu êxito dependem as fases subsequentes. Para esse período, um protocolo alimentar desempenha um papel essencial para se determinar características do alimento e da alimentação, bem como, estabelecer condições ambientais adequadas. A alimentação natural<sup>1</sup> é de fundamental importância no desenvolvimento dos peixes, principalmente nos estádios iniciais. Uma alimentação inadequada provoca elevadas taxas de mortalidade e redução nos parâmetros de desenvolvimento (NASCIMENTO, 1989; HUNG, 1989). No cultivo de reprodutores, a alimentação interfere diretamente na maturação gonadal e qualidade dos gametas (SANTOS *et al.*, 2009).

---

<sup>1</sup> - Artêmia é um microcrustáceo pertencente à classe Anostraca, este organismos é muito utilizado na alimentação de espécies aquáticas, sendo considerado como excelente alimento vivo e de fácil produção. Entretanto, o alto custo e as dificuldades de obtenção de cistos limitam o seu uso.

O estudo da ontogenia é útil como ferramenta para a descrição e conhecimento do início do desenvolvimento de diversas espécies, podendo contribuir para o desenvolvimento comercial em cativeiro de novos estoques e avaliação daqueles já explorados (SANTIN *et al.*, 2004).

Além das características do trato digestório, o conhecimento reprodutivo é essencial para obtenção de animais aptos à reprodução, determinando o período para a realização do cruzamento intuindo a aquisição de desovas ou novas desovas.

A reprodução de peixes é controlada por processos fisiológicos que sintetizam e liberam hormônios (eixo hipotálamo-hipófise-gônadas), sendo modulados por fatores ambientais como, temperatura da água, fotoperíodo, chuvas e outros, os quais têm um papel fundamental, mas ainda pouco elucidado nos processos de desenvolvimento gonadal, maturação final, liberação e fertilização de ovócitos (BILLARD *et al.*, 1990; BROOKS *et al.*, 1997; SCHULZ *et al.*, 2001; WELTZIEN *et al.*, 2004; AGUILLEIRO *et al.*, 2006; BOBE e LABBÉ, 2010).

As condições de cultivo afetam fortemente o desenvolvimento gonadal, principalmente durante a fase de vitelogênese, de modo que, uma limitação na qualidade ou quantidade do alimento, densidade de estocagem excessiva e o estresse, podem induzir a reabsorção de ovócitos vitelogênicos, resultando num menor número de ovócitos maduros, ou ainda, podem atuar numa fase anterior, impedindo o início da vitelogênese (HARVEY e CAROLSFELD, 1993), impossibilitando a ocorrência de desovas.

Na maioria das vezes, os peixes para reproduzirem-se enfrentam outros competidores da mesma espécie (conspecíficos) ou de espécies diferentes (heterospecíficos) e usam a agressão como meio para suplantar seus oponentes. Entre os peixes, a agressividade e territorialidade são manifestadas principalmente na época da

reprodução. Os machos, durante esta fase, são em geral mais agressivos do que as fêmeas e no início da estação de procriação estabelecem e defendem uma área territorial contra outros machos, resultando em encontros agonísticos (HUNTINGFORD, 1979).

Santos *et al.* (2009) verificaram o tempo de rematuração em fêmeas de *Betta splendens* quando submetidas a dietas com diferentes níveis proteicos, porém ainda não se conhece a maturação gonadal nesta espécie. Apesar das inúmeras publicações sobre a criação desta espécie, as informações científicas sobre a sua biologia reprodutiva são escassas (SANTOS *et al.*, 2009), assim como pesquisas acerca do desenvolvimento do trato digestório.

Diante destas considerações e sabendo-se que para o sucesso na obtenção de peixes com âmbito comercial é necessário o conhecimento da biologia da espécie, este estudo teve como objetivo acompanhar e registrar a ontogenia do trato digestório e o desenvolvimento gonadal de *Betta splendens* durante seu desenvolvimento.

Para elucidar os resultados, a dissertação foi dividida em dois artigos:

Artigo 1: Ontogenia do trato digestório de *Betta splendens*

Artigo 2: Desenvolvimento gonadal de *Betta splendens*: aspectos morfológicos.

### **1.1 Espécie em estudo**

Dentre as espécies ornamentais cultivadas no Brasil, destaca-se o *Betta splendens*, conhecido popularmente como “beta” ou “peixe de briga” e nos EUA como *Siamese Fighting Fish* por apresentar agressividade contra machos da mesma espécie. É um peixe originário da bacia do rio Mekong, na península Malaia (China, Mianmar, Laos, Camboja, Vietnã e Tailândia), no Sudeste Asiático. O nome *Betta* teve origem numa tribo guerreira chamada "Ikan Bettah" nativa do Sião (FARIA *et al.*, 2006) e o *splendens* tem sua origem do latim, *splendore*. Sião era o nome do país até meados de 1949, quando então nos dias atuais passou a se chamar Tailândia.

O “beta” pertence à Família Osphronemidae da Ordem Perciformes e à Subordem Anabantoidei, como descrito na **Tabela 1**.

**Tabela 1:** Classificação zoológica de *Betta splendens*.

---

<b>Reino:</b>	Animalia
<b>Filo:</b>	Chordata
<b>Subfilo:</b>	Vertebrata
<b>Superclasse:</b>	Osteichthyes
<b>Classe:</b>	Actinopterygii
<b>Subclasse:</b>	Neopterygii
<b>Infraclasse:</b>	Teleostei
<b>Superordem:</b>	Acanthopterygii
<b>Ordem:</b>	Perciformes
<b>Subordem:</b>	Anabantoidei
<b>Família:</b>	Osphronemidae
<b>Gênero:</b>	<i>Betta</i>
<b>Espécie:</b>	<i>Betta splendens</i>

---



**Figura 1:** Exemplos adultos de *Betta splendens*. A: Fêmea; B, C e D: Machos.



Em seus locais de origem esta espécie pode ser encontrada em campos de arroz ou pequenos lagos ou poças d'água. Para sobreviver sob condições de baixo teor de oxigênio dissolvido, esta espécie apresenta um órgão suprabranquial que está localizado dorsalmente, chamado labirinto, esta estrutura auxilia na respiração, pois possibilita a captura do oxigênio atmosférico. Quando o peixe sorve o ar pela boca, este é conduzido diretamente até o labirinto onde é comprimido e introduzido na corrente sanguínea do animal. Posteriormente como efeito da respiração, uma bolha é expulsa com gases resultantes do metabolismo (NELSON, 2006; REID *et al.*, 2005). A respiração aérea acessória permite sua manutenção em pequenos aquários sem aeração (beteiras) (ZUANON *et al.*, 2009).

São animais carnívoros que se alimentam de mosquitos, zooplâncton e larvas de outros insetos (RAINBOTH, 1996). Apresentam corpo fusiforme, nadadeira caudal longa, larga e arredondada, nadadeira dorsal estreita e alta e as anais estreitas e pontiagudas, dependendo da linhagem (MAURUS, 1987). Segundo este mesmo autor, as fêmeas são menores, apresentam cores menos vibrantes e nadadeiras menos desenvolvidas, caracterizando o dimorfismo sexual. Esta espécie é ovípara, sendo o cuidado parental feito pelo macho (DAMAZIO, 1992).

Fêmeas e machos se desenvolvem juntos até o período entre 45 a 150 dias, quando ocorre a separação dos machos, ao atingirem aproximadamente 4 cm de comprimento. Mesmo adultas, as fêmeas convivem pacificamente em altas densidades (DAMAZIO, 1992; WOLFSHEIMER, 2003). Os machos são geralmente muito agressivos com outros machos da mesma espécie, sendo muito comuns episódios de lutas para proteger seu território e as fêmeas (BRONSTEIN, 1984; BRONSTEIN e ATHERTON, 1985; MUNN, 2007).

O macho constrói ninho de bolhas quando apto à reprodução, estes ninhos são localizados na superfície da água, muitas vezes sob abrigo. O macho carrega os ovos para o ninho cuidadosamente em sua boca (MUNN, 2007) exercendo cuidado parental.

O *B. splendens* tem sido muito cultivado no Brasil e no mundo. No Brasil, a criação desta espécie tem se expandido na região da Zona da Mata Mineira, nos estados do Nordeste, entre outras regiões do país, representando significativa fonte de renda para os piscicultores (ZUANON *et al.*, 2009). Esta espécie também é utilizada como controle biológico de certas espécies de mosquito. Pamplona *et al.*, (2004) demonstraram a capacidade do *Betta splendens* como agente de controle biológico para formas imaturas de *Aedes aegypti*, em tanques de alvenaria no Ceará.

### **1.2 Morfologia do trato digestório**

Entre as alterações morfológicas que mais influenciam na sobrevivência e crescimento dos peixes durante o início do ciclo de vida, está a formação do trato digestório, que passa por profundas mudanças em sua estrutura e função, determinando alterações no hábito alimentar e no processo de digestão e assimilação de nutrientes (NEUMANN, 2008). Segundo Mangetti (2006), para o sucesso da criação racional de uma espécie de peixe é essencial o conhecimento de seus hábitos alimentares e das características morfológicas do trato digestório.

Bértin (1958), baseado nos aspectos embriológicos, dividiu o trato digestório em quatro subdivisões, sendo: 1-) intestino cefálico, que corresponde à cavidade oral e faringe; 2-) intestino anterior, que corresponde ao esôfago e estômago até o orifício hepatopancreático ou até o esfíncter pilórico; 3-) intestino médio, que é o intestino propriamente dito, cujo limite posterior é marcado pela válvula ileorretal ou por glândulas retais e o 4-) intestino posterior que inclui o reto e o ânus.

Segundo Zavala-Camin (1996), o trato digestório em peixes está constituído por boca, cavidade bucofaríngea, esôfago, estômago e intestino. A boca corresponde à abertura anterior da cavidade bucofaríngea, incluindo os lábios. Bértin (1958) e Godinho (1970) asseguram que a cavidade bucofaríngea, região compartilhada pelos sistemas respiratório e digestório, é limitada anteriormente pelo orifício bucal (lábios) e posteriormente pelo último par de arcos branquiais, sendo inteiramente contínua na cabeça, aderindo-se à parede interna desta e constituída apenas por uma túnica mucosa, podendo ser chamada também de intestino cefálico. Esta região desempenha um importante papel na apreensão dos alimentos.

Os lábios são pregas do tegumento, separados das gengivas por um sulco labial (GODINHO, 1970), podendo ser delgados, espessos ou ausentes dependendo do hábito alimentar. Nos peixes carnívoros os lábios são geralmente finos e com poucas modificações (ROTTA, 2003), eles auxiliam na captura do alimento.

O esôfago nos teleósteos apresenta-se como um tubo curto, estreito e retilíneo, porém com grande elasticidade, adaptado aos vários regimes alimentares e que conecta a cavidade bucofaríngea ao estômago (BÉRTIN, 1958; GODINHO, 1970). Godinho (1970) relatou que o limite entre esôfago e estômago (quando este existe) é indicado, histologicamente pela mudança do epitélio estratificado a colunar simples e pelo aparecimento de glândulas gástricas. Quanto ao esôfago, segundo Zavala-Camin (1996), nos peixes geralmente ele é um órgão tubular que serve de passagem entre a cavidade bucofaríngea e o estômago. E segundo este mesmo autor, as espécies fisóstomas apresentam um ducto pneumático que conecta a vesícula gasosa (ou bexiga natatória) e o esôfago, (do grego, *physa* = bexiga, *stoma* = boca), sendo capazes de inflá-la respirando ar da superfície.

O estômago na maioria dos peixes é uma dilatação onde os alimentos são mantidos o tempo necessário para realizar a digestão ácida, com a sua mucosa interna formando sulcos longitudinais e sinuosos que desaparecem quando o órgão está cheio, podendo este segmento ser reto, ou ter forma de “U” ou “Y”, estando ausente em algumas espécies, dependendo do hábito alimentar desta (ZAVALA-CAMIN, 1996). Rotta (2003) referiu que, histologicamente, o estômago pode ser dividido em três regiões: cárdica ou região de transição; fúndica com inúmeras glândulas gástricas e pilórica, região aglandular, possuindo, porém uma forte musculatura.

Alguns peixes portadores de estômago bem desenvolvido podem possuir cecos pilóricos em seu intestino, que são formações tubulares com fundo cego e abertura geralmente situada na região pilórica do intestino, com estrutura histológica semelhante ao órgão de origem e provável função de aumentar o pH do bolo alimentar para torná-lo alcalino e acelerar sua assimilação (ZAVALA-CAMIN, 1996). Entretanto, não está bem definido se há relação entre a presença de cecos pilóricos e a dieta do peixe, pois eles ocorrem nos peixes carnívoros, onívoros e herbívoros. Nas espécies com pouco ou nenhum ceco ocorre maior desenvolvimento da mucosa e/ou maior comprimento do intestino médio para compensar a escassez ou ausência dessas estruturas (ROTTA, 2003).

O intestino em peixes é um órgão geralmente tubular por onde transita o alimento e no qual ocorre a digestão alcalina e a absorção de nutrientes, podendo apresentar formas variadas, como tubular, de válvula em espiral, de anéis sobrepostos e de lâmina enrolada, com pregas na mucosa com função de ampliar a superfície de absorção. No final do intestino diferencia-se o reto, que pode estar separado por uma válvula e é facilmente reconhecido por ter camada muscular espessa próxima ao ânus (ZAVALA-CAMIN, 1996).

A parede do intestino contém uma túnica mucosa, uma submucosa, uma muscular e uma serosa. A mucosa do intestino médio é revestida por epitélio prismático simples ciliado ou não, com ou sem células caliciformes. O intestino posterior que compreende reto e ânus, apresentando um revestimento composto por epitélio estratificado (BÉRTIN, 1958).

O trato digestório em peixes apresenta glândulas anexas, que são representadas pelo fígado, vesícula biliar (quando presente) e pâncreas. O trato digestório e as glândulas anexas, fígado e pâncreas, originam-se das células do endoderma durante a embriogênese (OBER *et al.*, 2003). Alguns estudos mostraram que estas glândulas diferenciam-se precocemente nas larvas, apresentando-se funcionais antes da absorção total do vitelo (HAMLIN *et al.*, 2000; PEÑA *et al.*, 2003).

Nos peixes, o fígado de tem funções similares às de mamíferos. Funções estas, que incluem assimilação de nutrientes, produção de bile, desintoxicação, manutenção da homeostase metabólica do organismo que incluem o metabolismo de carboidratos, proteínas, lipídios e vitaminas. O fígado também desempenha um papel-chave na síntese de proteínas plasmáticas, tais como, a albumina, fibrinogênio e fatores de coagulação. Histologicamente este órgão apresenta células poliédricas com núcleos arredondados (GENTEN *et al.*, 2009).

A vesícula biliar é um saco contrátil com parede delgada, cuja função é de armazenamento temporário da bile, a qual é coletada pelos ductos biliares vindos do fígado (ROTTA, 2003), podendo ser esférica, oval ou alongada (GODINHO, 1970).

O pâncreas é uma glândula mista, com funções endócrinas e exócrinas, variando amplamente quanto ao desenvolvimento e localização anatômica, nos diferentes grupos de peixes (DIAZ *et al.*, 1999). Segundo Gonzáles *et al.*, (2002), a porção endócrina é

representada pelas ilhotas de Langerhans, e em razão da presença dessas ilhotas pode-se inferir que estas larvas possuem capacidade de assimilar os açúcares eficientemente.

Além disso, células de tecido pancreático também podem ser encontradas dispersas no tecido hepático dos teleósteos. Este tecido pode ser diferenciado do tecido hepático por apresentar arranjo acinar e também pelo septo de tecido conjuntivo separando-o dos hepatócitos, sendo chamado de pâncreas intrahepático (BRUSLÉ e ANADON, 1996).

Durante o desenvolvimento larval, a presença dos órgãos sensoriais é importante para a procura de alimento e fuga de predadores (MOORMAN, 2001). Sendo imprescindíveis para que a transição alimentar ocorra com sucesso. Estruturas, tais como botões gustativos e neuromastos, são peças chave nesse processo e são indispensáveis para percepção de estímulos e/ou partículas e a orientação nas fases iniciais de desenvolvimento.

O botão gustativo é constituído por células receptoras, células conectivas localizadas entre as células receptoras, células marginais e células basais (FINGER *et al.*, 1990; REUTTER e WITT, 1993; KOTRSCHAL *et al.*, 1998). Sendo responsável pela percepção de sabor (CINAR e SENOL, 2005). Em peixes, o padrão de distribuição dos botões gustativos varia entre as espécies, podendo ser encontrados na cavidade bucofaríngea, na boca e dispersos por todo o corpo (MATSUOKA, 2001; HANSEN *et al.*, 2002).

Já os neuromastos são formados por células mecanoreceptoras ciliadas ligadas ao sistema mecanossensorial dos peixes teleósteos, sendo responsáveis pela percepção de estímulos externos vibratórios e gravitacionais (BLAXTER, 1986; NOAKES E GODIN, 1988). Para isso, essas células são inervadas por neurônios que compõem uma série de nervos da linha lateral (CESTAROLLI, 2005). Podem ser encontrados distribuídos

livremente no epitélio, associados à linha lateral, ou, em alguns casos, formando linhas de neuromastos livres na cabeça, inclusive constituindo parte de canais sensoriais craniais (LIEM *et al.*, 2001).

### 1.3 Desenvolvimento das gônadas

Um dos fatores que garante o sucesso reprodutivo dos animais sexualmente adultos de qualquer espécie é o desenvolvimento normal das gônadas (DEVLIN e NAGAHAMA, 2002).

Em peixes, as células germinativas primordiais (CGPs) são formadas fora do local de desenvolvimento das gônadas e, posteriormente, migram para colonizar as cristas genitais (HOAR, 1969; PATIÑO e TAKASHIMA, 1995).

As células germinativas são envoltas por um epitélio germinativo. Dentro do epitélio germinativo, ovogônias dividem-se por mitose para manter população (os ninhos). Algumas delas iniciam meiose, tornando-se ovócitos, dando início ao processo de foliculogênese. Uma ovogônia é caracterizada por ter um núcleo ovóide com cromatina finamente granular e um único nucléolo (GRIER, 2000). Os ninhos consistem em células germinativas que arranjam-se em forma de cistos (GRIER *et al.*, 2009a).

Em teleósteos, como em outros vertebrados, células germinativas interagem com células somáticas durante a diferenciação gonadal (NAKAMURA *et al.*, 1998). Segundo Meijide *et al.*, (2005) a diferenciação gonadal é determinada pela transição de ovogônia em ovócito ou espermatogônia em espermatócito que se caracteriza pela mudança distinta principalmente no núcleo da célula.

De forma semelhante aos testículos, os ovários, em teleósteos, são de forma geral, pares, alongados, com peso, forma, volume e coloração variando durante o ciclo reprodutivo. Microscopicamente, os ovários são envolvidos por uma camada de tecido conjuntivo denso, a túnica albugínea. Deste tecido surgem projeções para o interior do

órgão, formando as lamelas ovígeras que sustentam as células germinativas em suas diferentes fases de desenvolvimento (ZAIDEN, 2000).

Ovários de teleósteos podem ser de dois tipos baseando-se em características anatômicas, o tipo cistovariano, no qual o lume ovariano tem continuidade com o oviduto, através do qual os ovócitos alcançam o meio externo, e do tipo gimnovariano, no qual o oviduto está ausente, de modo que os ovócitos são liberados diretamente na cavidade celômica para depois alcançar o meio externo (HOAR, 1969).

No ovário ocorre a ovogênese, que é marcada por eventos sequenciais de diferenciação e maturação dos folículos ovarianos, iniciando-se com a diferenciação das células germinativas primordiais (CGPs) em ovogônias. Estas entram em meiose originando os ovócitos que passarão pelas fases pré-vitelogênica (crescimento primário) e vitelogênica (crescimento secundário), finalizando-se com a maturação final ovocitária que culmina com a ovulação (SELMAN e WALLACE, 1989; TYLER e SUMPTER, 1996; PATIÑO e SULLIVAN, 2002).

Ocorrem divergências de nomenclatura para a classificação das células germinativas (ZAIDEN, 2000). Entretanto, neste trabalho designou-se ovócito em crescimento primário os que se apresentavam nas seguintes fases de desenvolvimento: com nucléolo único (ovogônia) e nucléolos múltiplos e perinucleolares; os ovócitos em crescimento secundário foram categorizados na fase de alvéolo cortical (WALLACE e SELMAN, 1981; MATSUYAMA *et al.* 1990; ABASCAL e MEDINA, 2005; LUCKENBACH *et al.*, 2008).

Durante o crescimento folicular, ocorre a formação de uma camada acelular denominada de zona radiata ou zona pelúcida, que consiste na deposição de matriz



extracelular entre o ovócito e as células foliculares. Na maioria dos peixes, a zona radiata é formada por duas camadas atravessadas por poros-canais (GURAYA, 1996).

Em teleósteos, a zona radiata apresenta uma área especializada, a micrópila, que permite a entrada do espermatozóide durante a fertilização (REDDING e PATIÑO, 1993). Os espermatozoides 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). Ganeco e Nakaghi (2003) caracterizaram a micrópila no ovócito de *Brycon orbignyanus* como uma depressão na zona radiata.

As vesículas corticais ou alvéolos corticais são estruturas citoplasmáticas que surgem no ooplasma periférico durante o desenvolvimento dos ovócitos e contêm glicoproteínas que são liberadas no espaço perivitelínico no momento da fertilização, constituindo um bloqueio à poliespermia (HART, 1990).

A vitelogênese consiste no acúmulo de vitelogenina, que é produzida no fígado, no citoplasma do ovócito sob a forma de grânulos de vitelo. Ao final do processo de vitelogênese, o ovócito atinge seu desenvolvimento máximo e, dependendo de condições ambientais adequadas e sob a ação de apropriado mecanismo hormonal gonadotrópico, o ovócito entra na etapa de maturação. A maturação ovocitária é um fenômeno que se desenvolve em curto tempo e que termina na ovulação (GODINHO, 2007).

O termo ovulação refere-se à expulsão do ovócito maduro do folículo (REDDING e PATIÑO, 1993). O folículo vazio caracteriza-se pela saída do ovócito, permanecendo no local somente as células da teca (VAZZOLER, 1996). Porém, nem todos os ovócitos que iniciam o desenvolvimento serão liberados. Estes ovócitos podem sofrer o processo de atresia, o qual consiste na paralização do desenvolvimento folicular seguido de sua

degeneração. Este processo ocorre, geralmente, em folículos ovarianos desenvolvidos. (FÁVARO e CHAVES, 1999). O processo da atresia é altamente regulado e essencial para manutenção da homeostase ovariana que acontece no final do ciclo reprodutivo (KRYSKO *et al.*, 2008).

A comunicação dos ovários com o meio externo ocorre através do gonoducto que se abre no poro ou papila urogenital. O gonoducto é uma estrutura única presente em espécies que apresentam dois ovários ou uma fusão parcial dos mesmos (MENDOZA, 1943; TURNER, 1947; AMOROSO, 1981).

## 2. REFERÊNCIAS

- ABASCAL, F.J.; MEDINA, A. Ultrastructure of oogenesis in the bluefin tuna, *Thunnus thynnus*. *Journal of Morphology*, v. 264, p.149–160, 2005.
- AGUILLEIRO, B.; GARCIA-HERNÁNDEZ, M.P.; GARCÍA-AYALA, A. *Teleost adenohypophysis: morphofunctional and developmental aspects*. 287-323. In: Reinecke, M, Zaccone G, Kappor BG. *Fish Endocrinology*. Science Publishers, v .1, p. 440, 2006.
- AMOROSO, E.C. Viviparity. P.3-24. In: S.R. Glasser and D.W. Bullock (eds.). *Cellular and molecular aspects of implantation*, Plenum Press, New York, USA, 1981.
- BEERLI, E.L.; LOGATO, P.V.R.; FREITAS, R.T.F. Alimentação e comportamento de larvas de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). *Ciência Agrotécnica*, Lavras, v.28, p.149-155, 2004.
- BÉRTIN, L. Appareil digestif. In: GRASSÉ, P. P. (Ed.) *Traité de zoologie, anatomie, systématique, biologie*. Paris: Masson, v. 13, p. 1249-1301, 1958.
- BILLARD, R.; LE GAC, F.; LOIR, M. Hormonal control of sperm production in teleost fish. *Progress in Clinical and Biological Research*, v. 342, p. 329-35, 1990.
- BLAXTER, J.H.S. Development of sense organs and behavior of teleost larvae with special reference to feeding and predator avoidance. *Transactions of the American Fisheries Society* 115, p. 98-114, 1986.
- BOBE J.; LABBÉ C. Egg and sperm quality in fish. *General and Comparative Endocrinology*, v.165, p. 535 – 548, 2010.
- BRONSTEIN, P.M. Agonistic and reproductive interactions in *Betta splendens*. *Journal of Comparative Psychology*, v.98, n.4, p.421-431, 1984.
- BRONSTEIN, P.M. e ATHERTON, L. Jr. Aggressive and sexual interactions in Siamese fighting fish *Betta splendens*. *Aggressive Behavior*, v.22, n. 5, p.431-435. 1985.
- BROOKS, S.; TYLER C.R.; SUMPTER J. Egg quality in fish: what makes a good egg? *Reviews in fish biology and fisheries*, v.7, p.387-416, 1997.
- BRUSLÉ, J.; ANADON, G. G. *The structure and function of fish liver*. In: Munshi, J. S.D.; Dutta, H. M. (Ed.). *Fish Morphology horizon of new research*. Lebanon:Science Publishers Inc., p. 77 – 93, 1996.
- CESTAROLLI, M. A. *Larvicultura de pintado Pseudoplatystoma coruscans (Agassiz, 1829): aspectos da alimentação inicial e do desenvolvimento de estruturas sensoriais*. Tese (Doutorado em Aquicultura). Universidade Estadual Paulista – UNESP: Jaboticabal, p. 110, 2005.

CHAPMAN, F.A.; FITZ-COY, S.A.; THUNBERG, E.M.; ADAMS, C.M. United States of America trade in ornamental fish. *Journal of the World Aquaculture Society*, v.28, n.1, p.1-10, 1997.

CINAR, K. e SENOL, N. The distribution of external taste buds in flower fish (*Pseudophoxinus antalyae*). *Anatomia Histologia Embryologia*, v. 34, n. 3, p. 176-178, 2005.

DABROWSKI, K. The feeding of fish larvae: present “state of the art” and perspectives. *Reproduction Nutrition Development*. Paris, v. 24, n. 6, p. 808-833, 1984.

DAMAZIO, A. *Criando o Betta*. 2 ed. Rio de Janeiro: Inter-Revistas, p. 80, 1992.

DEVLIN, R.H., NAGAHAMA, Y. Sex determination and sex differentiation in fish: 1128 an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, v. 208, p.191–364, 2002.

DÍAZ, A.O.; GONZÁLEZ CASTRO, M.; DEVINCENTI, C.V.; GOLDEMBERG, A. L. Morphological and histochemical characterisation of liver from stripped weakfish, *Cynoscion guatucupa*. *Biociências*, Porto Alegre, v. 7, n. 1, p. 67-78, 1999.

FARIA, P. M. C.; CREPALDI, D. V.; TEIXEIRA, E. A.; RIBEIRO, L. P.; SOUZA, A. B.; CARVALHO, D. C.; MELO, D. C.; SALIBA, E. O. S. Criação, manejo e reprodução do peixe *Betta splendens*. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.30, p. 134-149, 2006.

FÁVARO, L.F.; CHAVES, P.T.C. Aspectos morfológicos e citoquímicos da ovogênese de *Hypostomus cf. tietensis* (Loricariidae) do Lago Igapó (Londrina, PR, Brasil). *Acta Biológica Paranaense*, Curitiba, v.28 (1, 2, 3 e 4), p. 125-139, 1999.

FINGER, T. E.; WOMBLE, M.; KINNAMON, J. C.; UEDA, T. Synapsin I-like Immunoreactivity in nerve fibers associated with lingual taste buds of the rat. *Journal of Comparative Neurology*, v. 292, p. 283 - 290, 1990.

GANECO, L.N.; NAKAGHI, L.S.O. Morfologia da micrópila e da superfície dos ovócitos de piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Osteichthyes, Characidae), sob microscopia eletrônica de varredura. *Acta Scientiarum: Biological Sciences*. Maringá, v. 25, n. 1, p. 227-231, 2003.

GENTEN, F.; TERWINGHE, E.; DANGUY, A. *Atlas of fish histology*. Science Publishers, cap. 3, p. 75-91, 2009.

GIANNECCHINI, L.G. *Fotoperíodo na reprodução de Betta splendens*. Dissertação (Mestrado em aquicultura) Centro de aquicultura da UNESP (CAUNESP), Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal – São Paulo, p.35, 2010.

GODINHO, H.M. Considerações gerais sobre anatomia de peixes, p. 118 – 122. In: *Poluição e piscicultura*. São Paulo, Faculdade de Saúde Pública e Instituto de Pesca, CPRN – Secretaria da Agricultura, p.216, 1970.

GODINHO, H.P. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.31, n.3, p.351-360, 2007.

GONZÁLES, O. R. M.; FLORES, J. DEL C. B.; DOMINGUEZ, B. M. P.; VALLE, M. R. G. Descripción histológica del sistema digestivo em larvas de *Chirostoma humboldtianum* em La primeira alimentación exógena. In: CIVA, P. 313-332, 2002.

GOVONI, J.J.; BOEHLERT, G.W.; WATANABE, T. The physiology of digestion in fish larvae. *Environmental Biology of Fishes*, Dordrecht, v.16, n.1-3, p.59-77, 1986.

GRIER, H.J. Ovarian germinal epithelium and folliculogenesis in the Common Snook, *Centropomus undecimalis* (Teleostei: Centropomidae). *Journal of Morphology*, v. 243, p.265-281, 2000.

GRIER, H.J.; URIBE-ARANZÁBAL, M.C.; PATIÑO, R. The ovary, folliculogenesis and oogenesis in teleosts. In: Jamieson, B.G.M. (Ed): *Reproductive Biology and Phylogeny of Fishes (Agnathans and Bony Fishes) Phylogeny Reproductive System Viviparity Spermatozoa*, v. 8A of series: Reproductive Biology and Phylogeny, p. 788, 2009a.

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.

HAMLIN, H.J.; HUNT VON HERBING, I. and KLING, L.J. Histological and morphological evaluations of the digestive tract and associated organs of haddock throughout post-hatching ontogeny. *Journal of Fish Biology*, v. 57, p. 716-732, 2000.

HANSEN, A.; REUTTER, K. e ZEISKE, E. Taste bud development in the zebrafish, *Danio rerio*. *Developmental Dynamics*, v. 223, n. 4, p. 483-496, 2002.

HART, N.H. Fertilization in teleosts fishes: mechanisms of sperm-egg interações. *International Review of Cytology*, v.121, p.1-66, 1990.

HARVEY, B.; CAROLSFELD, J. *Induced breeding in tropical fish culture*. Ottawa: IDRC, p.144, 1993.

HOAR, W.S. Reproduction. In: HOAR, W.S.; RANDALL, D.J. (Eds.). *Fish physiology*. London: Academic Press, v.3, p.1-72, 1969.

HUNG, M. Ensayo de cultivo de una cepa de rotífero *Brachionus plicatilis* aislada en Venezuela. *Revista Latino-americana de Acuicultura*, v. 40, p. 83-112, 1989.

HUNTINGFORD, F.A. Pre breeding aggression in male and female three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*) Aggres. Behavior Cambridge, v. 5, p. 51-54, 1979.

KOTRSCHAL, K.; ROYER, S; KINNAMON, J. C. High-voltage electron microscopy and 3-D reconstruction of solitary chemosensory cells in the anterior dorsal fin of the gadid fish *Ciliata mustela* (Teleostei). *Journal of Structural Biology*. v. 124, p.59-69, 1998.

LIEM, K. F., BEMIS, W. E., WALKER, JR. W.F., GRANDE, L. *Functional anatomy of vertebrates*. An evolutionary perspective. 3 ed. Thomson Belmont, p.703, 2001.

LIMA, A.O. Aquicultura ornamental: O potencial de mercado para algumas espécies ornamentais: Formas alternativas de diversificação da produção na aquicultura brasileira. *Revista Panorama da Aquicultura*, v. 13, p. 23-29, 2003.

LUCKENBACH, J.A.; ILIEV, D.B.; GOETZ, F.W.; SWANSON, P. Identification of differentially expressed ovarian genes during primary and early secondary oocyte growth in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Reproductive Biology and Endocrinology* [online serial] v.6, p.2, 2008.

LUZ, R. K.; ZANIBONI-FILHO, E. Utilização de diferentes dietas na primeira alimentação do mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*, Lacépède). *Acta Scientiarum*, v.23, n. 2, p. 483-489, 2001.

MANGETTI, A.J. *Desenvolvimento histomorfológico do trato digestório de larvas de pintado Pseudoplatystoma coruscans Agassiz, 1829*. Dissertação (Mestrado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo – USP: São Paulo, p. 94, 2006.

MATSUOKA, M. Development of sense organs in the Japanese sardine *Sardinops melanostictus*. *Fisheries Science*, v.67, p.1036-1045, 2001.

MATSUYAMA, M.; HANAKI Y.; MATSUURA, S. Effects of steroids on germinal vesicle breakdown in vitro of intact follicles in the Japanese whiting, *Sillago japonica*, a marine teleost. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 96A, p.257–261, 1990.

MAURUS, W. *Bettas a complete introduction*. *New jersey-USA: t.f.h.*, p. 128, 1987.

MEIJIDE, F.J.; LO NOSTRO, F.; GUERRERO, G.A. Gonadal Development and Sex Differentiation in the Cichlid Fish *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes): A Light and Electron-Microscopic Study. *Journal of Morphology*, v.264, p. 191-210, 2005.

MENDOZA, G. The reproductive cycle of the viviparous teleosts *Neotoca bilineata*, a member of the family Goodeidae. IV. The germinal tissue. *Biol. Bull*, v.84, p.87–97, 1943.

MIRANDA, M.O.T.; RIBEIRO, L.P. *Características zootécnicas do surubim Pseudoplatystoma corruscans*. In: MIRANDA, M.O.T. (Ed.). *Surubim*. Belo Horizonte: IBAMA, cap. 3, p. 43-56, 1997.

MOORMAN, S. J. Development of sensory system in zebrafish (*Danio rerio*). *Institute for Laboratory Animal Research Journal*, v. 42, n. 4, p.292-298, 2001.

MUNN, S. *Aggression in male betta fish*. *EzineArticles* (March, 26), <http://ezinearticles.com/?Aggression-in-Male-Betta-Fish&id=503495> (visitada em 5 de dezembro de 2012), 2007.

NAKAMURA, M.; KOBAYASHI, T.; CHANG, X.T.; NAGAHAMA, Y. Gonadal sex differentiation in teleost fish. *J. Exp. Zool.*, v. 281: 362-372, 1998.

NASCIMENTO, V.M.C. Curvas de crescimento de *Moina micrura* Kurs, 1974 e *Ceriodaphnia silvestris* criadas em laboratório. *Boletim Técnico CEPTA*, 2 (único) p.53-59, 1989.

NELSON, J.S. *Fishes of the world*. 4<sup>th</sup> ed. Canada: John Wiley e Sons, Inc., p.601, 2006.

NEUMANN, E. Desenvolvimento inicial da jatuarana, *Brycon amazonicus* (Teleostei, Characidae). Tese (Doutorado em Aquicultura). Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista – UNESP: Jaboticabal, p.125, 2008.

NOAKES, D. L. G.; GODIN, J. G. J. Ontogeny of behaviour and concurrent developmental changes in sensory systems in teleost fishes. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. (Ed) *Fish Physiology*. New York: Academic Press, v.11-B, p. 345–395, 1988.

OBER, E. A.; FIELD, H. A.; STAINIER, D. Y. R. From endoderm formation to liver and pancreas development in zebrafish. *Mechanisms of Development*, Kobe, Japan, v. 120, p. 5-18, 2003.

PAMPLONA, L.G. C.; LIMA, J.W.O.; CUNHA, J.C.L.; SANTANA, E.W.P. Avaliação do impacto na infestação por *Aedes aegypti* em tanques de cimento do Município de Canindé, Ceará, Brasil, após a utilização do peixe *Betta splendens* como alternativa de controle biológico. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.37, n.5, p.400-404, set-out, 2004.

PATIÑO, R.; SULLIVAN, C.V. Ovarian follicle growth, maturation and ovulation in teleost fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, v.26, p.57-70, 2002.

PATIÑO, R.; TAKASHIMA, F. In: Takashima, F.; Hibiya, T., editors. *An atlas of fish histology*, 2nd ed. Stuttgart Kodansha-Gustav Fisher, p.128-153, 1995.

PEÑA, R., DUMAS, S., VILLALEJO-FUERTE, M. and ORTÍZ-GALINDO, J.L. Ontogenetic development of the digestive tract in reared spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae. *Aquaculture*, v. 219, p. 633-644, 2003.

RAINBOTH, W.J. *Fishes of the Cambodian Mekong*. FAO Species Identification Field Guide for Fishery Purposes. FAO, Rome, p.265, 1996.

REDDING, J.M.; PATIÑO, R. Reproductive physiology. In: EVANS, D.H. (Ed.). *The physiology of fishers*. Boca Raton (Florida): CRC Press, Marine Sciences Series, p. 503-534, 1993.

REID, S.G.; SUNDIN, L.; MILSON, W.K. The cardiorespiratory system in tropical fishes: structure, function and control. In: VAL, A.L.; ALMEIDA-VAL, V.M.F.; RANDALL, D.J. *The physiology of tropical fishes*. USA: Elsevier, v. 21, p.225-275, 2005.



REUTTER, K.; WITT, M. Morphology of vertebrate taste organs and their nerve supply. In: SIMON, S. A.; ROPER, D. S. D. *Mechanism of Taste Buds Transduction*. Boca Raton: CRC Press, p. 29-82, 1993.

RIBEIRO, F.A.S.; FERNANDES, J.B.K. Sistemas de produção de peixes ornamentais. *Panorama da Aquicultura*, v.109, p.35-39, 2008.

ROTTA, M. A. Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestivo dos peixes relacionados à piscicultura. Documentos 53 – EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). *Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*. ISSN: 1517 – 1973, p. 48, 2003.

SANTIN, M.; BIALETZKI, A.; NAKATANI, K. Mudanças ontogênicas no trato digestório e dieta de *Apareiodon affinis*. *Acta Scientiarum*. Biological Sciences. Maringá, v.26, n. 3, p. 291-298, 2004.

SANTOS, D.L.; SANTOS, C.J.A.; QUEIROZ, A.C.S.; SANTOS, A.J.G. Tempo de rematuração em fêmeas de *Betta splendens* (REGAN, 1910) submetidas a dietas com diferentes níveis protéicos. *Revista Brasileira de Engenharia de Pesca*, v. 4, n. 2, p. 73-78, 2009.

SCHULZ, R.W.; VISCHER, H.F.; CAVACO, J.E.; SANTOS, E.M.; TYLER, C.R.; GOOS, H.J.; BOGERD, J. Gonadotropins, their receptors, and the regulation of testicular functions in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology -Part B Biochemistry and Molecular Biology*. Jun; 129(2-3), p. 407-17, 2001.

SEIXAS-FILHO, J. T.; BRÁS, J. M.; GOMIDE, A. T. M.; OLIVEIRA, M. G. A.; DONZELE, J. L.; MENIN, E. Anatomia funcional e morfometria do intestino no Teleostei (Pisces) de água doce surubim (*Pseudoplatystoma coruscans* – Agassiz, 1929) *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v. 30, n. 6, p. 1670-1680, 2001.

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

TURNER, C.L. Viviparity in teleost fishes. *Science Monthly*, v. 65, p. 508-518, 1947.  
TYLER C.R.; SUMPTER, J.P. Oocyte growth and development in teleosts. *Reviews in fish biology and fisheries*, v. 6. p. 287-318, 1996.

VAZZOLER, A.E.A.M. *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. Maringá: EDUEM, p.196, 1996.

WALLACE, R.A.; SELMAN, K. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. *Science of Zoology*, v. 21, p. 325-343, 1981.

WELTZIEN, F.A.; ANDERSSON, E.; ANDERSEN, O.; SHALCHIAN-TABRIZI, K.; NORBERG, B. The brain-pituitary-gonad axis in male teleosts, with special emphasis on flatfish (Pleuronectiformes). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, v.137, p. 447-477, 2004.



WOLFSHEIMER, G. *The guide to owning Bettas*. Neptune City: T.H.F. Publications, p.63, 2003.

WOOTTON, R. J. *Ecology of teleost fishes*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998.

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 pitope. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, v. 99, n. 5, p. 2854-2859, 2002.

ZAIDEN, S. F.; *Morfologia gonadal e Metabolismo energético da Piraputanga Brycon hilarii (Cuvier e Valenciennes, 1849) (Pisces, Characidae), em cativeiro, durante ciclo reprodutivo anual*. Tese (Doutorado em aquicultura) - Centro de Aquicultura (CAUNESP). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, p.152, 2000.

ZAVALA-CAMIN, L. A. *Introdução ao estudo sobre alimentação natural de peixes*. Maringá. Ed. EDUEM, p.129, 1996.

ZUANON, J.A.S.; SALARO, A.L.; VERAS, G.C.; TAVARES, M.M.T.; CHAVES, W. Tolerância aguda e crônica de adultos de beta, *Betta splendens*, à salinidade da água. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.38, n.11, p.2106-2110, 2009.

ZUANON, J.A.S.; SALARO, A.L.; BALBINO, E. M.; SARAIVA, A.; QUADROS, M.; FONTARIA, R.L. Níveis de proteína bruta em dietas para alevinos de acará-bandeira. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.35, n.5, p.1893-1896, 2006.

**ARTIGO 1: Ontogenia do trato digestório de *Betta splendens***

Será submetido para: *Aquaculture* (Impact Factor 2,041)

**Resumo**

Entre as alterações morfológicas que mais influenciam na sobrevivência e crescimento dos peixes durante o início do ciclo de vida, está a formação do trato digestório, com sua complexidade variando de acordo com a espécie e seu hábito alimentar. A espécie *Betta splendens* tem hábito alimentar carnívoro e não existe na literatura estudos sobre o desenvolvimento de seu trato digestório. Assim, esta pesquisa teve o objetivo de descrever a ontogenia do trato digestório de *B. splendens* por meio de histologia e microscopia eletrônica de varredura (MEV). As larvas foram obtidas de reprodução natural e mantidas sob cuidado parental do macho. Elas foram coletadas a partir da eclosão (tempo zero) e posteriormente a cada 2 horas até atingir 20 horas pós-eclosão (hpe), seguindo, a cada 4 horas até 44 hpe, depois a cada 6 horas até completar 92 hpe, após este período, esperou-se 9 dias para a próxima coleta, completando 308 horas de desenvolvimento pós-eclosão. Em cada tempo de coleta, os peixes foram anestesiados em solução de bezoncaína, pesados e fixados em formol 4% tamponado e também em Karnovsky modificado. A temperatura da água durante a ontogênese foi de  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  e o pH  $6,9\pm 0,3$ . A eclosão ocorreu 28 horas pós-fertilização e as larvas apresentavam em média  $2,32\pm 0,23\text{mm}$  de comprimento total (CT),  $2,23\pm 0,21\text{mm}$  de comprimento padrão (CP) e peso de  $215\pm 49,93\mu\text{g}$ . Neste momento, apresentavam-se com trato digestório incompleto, visualizando-se um tubo reto e simples com epitélio constituído por uma camada de células colunares na região ventral e posterior da larva, representando o intestino primitivo. Com 14 hpe, um pequeno lúmen surgiu na região mediana do tubo digestório, o qual dará origem ao segmento intestinal. Com 18 hpe foi observada a abertura bucal e dentes maxilares. A vesícula biliar apresentou-se de forma esférica com 20 hpe. Neste estágio, a língua estava começando a formar-se no assoalho da boca e o pâncreas apresentava poucos grânulos de zimogênio. O trato digestório estava totalmente aberto com 32 hpe e a língua apresentava botões gustativos e melanóforos na região dorsal com 40 hpe. A absorção total do saco vitelínico ocorreu com 74 hpe, quando foi observado conteúdo no estômago e intestino. Neste período, os peixes apresentavam  $3,46\pm 0,15\text{mm}$  (CT),  $3,15\pm 0,20\text{mm}$  (CP) e peso de  $340\pm 14,12\mu\text{g}$ . O trato digestório e glândulas anexas estavam totalmente diferenciados e funcionais. Os animais apresentaram reserva endógena até 68 hpe, sendo necessária a utilização de alimentação exógena após este período. Levando em consideração o hábito alimentar e suas particularidades, o conhecimento morfofuncional do trato digestório tem grande importância para a formulação e elaboração de dietas que atendam às exigências desta espécie, visando melhorias no desempenho produtivo e saúde dos animais.

**Palavras-chave:** peixe ornamental, desenvolvimento, histologia, larva.

## Abstract

Among the morphologic alterations that influences the most in survival and growth of the fish during the beginning of the life cycle, it is to the formation of the digestive tract, with its complexity varying according to the species and its alimentary habit. *Betta splendens* species have carnivorous alimentary habit and it doesn't exist in the literature studies on the development of the your digestive tract. Therefore, this study had the aim of describing the ontogenic of the digestive tract of *B. splendens* through histology and scanning electron microscopy (SEM). The larvae were obtained from natural reproduction and maintained under male parental care. They were collected starting from the hatching (time zero) and later every 2 hours until reaching 20 hours post-hatching (hph), proceeding, every 4 hours up to 44 hph, later every 6 hours until completing 92 hph, after this period, it was waited 9 days for the next collection, completing 308 hours of development post-hatching. In every collection time, the fish were anesthetized in a solution of bezoncaïne, weighed and fixed in 4% buffered formaldehyde y and either in modified Karnovsky solution. The water temperature during ontogeny was  $28.0 \pm 2.0$  °C and pH  $6.9 \pm 0.3$ . The hatching occurred at 28 hours post-fertilization and the larvae presented  $2.32 \pm 0.23$ mm of total (CT) length on average,  $2.23 \pm 0.21$ mm of standard (CP) length and weight of  $215 \pm 49.93$ µg. At this time the larvae presented an incomplete digestive system, being viewed as a straight tube lined by a simple epithelium that consisted by a layer of columnar cells located in the ventral and posterior regions of the larva, representing the primitive gut. With 14 hph appeared a lumen in the medium area of the digestive tube, which will give rise at the intestinal segment. With 18 hph was observed the mouth opening and maxillary teeth. The gall bladder was presented of spherical form at 20 hph. In this apprenticeship, the tongue was beginning to form in the surface of the mouth and the pancreas presented few zymogen granules. The digestive tract was totally open with 32 hph and the tongue presented taste buds and melanophores in the dorsal region at 40 hph. The total absorption of the yolk sack happened with 74 hph, when feed particles were observed into the stomach and intestine. In this period, the animals presented  $3.46 \pm 0.15$ mm (CT),  $3.15 \pm 0.20$ mm (CP) and weight of  $340 \pm 14.12$ µg. The digestive tract and annexes glands were fully differentiated and functional. The animals presented endogenous reserve until 68 hph, being necessary the exogenous feeding after this period. Taking in consideration the feeding habit and your peculiarities, the morphofunctional knowledge of the digestory system have great importance for the formulation and preparation of diets that meet the requirements of this species, looking for improvement in the productive performance and health of the animals.

**Key-words:** ornamental fish, development, histology, larvae.

## 1. INTRODUÇÃO

Dentre as espécies ornamentais cultivadas no Brasil, destaca-se o *Betta splendens*, conhecido popularmente como “beta” ou “peixe de briga” e nos EUA como *Siamese Fighting Fish* por apresentar agressividade contra machos da mesma espécie. É um peixe originário da bacia do rio Mekong, na península Malaia, Sudeste Asiático. O nome *Betta* teve origem numa tribo guerreira chamada "Ikan Bettah" nativa do Sião, atual Tailândia (FARIA *et al.*, 2006).

Embora o *B. splendens* seja muito importante para a aquicultura mundial, pouco se conhece sobre seu desenvolvimento inicial, sendo imprescindível a adequada compreensão da biologia da espécie para o sucesso da criação (ROTTA, 2003). As diversas variáveis relacionadas à ontogenia larval devem ser consideradas e dentre elas, conhecimentos sobre o desenvolvimento do trato digestório são essenciais (YÚFERA e DARIAS, 2007).

Tais informações são necessárias para determinar o tempo adequado para primeira transição alimentar, conhecer a fisiologia nutricional das larvas e adaptar as diversas práticas de criação e alimentação para os diferentes estádios de desenvolvimento (BAGLOTE *et al.*, 1997; ZAMBONINO-INFANTE e CAHU, 2001; MAI *et al.*, 2005; QU *et al.*, 2012). Neste contexto, um grande número de trabalhos vem sendo executados com o objetivo de descrever a organogênese do trato digestório para diversas espécies com potencial para aquicultura (PAPADAKIS *et al.*, 2009).

O estudo da ontogenia é útil como ferramenta para a descrição e conhecimento do início do desenvolvimento de diversas espécies, podendo contribuir para o desenvolvimento comercial em cativeiro de novos estoques e avaliação daqueles já explorados (SANTIN *et al.*, 2004). De acordo com Micale *et al.* (2006), técnicas de

morfologia e histologia são consideradas como o passo inicial rumo à determinação das relações funcionais entre alimentação e assimilação.

Diante destas considerações e sabendo-se que para o sucesso na obtenção de peixes com âmbito comercial é necessário o conhecimento de sua biologia, este estudo teve como objetivo acompanhar e registrar o desenvolvimento do trato digestório de *Betta splendens*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Nesta pesquisa, foi adotada a terminologia referida por Bértin (1958), que dividiu o trato digestório em 1-) intestino cefálico, que corresponde à cavidade oral e faringe; 2-) intestino anterior, que corresponde ao esôfago e estômago; 3-) intestino médio, que é o intestino propriamente dito, cujo limite posterior é marcado pela válvula íleorretal ou por glândulas retais e o 4-) intestino posterior que inclui o reto e ânus.

A terminologia utilizada para os estádios de desenvolvimento dos peixes foi adotada segundo Kendall *et al.* (1984) que instituíram o termo “larva” como a fase que se estendeu da eclosão até a metamorfose.

### 2.1 Manejo reprodutivo

O experimento foi realizado de Abril a Julho de 2011 no Laboratório de Peixes Ornamentais, pertencente ao Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), Campus de Jaboticabal-SP, Brasil. Reprodutores machos e fêmeas de *Betta splendens* (variedade véu) foram mantidos em aquários individualizados com capacidade de 2 litros dentro de caixas de polietileno com sistema de recirculação de água à temperatura de  $28,0 \pm 2,0^\circ \text{C}$ , durante dez dias para aclimação. Após este período, as fêmeas foram distribuídas em recipientes plásticos com furos nas laterais e inseridas nos aquários dos machos por um dia, e então soltas nos mesmos, permanecendo por três dias para acasalamento. Durante este período, ocorreram observações constantes para que o momento da desova fosse registrado. Oito

casais desovaram simultaneamente, sendo realizado um “pool” dos ovos de todos os casais para eliminação de possíveis problemas genéticos inerentes à consanguinidade, para posteriores coletas amostrais.

## 2.2 Coletas amostrais

Os peixes foram coletadas no momento da eclosão (tempo zero), e posteriormente a cada 2 horas até atingir 20 horas pós-eclosão (hpe), seguindo a cada 4 horas até completar 44 hpe, a cada 6 horas até perfazer 92 hpe, depois disso, com um intervalo de 9 dias pós-eclosão (308 hpe). Os tempos de amostragem foram estabelecidos após a execução de estudos prévios piloto realizado pelo grupo de pesquisa. A temperatura da água durante a ontogênese foi de  $28,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$  e pH de  $6,9 \pm 0,3$  monitorado com o equipamento YSI, modelo pH100.

Em cada coleta, 10 amostras de larvas e juvenis foram fixadas após serem anestesiadas em solução de benzocaína, pesados e, em seguida, uma parte dos animais foi fixada em formol 4% com tampão fosfato para análise em microscopia de luz e a outra parte em solução de Karnovsky modificado tamponado (contendo aldeído glutárico a 2,5% e paraformaldeído a 1,0%, e tampão cacodilato 0,1M com pH 7,4) para análise em microscopia eletrônica de varredura, sendo ambas amostras armazenadas sob baixas temperaturas ( $-4^\circ\text{C}$ ). O processamento das amostras para as análises em microscopia de luz foi realizado no Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal enquanto que, o processamento das amostras para microscopia eletrônica de varredura ocorreu no Laboratório de Microscopia Eletrônica, ambos pertencentes à FCAV/UNESP de Jaboticabal-SP.

### **2.3 Análise estereomicroscópica e morfometria**

As análises morfológicas externas das larvas foram realizadas em estereomicroscópio LEICA MZ 8, acoplado à câmera digital LEICA DFC 280 utilizando-se o programa IM 50-LEICA. Foram realizadas medidas do comprimento total (CT) que foi aferida através da distância entre a ponta do focinho e a extremidade da última vértebra caudal e do comprimento padrão (CP) sendo obtido pela distância da extremidade mais anterior do focinho à base dos raios medianos da nadadeira caudal, em linha reta, conforme RICKER (1968).

### **2.4 Processamento das amostras e análise histológica (Microscopia de luz - ML)**

As amostras foram incluídas em Histosec® e Historesina Leica e fotodocumentadas em microscópio DM 2500 Leica, utilizando o *software* Leica Application Suite (LAS).

#### **2.4.1 Inclusão em Histosec®**

As amostras previamente fixadas em formol 4% tamponado foram lavadas em tampão fosfato 0,1M, desidratadas em série de concentração crescentes de etanol (70%, 80%, 90%, 95%, etanol absoluto I, II e III), diafanizadas em xilol I, II e III e, em seguida, incluídas em Histosec® (Merck). Os cortes foram realizados com 5 µm de espessura, montados em lâminas e colorados com Hematoxilina-Eosina (TOLOSA *et al.*, 2003).

#### **2.4.2 Inclusão em Historresina**

As amostras fixadas em Karnovsky modificado tamponado foram lavadas em tampão fosfato 0,1M, desidratadas por 24 horas em etanol 80% e depois submetidas a três lavagens de 30 minutos cada em etanol 90%, 95% e 100%. Permaneceram, posteriormente, 4 horas na solução de pré-infiltração de glicolmetacrilato (GMA) com etanol (1:1), 16 horas na etapa de infiltração (somente GMA) e, então foram incluídas em GMA com solução endurecedora nos histomoldes. As amostras permaneceram em estufa a 50°C por

no mínimo 24 horas para polimerização. Os cortes foram obtidos com 2 $\mu$ m de espessura, montados em lâminas e corados com Hematoxilina-Floxina (TOLOSA *et al.*, 2003).

### 2.5 Processamento das amostras e análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV)

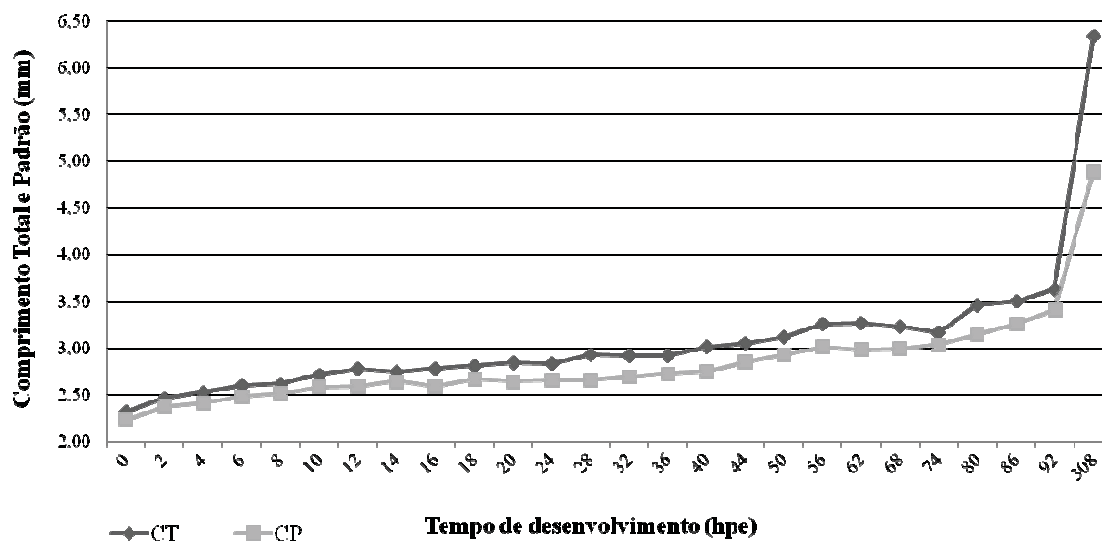
Para complementação das análises referentes às características morfológicas externas das larvas, os animais fixados em Karnovsky modificado tamponado, foram transferidos para solução tampão cacodilato de sódio, posteriormente, pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio a 1% por duas horas, lavadas novamente em tampão e submetidas à desidratação em bateria com concentração crescente de etanol (30%, 50%, 70%, 80%, 90% 95% e três banhos de 10 minutos cada em etanol 100%), em seguida as amostras foram secas em secador de ponto crítico com CO<sub>2</sub> líquido em aparelho BAL-TEC, montadas em suporte de cobre, metalizado em ouro e eletronicografadas em microscópio eletrônico de varredura (JEOL-JSM 5410).

## 3. RESULTADOS

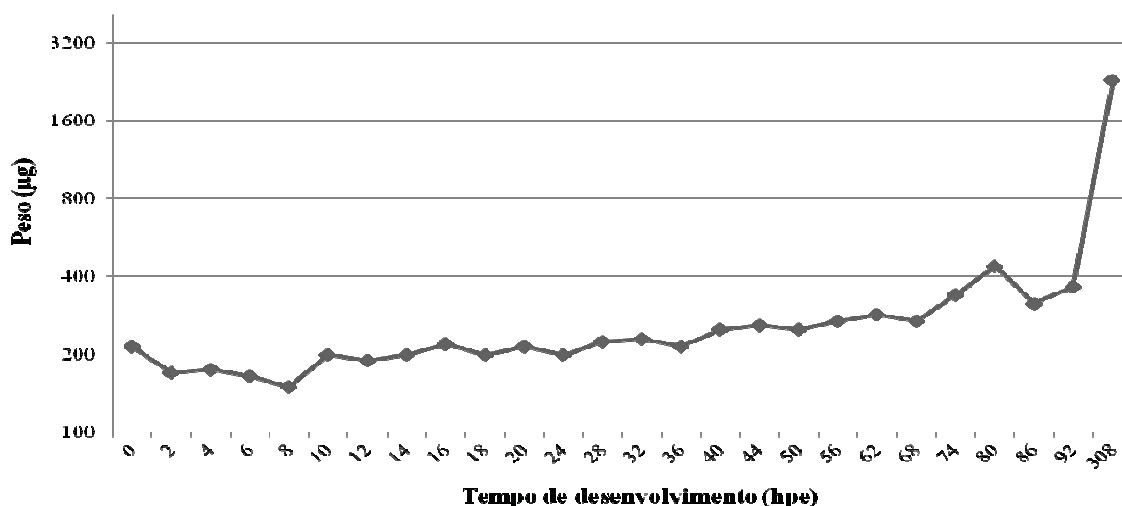
O trato digestório do *Betta splendens* pôde ser dividido em intestino cefálico (cavidade oral e faringe, incluindo os lábios), intestino anterior (esôfago e estômago), intestino médio (intestino propriamente dito) e intestino posterior (reto e ânus).

As larvas de *B. splendens* eclodiram 28 horas pós-fertilização em uma temperatura de 28,0 $\pm$ 2,0°C. No momento da eclosão, as larvas apresentavam em média 2,32 $\pm$ 0,23mm de comprimento total (CT), 2,23 $\pm$ 0,21mm de comprimento padrão (CP) (**Figura 1**) e pesavam em média 215 $\pm$ 49,93 $\mu$ g (**Figura 2**). Durante o desenvolvimento pode-se notar que o crescimento foi linear. A absorção total do saco vitelínico ocorreu com 73h30min pós-eclosão quando os peixes apresentavam 3,46 $\pm$ 0,15mm (CT), 3,15 $\pm$ 0,20mm (CP) e média de peso de 340 $\pm$ 14,12 $\mu$ g.





**Figura 1:** Média de comprimento total (CT) e padrão (CP) em milímetros (mm) de larvas de *Betta splendens* a partir da eclosão.

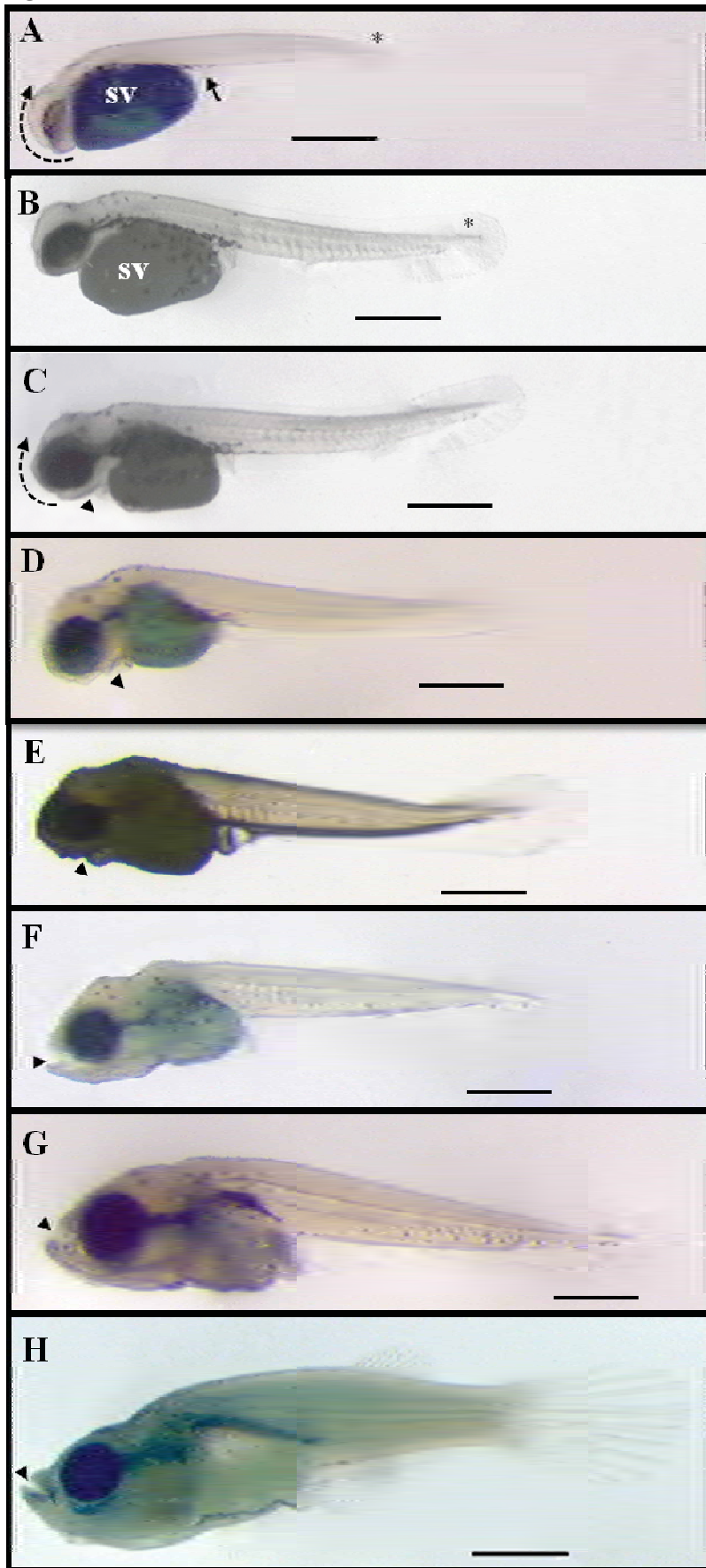


**Figura 2:** Média de peso em microgramas ( $\mu\text{g}$ ) de larvas de *Betta splendens* a partir da eclosão.

No momento da eclosão (tempo zero), as larvas apresentavam corpo em postura distendida e cabeça voltada para baixo, aderida à região anterior do saco vitelínico (**Figura 3A**). Através da estereomicroscopia evidenciaram-se as modificações sucessivas na posição da boca, de ventral para dorso-terminal durante o desenvolvimento, conforme destacado na **Figura 3**.

**Figura 3:** Morfologia externa de larvas de *B. splendens*. **A:** Larva recém-eclodida com postura distendida, intestino primitivo (seta) e nadadeira embrionária (\*). **B:** 10 hpe. **C:** 20 hpe, abertura da boca (ponta de seta). **D:** 32 hpe, redução acentuada do saco vitelínico. **E:** 44 hpe. **F:** 56 hpe. **G:** 80 hpe. **H:** 308 hpe, boca na região dorso-terminal. **Legenda:** intestino primitivo (seta); nadadeira embrionária (\*); saco vitelínico (sv); deslocamento da cabeça (seta pontilhada) e boca (ponta de seta). Fotos de A-G apresentam barra de calibração de 0,5mm e H barra de 1mm.

Figura 3



Um tubo reto e simples pode ser visualizado no momento da eclosão, cujo epitélio foi constituído por uma camada de células colunares na região ventral e posterior da larva, representando o intestino primitivo (**Figura 4B**), observando-se que as larvas eclodiram com boca e ânus fechados (**Figura 4C**).

Havia células indiferenciadas próximas à região cranial com 2 hpe, que mais tarde (6 hpe) esta massa celular originou a boca. O intestino posterior encontrava-se parcialmente aberto com 4 hpe.

Com 6 hpe, um primórdio do intestino anterior foi visualizado como uma pequena fenda (**Figura 4B**). Com 8 hpe em microscopia eletrônica de varredura observou-se o início da abertura bucal (**Figura 7B**).

Na cavidade bucofaríngea houve um alongamento da fenda bucal com 10 hpe, porém os lábios permaneciam aderidos através de uma membrana (**Figuras 4C e 4Ci**). Neste mesmo tempo, células do endoderma começaram a diferenciar-se em hepatócitos, dando início a formação do fígado. Iniciou-se a abertura do tubo digestório na região cranial, sendo revestido por epitélio simples colunar (**Figuras 4C e 4Cii**). Os arcos branquiais foram evidentes neste período. O pronefro iniciou sua diferenciação, dorsalmente ao intestino (**Figura 4D**).

O tecido cartilaginoso branquial apresentou-se envolvido por vasos no local onde dará origem aos filamentos branquiais com 12 hpe. Foi observado um ducto revestido por tecido epitelial simples pavimentoso que realizava conexão entre a cavidade bucofaríngea e o labirinto, sendo que este ducto tem a finalidade de transportar o ar até o labirinto que, apresentava grande rede de vasos sanguíneos, permitindo as trocas gasosas.

Um pequeno lúmem surgiu em torno de 14 hpe na região mediana do tubo digestório, apresentando-se revestido por epitélio simples colunar (**Figura 4D**). Este tubo dará origem ao segmento intestinal.

Os lábios não pigmentados encontravam-se separados após 18 hpe (**Figura 7D**), o lábio inferior é um pouco mais espesso, possuindo maior mobilidade que o superior. Na maxila pequenos dentes alinhados em fileira única foram observados (**Figura 7F**). Cílios (**Figura 7D**) e células receptoras ciliadas, denominadas neuromastos, foram visualizadas, estando concentradas na cabeça dos animais, principalmente próximo à boca (**Figura 7G**). Além do início da formação da membrana branquiostegial que posteriormente, cobrirá os arcos braquiais (**Figura 7E**), foi possível observar também a abertura da boca (**Figura 7D**). Na extremidade rostral da cavidade oral, iniciou o desenvolvimento das valvas orais, situadas imediatamente aborais às séries de dentes, apresentando uma valva superior e outra inferior.

Com 20 hpe, próximo ao fígado pode ser visualizado a vesícula biliar, que se apresentava de forma esférica (**Figura 4F**). Na cavidade bucofaríngea surgiu uma evaginação, dando início à formação da língua. O pâncreas, localizado entre o estômago, fígado e intestino, inicialmente apresentou poucos grânulos de zimogênio, os quais aumentaram em quantidade até a absorção do vitelo. O pâncreas apresentou padrão de organização acinar em sua porção exócrina (**Figura 6D**).

Com 24 hpe, foi possível observar a presença de um ducto que conectava a vesícula gasosa ao trato digestório, denominado ducto pneumático (**Figura 4F**).

O olho é muito importante para a visualização e captura da presa, e as larvas com 28 hpe apresentaram os olhos totalmente formados (**Figura 4E**). A nadadeira peitoral apresentava uma base cartilaginosa. As brânquias apresentavam filamentos e lamelas

primárias, porém ainda não estava completamente formada. O pronefro apresentava organização tubular em sua porção cranial.

Com 32 hpe, visualizaram-se em cada lado da faringe quatro pares de arcos branquiais cartilagosos que servirão de suporte às brânquias (**Figura 4E**). Na faringe foram visualizadas células mucossecretoras. Nesta espécie não foram encontrados dentes faríngeos. O trato digestório apresentou-se aberto em toda sua extensão (**Figuras 4E e 4F**). O pâncreas localizava-se fora do tecido hepático, próximo ao estômago, fígado e intestino (**Figura 5E**).

A habilidade natatória foi gradualmente se tornando eficiente e, a partir de 40 hpe, a vesícula gasosa encontrava-se inflada e revestida por um epitélio estratificado pavimentoso. Neste período deu-se início a formação de lamelas secundárias nas brânquias. A cavidade bucofaríngea mostrou-se revestida por epitélio pavimentoso simples (**Figura 5B**). A língua, localizada em uma depressão do assoalho da cavidade oral, é presa na base e possui relativa mobilidade (**Figura 6F**). Esta estrutura é revestida por epitélio, alargando-se em sentido caudal. No dorso da língua, a mucosa apresentou um sulco no plano mediano, e próximo ao ápice, ocorrem melanóforos, que se apresentaram dispersos e em pequena quantidade (**Figura 6F**). Neste tempo pode-se observar a presença de um vaso sanguíneo atrás do último arco branquial que separa a cavidade bucofaríngea do saco vitelínico. Observou-se também uma dilatação caudal no esôfago em forma de saco, a qual dará origem ao estômago. Com 44 hpe as lamelas secundárias das brânquias estavam completamente formadas.

No intestino médio (porção proximal e distal) visualizou-se com 56 hpe, tubo digestório com suas quatro camadas fundamentais: 1) mucosa com vilosidades típicas, revestida por epitélio simples colunar (enterócitos) apresentando borda em escova, 2)

submucosa mostrou-se composta por tecido conjuntivo frouxo, 3) camada muscular lisa que apresentou feixes longitudinais e transversais, e externamente, 4) a serosa que se apresentou revestida por epitélio simples pavimentoso (**Figuras 5E e 5F**). No intestino médio (porção distal) a mucosa com orla em escova apresentou abundância de células caliciformes entre as células epiteliais (**Figura 5G**). A submucosa era composta por tecido conjuntivo frouxo, a camada muscular era constituída por tecido muscular liso e a camada serosa apresentou-se revestida por epitélio simples pavimentoso. A mucosa do intestino posterior, compreendido pelo reto e ânus, apresentou-se com pregas longas que se projetavam em direção à luz revestida por epitélio simples colunar com células caliciformes (**Figura 5E**) e a submucosa era constituída igualmente ao intestino médio, porém a camada muscular apresentou-se mais delgada. Na região anal evidenciou uma camada muscular mais espessa e a camada serosa constituiu-se por uma delgada camada de tecido conjuntivo mais um epitélio simples pavimentoso (**Figura 5E**).

Com 68 hpe, ainda havia vestígios do saco vitelínico, indicando que a larva ainda se nutria com reserva endógena, porém, é neste período que os piscicultores iniciam a alimentação exógena, geralmente com náuplios de *Artêmia* sp. O esôfago apresentou-se pregueado (**Figura 5D**), revestido por epitélio simples colunar com células mucossecretoras entremeadas entre as células epiteliais lâmina própria constituída de tecido conjuntivo, a submucosa apresentou-se constituída por tecido conjuntivo frouxo e a camada muscular era constituída de músculo estriado esquelético e a última camada era a adventícia (**Figura 5D**). A superfície interna apresentou pregas longitudinais paralelas entre si, contínuas ao longo do órgão. No estômago havia uma camada muscular bem desenvolvida, a mucosa apresentava pregas altas e arredondadas. O estômago possuía forma sacular (**Figura 5A**), sendo constituído por quatro camadas: mucosa, submucosa,

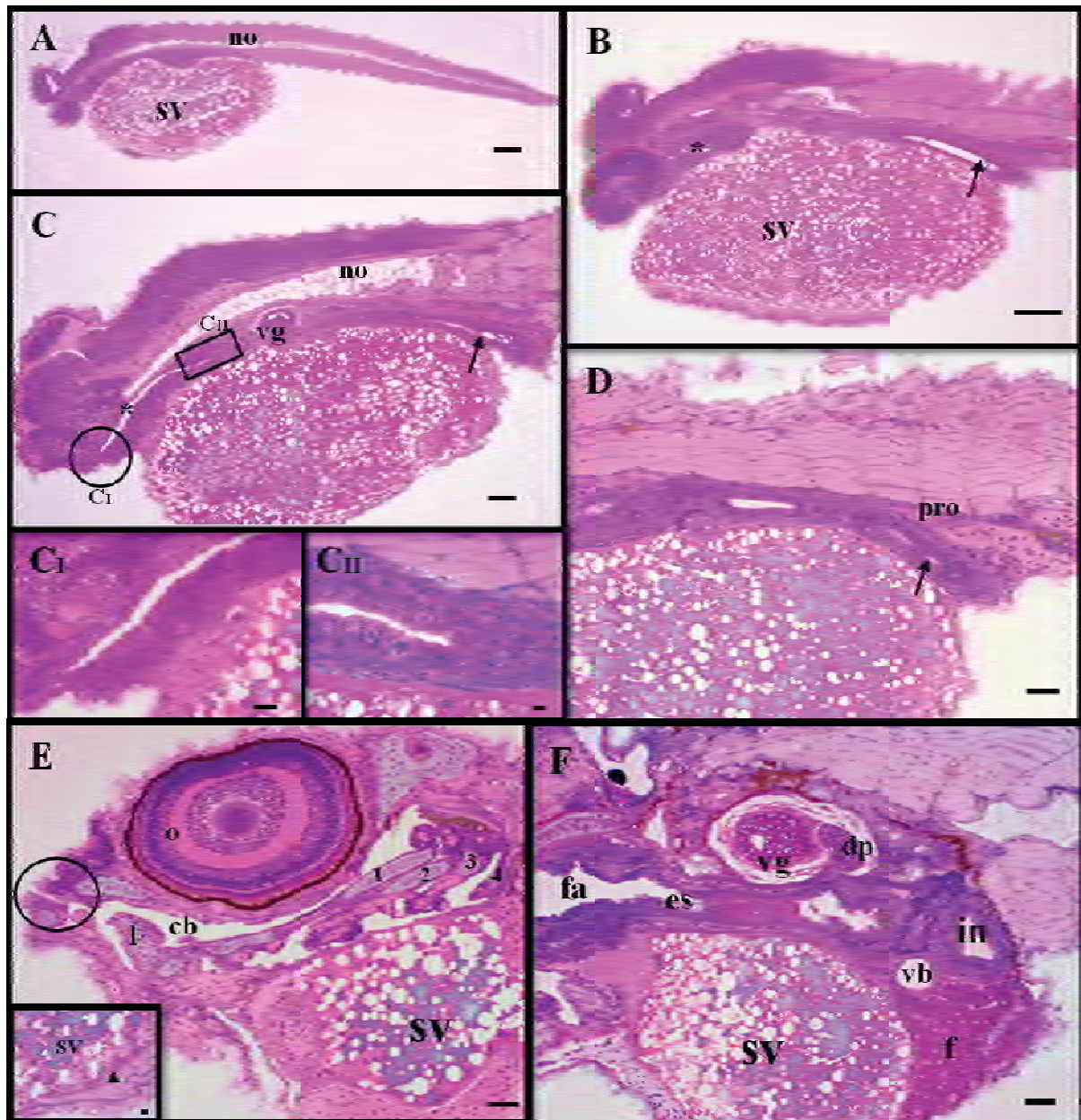
muscular e serosa. A camada mucosa apresentou-se pregueada, revestida por epitélio simples colunar, a submucosa formou-se por tecido conjuntivo frouxo; na espessa camada muscular, verificou-se a presença do tecido muscular liso e a camada serosa compôs-se por tecido conjuntivo frouxo com vasos, nervos e revestimento epitelial simples pavimentoso.

Conteúdo alimentar no interior do estômago e intestino foi observado com 74 hpe. Neste tempo, em alguns animais foi observado fígado vacuolizado e não se notava mais vitelo. Com 80 hpe, pode-se notar que a valva oral superior era mais ampla que a inferior (**Figura 7G**) e o fígado permanecia com vacúolos (**Figs. 6A e B**). Porém, com 86 hpe o fígado e pâncreas apresentavam aspecto normal (**Figura 6C**).

Com 308 hpe as brânquias possuíam lamelas secundárias (**Figura 5A**). Em microscopia eletrônica de varredura foram observados detalhes sobre os dentes, os quais apresentaram superfície lisa, desprovidos de cúspides (**Figura 7I**) e eram inseridos na parte interna das bordas labiais superior e inferior (**Figuras 7F e 7H**), porém na mandíbula eram maiores e mais numerosos.

Os principais eventos ontogênicos com seus respectivos tempos estão descritos na **Tabela 1**.

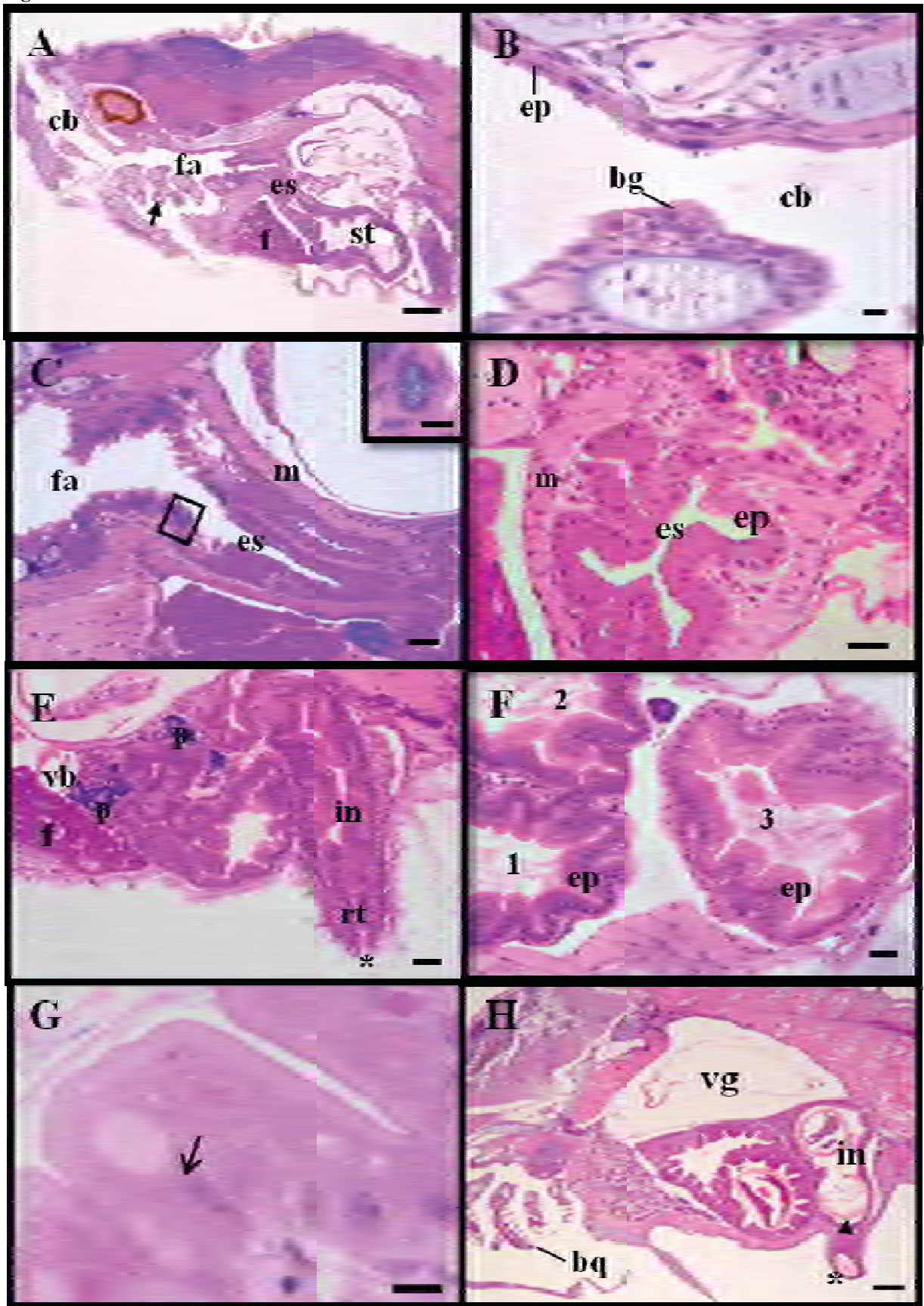




**Figura 4:** Fotomicrografias de larvas de *B. splendens*. Coloração HF. **A:** Larva recém-eclodida. **B:** 6 hpe; primórdio da cavidade bucofaríngea e intestino posterior. **C:** 10 hpe; cavidade oral fechada, destaque em CI: (círculo) e, CII (retângulo) fissura do tubo digestório. **D:** 14 hpe; lúmen na região mediana do tubo digestório, surgimento do pronefro e porção final do intestino posterior. **E:** 32 hpe; olho; cavidade oral (círculo), lábios, língua, arcos branquiais e, em destaque camada sincicial (ponta de seta) absorvendo vitelo. **F:** 32 hpe; faringe; esôfago, intestino, vesícula gasosa com seu ducto pneumático, fígado, vesícula biliar e saco vitelínico com considerável redução. **Legenda:** saco vitelínico (sv); notocorda (no); olho (o); formação da cavidade bucofaríngea (\*); cavidade bucofaríngea (cb); faringe (fa); esôfago (es); intestino primitivo (seta); vesícula gasosa (vg); ducto pneumático (dp); pronefro ou rim primitivo (pro); fígado (f); vesícula biliar (vb); intestino (in); língua (l) e arcos branquiais (1, 2, 3 e 4). **Barra de calibração.** **A:** 100 $\mu$ m. **B:** 100 $\mu$ m. **C:** 100 $\mu$ m, em destaque: círculo (20 $\mu$ m); destaque em retângulo (5 $\mu$ m). **D:** 30 $\mu$ m. **E:** 30 $\mu$ m, em destaque (5 $\mu$ m). **F:** 30 $\mu$ m.

**Figura 5:** Fotomicrografias de larvas de *B. splendens* com ênfase no trato digestório. Coloração HF com exceção da H. **A:** 56 hpe, intestino cefálico e anterior, fígado, brânquias com lamelas secundárias (seta). **B:** 56 hpe, cavidade bucal. **C:** 56 hpe, faringe e esôfago. Destaque: célula mucossecretora. **D:** 68 hpe, esôfago com pregas. **E:** 80hpe, glândulas anexas ao trato digestório (vesícula biliar, fígado e pâncreas); intestino posterior (ânus). **F:** 86 hpe, epitélio intestinal. **G:** 86 hpe, célula caliciforme na mucosa intestinal. **H:** 308 hpe, *Artêmia* sp. no intestino. Coloração HE. **Legenda:** cavidade bucofaríngea (cb); botão gustativo (bg); Lamelas branquiais (seta fechada); brânquias (bq); faringe (fa); esôfago (es); estômago (st); camada muscular (m); vesícula gasosa (vg); fígado (f); pâncreas (p); vesícula biliar (vb); intestino (in); epitélio (ep); porção inicial (1), porção média (2) e porção final (3) do intestino; célula caliciforme (seta aberta); cisto de *Artêmia* sp. (cabeça de seta); reto (r) e ânus (\*). **Barra de calibração.** **A:** 100µm. **B:** 10 µm. **C:** 20µm, em destaque (5µm). **D:** 20µm. **E:** 30µm. **F:** 20µm. **G:** 10 µm. **H:** 100 µm.

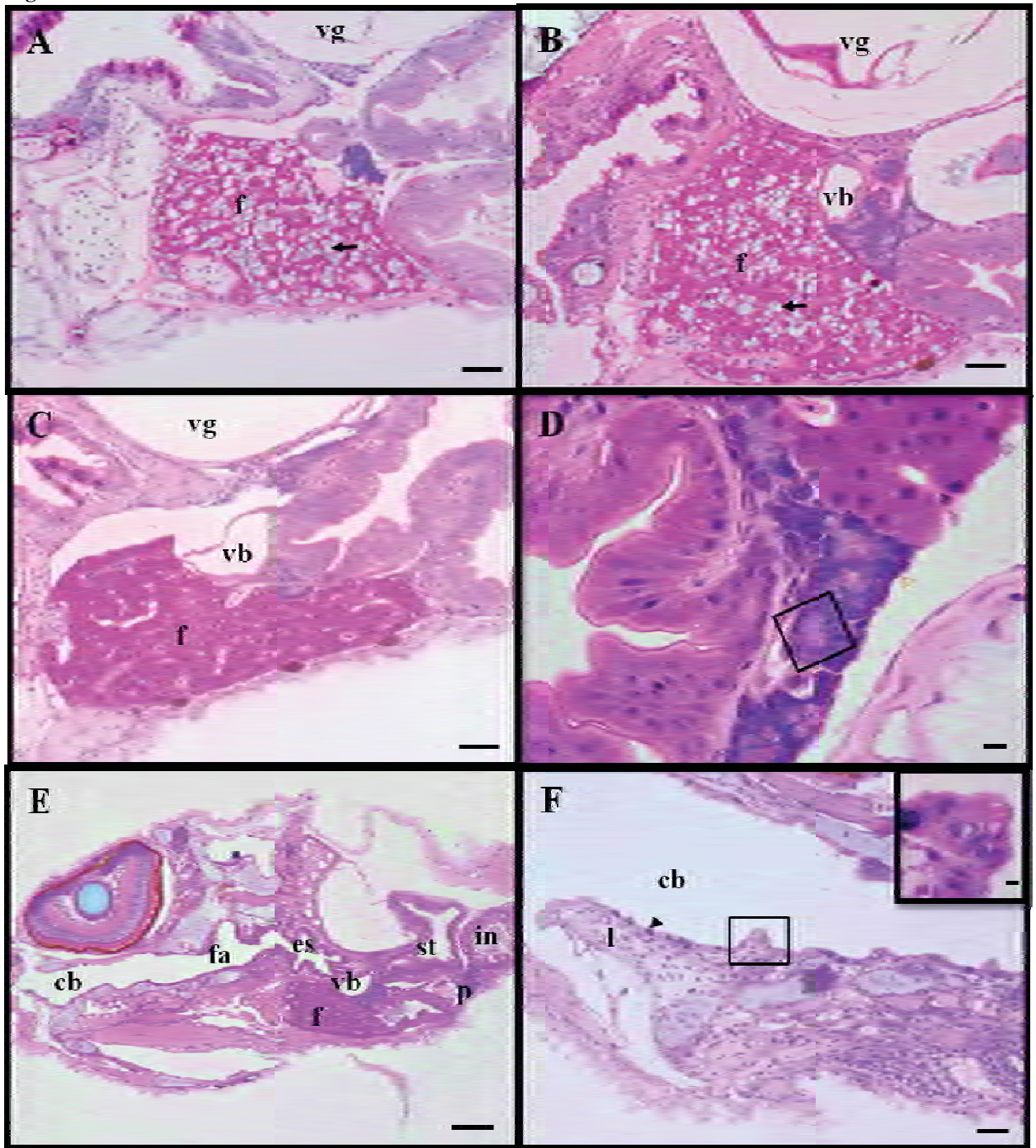
Figura 5

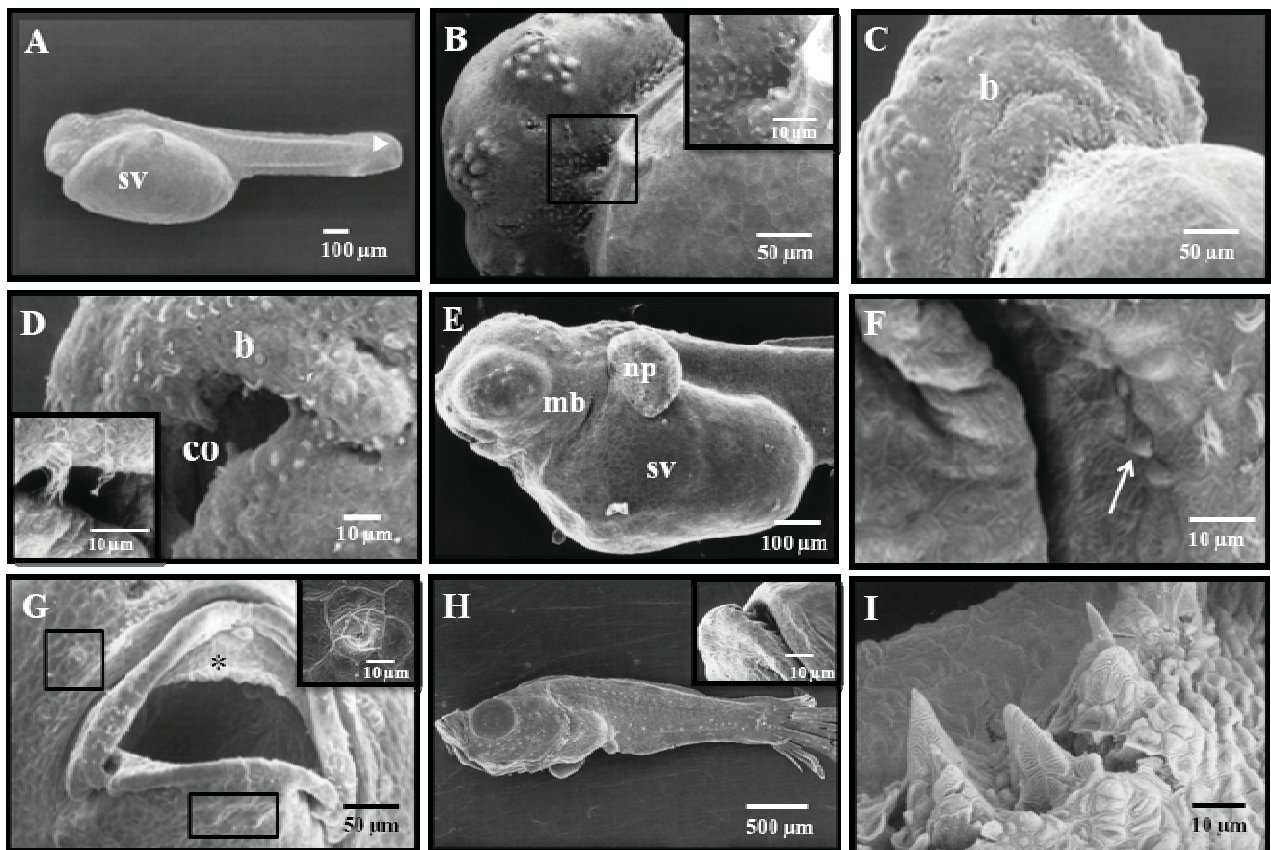


**Figura 6:** Fotomicrografias de *B. splendens*, coloração HE. **A:** 74 hpe, fígado com vacúolos (seta). **B:** 80 hpe, fígado com vacúolos (seta). **C:** 86 hpe, fígado com aspecto normal. **D:** Ácinos pancreáticos (em destaque). **E:** 74 hpe, alguns componentes do trato digestório. **F:** 80 hpe, cavidade bucofaríngea apresentando botões gustativos (em destaque). **Legenda:** vesícula gasosa (vg); cavidade bucofaríngea (cb); língua (l); melanóforos (cabeça de seta); faringe (fa); esôfago (es); estômago (st); fígado (f); vacúolos no fígado (seta); vesícula biliar (vb); pâncreas (p) e intestino (in). **Barra de calibração.** **A:** 30µm. **B:** 30µm. **C:** 30µm. **D:** 5µm. **E:** 100µm. **F:** 30µm, em destaque 10µm.



Figura 6





**Figura 7:** Eletronmicrografias de varredura de *B. splendens*. **A:** Larva recém-eclodida. **B:** 8 hpe, formação do sulco bucal (destaque) **C:** 16 hpe, boca. **D:** 18 hpe, boca com lábios separados e cílios no lábio superior (destaque). **E:** 20 hpe, visão lateral da larva, redução do saco vitelínico. **F:** 40 hpe, dentículos maxilares. **G:** 80 hpe, Abertura oral com a valva superior (\*) e, em destaque um neuromasto. **H:** 308 hpe, visão lateral e, em destaque a boca com numerosos dentes no lábio inferior. **I:** 308 hpe, dentes pontiagudos. **Legenda:** nadadeira embrionária (ponta de seta); saco vitelínico (sv); boca (b); cavidade oral (co); membrana branquiostegial (mb); nadadeira peitoral (np) e dentículos (seta).

**Tabela 1.** Características estruturais do desenvolvimento larval de *B. splendens* de acordo com o tempo de desenvolvimento em horas pós-eclosão (hpe).

Tempo (hpe)	Fase	Descrição
<b>Eclosão (0hpe)</b>	Larval	Corpo em postura distendida e cabeça voltada para baixo. Tubo digestório era reto e simples, a larva não apresentava boca e ânus aberto.
<b>4</b>	Larval	Intestino posterior apresentava-se parcialmente aberto.
<b>6</b>	Larval	Extremidade anterior apresentando pequena fenda, indicando primórdio da cavidade oral.
<b>10</b>	Larval	Alongamento da fenda bucal. Células do endoderma se diferenciando em hepatócitos.
<b>14</b>	Larval	Surgiu um lúmem na região mediana do tubo digestório.
<b>18</b>	Larval	Abertura bucal e visualização de dentes maxilares, neuromastos. Início do desenvolvimento da membrana branquiostegial.
<b>20</b>	Larval	Evaginação no assoalho da boca para formação da língua. Cabeça em posição semiventral. Vesícula biliar apresentava-se com formato esférico.
<b>28</b>	Larval	Olhos completamente formados.
<b>32</b>	Larval	Trato digestório aberto em toda sua extensão.
<b>40</b>	Larval	Língua formada apresentando botões gustativos e melanóforos na região dorsal. Vesícula gasosa totalmente inflada.
<b>44</b>	Larval	Brânquias com lamelas primárias e secundárias totalmente formadas.
<b>50</b>	Larval	Células mucossecretoras bem evidentes na faringe.
<b>56</b>	Larval	Intestino com vilosidades típicas, borda em escova e células caliciformes.
<b>68</b>	Larval	Larva com vestígios de vitelo. Esôfago apresentou-se pregueado e com camada muscular estriada bem desenvolvida. Estômago em forma sacular apresentou camada de tecido muscular liso.
<b>74</b>	Larval	Larva sem saco vitelínico. Observação de partículas alimentares no interior do estômago e intestino.
<b>86</b>	Larval	Fígado e pâncreas com aspecto normal, pâncreas localizou-se entre estômago, fígado e intestino.
<b>308</b>	Larval	Dentes maiores e pontiagudos no lábio inferior e menores no superior.

#### 4. DISCUSSÃO

A temperatura da água monitorada durante o desenvolvimento ontogênico ficou em torno de  $28,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ , estando dentro da faixa de conforto para o “beta” segundo Halperin, *et al.*, (1992), os quais determinaram como zona ótima para produção de larvas entre  $25,0$  e  $28,0^\circ\text{C}$ .

A maioria das larvas de peixes de água doce eclodem com boca e mandíbulas ainda não formadas, olhos despigmentados e grande saco vitelínico (NAKATANI *et al.*, 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). Como observado em larvas de *B. splendens*. Ademais, as larvas desta espécie, ao eclodirem, apresentaram somente uma nadadeira embrionária circundava a cauda em toda a sua extensão e tubo digestório rudimentar, sem aberturas oral e anal.

Quando esgotadas as reservas endógenas, a larva dependerá de sua habilidade de captura para adquirir seu alimento. Neste processo, a visão é de fundamental importância, especialmente após o início da alimentação exógena (CARVALHO *et al.*, 2004). De acordo com Blaxter (1986) e Noakes e Godin (1988), uma grande parte de larvas de peixes eclodem com os receptores oculares ainda imaturos (não funcionais), só atingindo sua capacidade receptora a partir do momento da pigmentação da retina. No entanto, o desenvolvimento do olho, em *B. splendens*, ocorreu de forma progressiva estando totalmente formado com 28 hpe. Em *Astronotus ocellatus*, o olho estava totalmente formado com 383 hpe, apresentando pigmentação e coloração intensa na retina (Paes *et al.*, 2011). No entanto, Bialetzki *et al.*, (2001) descreveram que larvas de *Auchenipterus osteomystax*, ao eclodirem, se encontravam bem desenvolvidas, com olhos pigmentados e boca aberta.



Após a absorção do vitelo, que ocorreu com 74 hpe, o crescimento e o ganho de peso aumentaram acentuadamente. Paes *et al.* (2011) descreveram que o saco vitelínico, no oscar (*Astronotus ocellatus*) foi completamente absorvido com 257 hpe. De acordo com Nakatani *et al.* (2001), o tempo de consumo do vitelo é um parâmetro biológico que varia entre as várias espécies de peixes.

A abertura da boca em *B. splendens* foi observada com 18 hpe. Em *Seriola lalandia*, este evento foi observado com 2 dias pós-eclosão (CHEN *et al.*, 2006). Já em *Glossolepis incisus*, a abertura da boca ocorreu ainda no interior dos ovos, como relatado por Nakatani *et al.*, (2001) e Ferreira *et al.*, (2009).

A posição da boca nos peixes pode ser terminal, dorso-terminal ou ventro-terminal (KEAST e WEBB, 1966). A posição, a forma e o tamanho da boca estão fortemente relacionados ao hábito alimentar dos peixes (KEAST e WEBB, 1966; RODRIGUES e MENIN, 2006a). A forma e a posição da boca podem influenciar quantitativa e qualitativamente o alimento ingerido (HYATT, 1979). O *Betta splendens* eclodiu com a boca em posição ventral e no final do desenvolvimento a boca adquiriu a posição dorso-terminal, localizada na porção anterior da cabeça e era formada por lábios.

Os lábios são elementos primários na procura do alimento, podendo assumir diferentes formas nos Teleostei (KAPOOR *et al.*, 1975; RODRIGUES e MENIN, 2006b). Em espécies carnívoras os lábios apresentam-se geralmente delgados e aderidos às respectivas maxilas (MENIN e MIMURA, 1991; RODRIGUES e MENIN, 2006a). Na espécie estudada nesta pesquisa não foi notada pigmentação nos lábios, porém, o inferior apresentava-se mais espesso, como observado por Maciel *et al.*, (2009) em trairões, *Hoplias lacerdae*.

As valvas orais, encontradas na cavidade oral do *B. splendens*, são semelhantes a relatadas por Rodrigues e Menin (2006) em *Salminus brasiliensis*. Estas estruturas estão envolvidas na mecânica respiratória e, provavelmente, com a prevenção ao escape da presa dessa cavidade (RODRIGUES e MENIN, 2006).

O *B. splendens* apresentava dentes menores no lábio superior e maiores no inferior, com formato pontiagudo e desprovidos de cúspides, como observado para espécies carnívoras predadoras, cujos dentes são caninos e pontiagudos (AL-HUSSAINI, 1952).

A língua do *B. splendens* estava localizada no assoalho bucal, apresentando-se como uma estrutura pequena, de coloração esbranquiçada e com pouca mobilidade. Tais informações corroboram o que afirmou Bértin (1958) sobre a língua dos peixes ser desprovida de musculatura própria é incapaz de movimentos amplos, com sua restrita mobilidade dependendo das estruturas esqueléticas adjacentes por ser a mais primitiva dentre os vertebrados.

Foram observados botões gustativos no interior da cavidade bucofaríngea de *B. splendens* que, segundo Hansen *et al.*, (2002), são órgãos quimiossensoriais que os peixes usam para aumentar o potencial de busca de alimento, selecionando substâncias comestíveis e rejeitando as não-comestíveis.

Em relação aos neuromastos, células sensoriais (mecanorreceptoras), são localizadas superficialmente na epiderme, constituindo os neuromastos livres (MATSUOKA, 2001; DIAZ *et al.*, 2003), apresentam cílios que podem ter tamanhos variados. Estas células foram observadas, neste estudo, distribuídas ao longo do corpo, na cabeça e, principalmente, próximos à boca, podendo estar relacionada com a seleção alimentar ou na fuga de um predador. Pois, de acordo com Liem *et al.* (2001), a mecanorrecepção tem um papel fundamental na adaptação das larvas a águas abertas após

a eclosão, e participa na detecção de estímulos mecânicos, identificando a aproximação da partículas móveis aos seu redor. Appelbaum e Riehl (1997) destacam o papel da mecanorrecepção na detecção de partículas móveis e, portanto, na captura de alimento.

Rodrigues e Menin (2006b) verificaram em dourado, *Salminus brasiliensis*, outras adaptações anatômicas que também possibilitam a ingestão e a deglutição de presas inteiras no intestino cefálico: fenda bucal ampla, cavidade oral alargada aboralmente e aparelho dentário faríngeo com espessura reduzida, o que favorece a tomada e a ingestão de presas de maior porte. Porém, nesta pesquisa não foi notado a presença de dentes faríngeos, mas a fenda bucal se alargou durante do desenvolvimento do “beta”, sugerindo que o mesmo é capaz de ingerir presas maiores.

Na faringe, foram encontradas células secretoras de muco, que segundo Galvão *et al.*, (1997) são células que participam no deslizamento das presas a serem deglutidas. A maioria dos estudos classificam as células secretoras de muco como células caliciformes ou células mucossecretoras, independente da localização. Porém, alguns estudos fazem distinção entre células secretoras de muco e células caliciformes, sendo a primeira encontrada no esôfago apresentando formato de saco e a segunda encontrada no intestino, como descrito por Leknes (2011) para *Hyphessobrycon anisitsi*. Sendo assim, neste estudo optou-se titular de célula mucossecretora.

Nos peixes geralmente o esôfago é um órgão tubular que serve de passagem do bolo alimentar entre a cavidade bucofaríngea e o estômago, com o ducto pneumático da vesícula gasosa se abrindo no esôfago das espécies fisóstomas (ZAVALA-CAMIM, 1996), isto também ocorreu em *B. splendens*. Contudo, o esôfago da espécie em estudo apresentou-se como um tubo curto com pregas. O aspecto das pregas internas da mucosa esofageana, que foram longitudinais e paralelas entre si seguiu os mesmos padrões para

*Leporinus macrocephalus* (RODRIGUES *et al.*, 2008) e para *Steindachnerina notonota* (SILVA *et al.*, 2005). Como na maioria dos Teleostei (MENIN, 1988; AMARAL, 1990; RODRIGUES *et al.*, 2002; RODRIGUES *et al.*, 2004), o padrão da mucosa esofageana longitudinal, pode ser relacionado com a distensibilidade da parede desse órgão, o que o torna adequado para a recepção e rápida condução de presas inteiras ao estômago.

O estômago apresentou-se revestido por epitélio simples colunar. Mesmo resultado foi obtido por Diaz *et al.*, (2003) para *Engraulis anchoita* e Santos *et al.*, (2007) para *Pimelodus maculatus*. Além disso, este órgão mostrou-se pregueado por toda sua extensão, o que permite o aumento da superfície de contato com o alimento e, conseqüentemente, a eficiência da digestão e assimilação. Porém, quando repleto de partículas alimentares, encontrava-se distendido.

Segundo Lemes e Braccini (2004) o fígado é responsável por importantes funções metabólicas, sendo a maior glândula do organismo, que se molda de acordo com o espaço na cavidade peritoneal.

Histologicamente, o fígado de *B. splendens*, apresentou hepatócitos que se arranjavam em placas celulares cordonais circundadas por capilares sinusóides, sendo semelhante ao descrito para outros teleósteos (BRUSLÉ e ANADÓN, 1996; LEMES e BRACCINI, 2004; VICENTINI *et al.*, 2005). Em alguns “betas”, foi possível perceber que o fígado apresentou vacúolos com 74 até 80 hpe, momento em que ocorreu a absorção total do vitelo, podendo ser este evento o responsável por esta vacuolização, uma vez que os peixes eram alimentados com nâuplios de *Artemia* sp., após a absorção do vitelo. Será este um processo fisiológico? Ou um processo degenerativo? Pois, com 86 hpe, o fígado encontrava-se com aparência normal, portanto mais investigações são necessárias para tais observações.

O fígado produz a bile, a qual é coletada pelos ductos biliares e armazenada temporariamente na vesícula biliar. Esta estrutura é um saco contrátil com parede delgada (ROTTA, 2003), podendo em peixes ser esférica, oval ou alongada (GODINHO, 1970). Em “beta” esta vesícula encontrou-se revestida por epitélio pavimentoso simples apresentando forma esférica. Vicentini *et al.*, (2005) encontraram esta mesma forma de vesícula biliar em *Oreochromis niloticus*.

Outra glândula importante para digestão é o pâncreas. De acordo com Lemmes e Braccini (2004) este órgão é encontrado em todos os vertebrados e produz dois grupos de substâncias, as enzimas digestivas liberadas no intestino médio, onde se tornam ativas e hormônios como a insulina e o glucagon, que regulam a concentração de açúcar no sangue. DIAZ *et al.*, (1999) descreveram o pâncreas como sendo uma glândula mista, com funções endócrinas e exócrinas, variando amplamente quanto ao desenvolvimento e localização anatômica, nos diferentes grupos de peixes. Bruslé e Anadon (1996) asseguram que o tecido pancreático em algumas espécies encontra-se difuso no fígado, sendo chamado de pâncreas intrahepático. Em *B. splendens*, esta difusão intrahepática não ocorreu, sendo que o pâncreas está localizado dentro da cavidade celomática entre o estômago, fígado e intestino.

Neste estudo, o pronefro estava presente desde a eclosão das larvas e, de acordo com Kimmel *et al.*, (1995), esta estrutura desenvolve-se na fase inicial da somitogênese, diferenciando-se em mesonefro somente nos indivíduos juvenis/adultos (DRUMMOND *et al.*, 1999).

Em relação ao intestino médio e posterior, em *B. splendens* pode ser observado pregas longas que se projetavam em direção à luz revestida por epitélio simples colunar com orla em escova e, apresentavam também células caliciformes. Santos *et al.*, (2007)

também encontraram este epitélio de revestimento no intestino de *Pimelodus maculatus*. Segundo González *et al.*, (2002), a presença de pregas no intestino, indica aumento na eficiência da digestão e absorção dos alimentos. Seixas-Filho *et al.*, (2000) sugeriram que pregas transversais na mucosa retardam a passagem de alimento, possibilitando maior período digestivo e melhor aproveitamento dos nutrientes no intestino médio.

A vesícula gasosa em *B. splendens* encontrou-se inflada por completo com 40 hpe. De acordo com Hidelbrand (1995), este órgão possui variadas funções como recepção de sons e pressão, e até mesmo a produção de sons por meio do controle da passagem de ar entre a vesícula e o intestino anterior (esôfago), no caso de peixes fisóstomos. Ademais, a localização da vesícula gasosa, na parte dorsal do corpo, acima do centro de gravidade do peixe, permite a manutenção da postura sem depender de esforço muscular. Segundo Blaxter (1986), muitas larvas de peixes enchem a vesícula momentos após a eclosão devido à ingestão de ar da superfície.

Na maioria das espécies de peixes, as larvas apresentam trato digestório simples e indiferenciado, desenvolvendo, a seguir, os órgãos digestórios (GOVONI *et al.*, 1986). De fato, o *B. splendens*, no momento da eclosão apresentava um tubo digestório rudimentar, enquanto no momento da absorção total do saco vitelínico o trato digestório pode ser dividido em intestinos cefálico, anterior, médio e posterior, segundo classificação adotada por Bértin (1958). Desta forma, O'CONNELL (1981) registrou que a exaustão completa do vitelo deve ocorrer quando a larva está apta para a alimentação exógena, refletindo a concomitância funcional do trato digestório.

O trato digestório de *B. splendens* estava totalmente formado com 74 hpe e seguiu um padrão similar a outras espécies de peixes teleósteos de água tropical. Ocorrendo diferenciação simultânea de estruturas que permitem a captura de alimentos logo no início

do desenvolvimento, antes da exaustão das reservas energéticas endógenas, e também asseguram a fuga de predadores, aumentando as chances de sobrevivência durante a fase larval.

Estas informações sobre ontogenia do trato digestório do “beta” são inéditas e imprescindíveis para aquicultura ornamental, que no momento está em expansão em caráter mundial, podendo contribuir para um melhor desempenho e produção em cativeiro.

## 5. CONCLUSÕES

Após a análise dos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que em *Betta splendens*:

✓ As larvas eclodem com o trato digestório incompleto, com a boca e ânus fechados.

✓ Os animais eclodiram com 28 horas pós-fertilização e apresentaram reserva endógena até 68 hpe, ou seja, a larva se nutre dessa reserva até 3 dias pós-eclosão, sendo necessária a utilização de alimentação exógena após este período.

✓ Com 74 hpe, esôfago, estômago, intestino, fígado, vesícula biliar e pâncreas estão totalmente diferenciados e funcionais.

✓ O desenvolvimento de estruturas natatórias e alimentares ocorreu concomitantemente, fornecendo aos peixes um conjunto de caracteres morfológicos favorável à predação para obtenção de sua própria alimentação.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considera-se necessário ressaltar que por ser este um trabalho essencialmente descritivo, não foram testadas hipóteses, contudo, informações importantes sobre o trato digestório aqui descrito poderão ser aplicadas em pesquisas posteriores envolvendo o desenvolvimento de dietas balanceadas. Pois, o conhecimento morfofuncional do trato digestório dos peixes tem grande importância para a formulação e elaboração de dietas que

atendam às exigências desta espécie de peixe, levado em consideração o hábito alimentar e suas particularidades, buscando melhorias no desempenho produtivo e saúde dos animais.

A larva com aproximadamente 68 hpe, ainda apresentava vitelo, porém é necessário iniciar a alimentação exógena, podendo melhorar as taxas de sobrevivência nesta espécie, pois uma alimentação fornecida antes deste tempo pode comprometer a qualidade de água dos aquários e, se oferecida tardiamente pode causar mortalidade das larvas.

## **7. AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem ao Professor Dr. João Batista Kochenborger Fernandes pelo fornecimento do material biológico e espaço físico, assim como o auxiliar agropecuário do Laboratório de Peixes Ornamentais do Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP) Valdecir Fernandes de Lima, pelo auxílio, ao Sr. Orandi Mateus, histotécnico do Laboratório de Histologia e Embriologia, à Claudia Aparecida Rodrigues e Claudia Regina Sanches Ribeirinho do Laboratório de Microscopia Eletrônica, da FCAV/UNESP pela colaboração no processamento do material e, ao CNPq pela Bolsa de Mestrado (131977/2011-3).



## 8. REFERÊNCIAS

- AL-HUSSAINI, A. H. The feeding habits and guts of teleosts especially of the Northern Red Sea. *Revue de la Faculté des Sciences de l'Université d'Istanbul*, v.17B, p.121-129, 1952.
- AMARAL, A. A. Anatomia comparativa do aparelho digestório de *Acestrorhynchus britskii* Menezes, 1969 e *Acestrorhynchus lacustris* Reinhardt, 1874 (Pisces, Characidae, Acestrorhynchidae). *Revista Ceres*, v.37, n. 212, p. 277-288, 1990.
- APPELBAUM, S.; RIEHL, R. Scanning electron microscopic observations of the chemo and mechanoreceptors of carp larvae (*Cyprinus carpio*) and their relationship to early behavior. *Aquatic Living Resources*, v.10, p.1-12, 1997.
- BAGLOLE, C.J., MURRAY, H.M., GOFF, G.P., WRIGHT, G.M.. Ontogeny of the digestive tract during larval development of yellowtail flounder: a light microscopic and mucous histochemical study. *Journal of Fish Biology*, v.51, p. 120–134, 1997.
- BÉRTIN, L. Appareil digestif. In: GRASSÉ, P. P. (Ed.) *Traité de zoologie, anatomie, systématique, biologie*. Paris: Masson, v.13, p. 1249-1301, 1958.
- BIALETZKI, A.; BAUMGARTNER, G.; SANCHES, P.V.; GALUCH, A.V.; LUVISUTO, M. A.; NAKATANI, K.; CAVICCHIOLI-MAKRAKIS, M.; BORGES, M.E.E. Caracterização do desenvolvimento inicial de *Auchenipterus osteomystax* (Osteichthyes, Auchenipteridae) da bacia do rio Paraná, Brasil. *Acta Scientiarum*. Maringá, v. 23, n. 2, p. 377-382, 2001.
- BLAXTER, J.H.S. Development of sense organs and behavior of teleost larvae with special reference to feeding and predator avoidance. *Transactions of the American Fisheries Society* 115, p. 98-114, 1986.
- BRUSLÉ, J.; ANADON, G.G. *The structure and function of fish liver*. In: Munshi, J. S.D.; Dutta, H. M. (Ed.). *Fish Morphology horizon of new research*. Lebanon: Science Publishers Inc., p.77 – 93, 1996.
- CARVALHO, P.S.M., NOLTIE, D.B and TILLIT, D.E. Biochemical, histological and behavioural aspects of visual function during early development of rainbow trout. *Journal of Fish Biology*, v.64, p.833-850, 2004.
- CHEN, B. N.; QIN, J. G.; KUMAR, M. S.; HUTCHINSON, W.; CLARKE, S. Ontogenetic development of the digestive system in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* larvae. *Aquaculture*, v. 256, p. 489–501, 2006.
- DÍAZ, A.O.; GONZÁLEZ CASTRO, M.; DEVINCENTI, C.V.; GOLDEMBERG, A. L. Morphological and histochemical characterisation of liver from stripped weakfish, *Cynoscion guatucupa*. *Biociências*, Porto Alegre, v. 7, n. 1, p. 67-78, 1999.

DIAZ, J.P., PRIÉ-GRANIÉ, M., KENTOURI, M., VARSAMOS, S. and CONNES, R. Development of the lateral line system in the sea bass. *Journal of Fish Biology*, v. 62, p. 24-40, 2003.

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, 1998.

FARIA, P. M. C.; CREPALDI, D. V.; TEIXEIRA, E. A.; RIBEIRO, L. P.; SOUZA, A. B.; CARVALHO, D. C.; MELO, D. C.; SALIBA, E. O. S. Criação, manejo e reprodução do peixe *Betta splendens*. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.30, p. 134-149, 2006.

FERREIRA, A.V.; VIDAL Jr., M.V.; ANDRADE, D.R.; YASUI, G.S.; MENDONÇA, P.P.; MATTOS, D.C. Consumo de vitelo durante o desenvolvimento embrionário de melanotênia-maçã, *Glossolepis incisus*, WEBER 1907 (*Melanotaeniidae*). *Ciência Animal Brasileira*, v.10, n. 3, p. 721-729, 2009.

GALVÃO, M. S. N.; N. FENERICH-VERANI.; N. YAMANAKA; I. R. OLIVEIRA. Histologia do sistema digestivo da tainha *Mugil platanus* GÜNTHER 1880 (Osteichthyes, Mugilidae) durante as fases larval e juvenil. *Boletim do Instituto de Pesca*, 24, p. 91 – 100, 1997.

GODINHO, H.M. Considerações gerais sobre anatomia de peixes. In: Poluição e piscicultura. São Paulo, Faculdade de Saúde Pública e Instituto de Pesca, CPRN – Secretaria da Agricultura, p.216, 1970.

GONZÁLES, O.R.M., FLORES, J.C.B., DOMÍNGUEZ, B.M.P. and VALLE, M.R.G. Descripción histológica del sistema digestivo em larvas de *Chirostoma humboldtianum* em la primera alimentación exógena. *I Congresso Iberoamericano Virtual de Acuicultura*. Civa 2002. (<http://www.civa2002.org>), p. 313-322, 2002.

GOVONI, J.J., BOEHLER, G.W.; WATANABE, Y. The physiology of digestion in fish larvae. *Environmental Biology of Fishes*, v. 16, n. 1-3, p. 59-77. 1986.

HALPERIN, J.R.P.; DUNHAM, D. W.; YE, S. Social isolation increases social display after priming in *Betta splendens* but decreases aggressive readiness. *Behavioural Processes*, Toronto, v.28, n.1/2, p.13-22. 1992.

HANSEN, A.; REUTTER, K.; ZEISKE, E. Taste bud development in the Zebrafish, *Danio rerio*. *Development Dynamics*, v. 223, 483 – 496, 2002.

HIDELBRAND, M. *Análise da estrutura dos vertebrados*. São Paulo: Atheneu, p.700, 1995.

HYATT, K.D. Feeding strategy. In: Hoar, W. S., Randall D. J. and Brett, JR (Eds). *Fish Physiology*. New York, Academic Press, p. 71-119, 1979.

KAPOOR, B. G.; H. SMIT; I. A. VERIGHINA. The alimentary canal and digestion in teleosts. *Advances in Marine Biology*, v.13, p. 109-239, 1975.

KEAST, A. and D. WEBB. Mouth and body form relative to feeding ecology in the fish fauna of a small lake, Lake Opinicon, Ontario. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, v.23, n.12, p.1845-1874, 1966.

KENDALL. JR. A. W., AHLSTROM, E. H., MOSER, H. G.. Early life stages of fishes and their characters. In: Mose, H. G., Richards, W. J., Cohen, D. M., Fahay, M. P., Kendall, Jr. A. W., Richardson, S. L. (Eds.). *Ontogeny and systematic of fishes*. Allen Press. Lawrence, KS, p. 11-22, 1984.

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

LEKNES, I.L. Histochemical studies on mucin-rich cells in the digestive tract of the Buenos Aires tetra (*Hyphessobrycon anisitsi*). *Acta Histochemica*, v.113, p. 353-357, 2011.

LEMES, A. S.; BRACCINI, M. C. Descrição e análise histológica das glândulas anexas do trato digestório de *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794), (TELEOSTEI, ERYTHRINIDAE). Biodiversidade Pampeana, PUCRS, *Uruguaiana*, v.2, p. 33-41, 28 de dezembro de 2004.

LIEM, K. F., BEMIS, W. E., WALKER, JR. W.F., GRANDE, L. *Functional anatomy of vertebrates*. An evolutionary perspective. 3 ed. Thomson Belmont, p.703, 2001.

MACIEL, C.M.R.R.; MACIEL Jr., A.; LANNA, E.A.T.; MENIN, E. Anatomia funcional da cavidade bucofaringeana de trairão, *Hoplias lacerdae* Miranda Ribeiro, 1908 (Characiformes, Erythrinidae). *Revista Biotemas*, v.22, n.3, p. 95-102, setembro de 2009.

MAI, K., YU, H., MA, H., DUAN, Q., GISBERT, E., ZAMBONINO INFANTE, J., CAHU, C. A histological study on the development of the digestive system of *Pseudosciaena crocea* larvae and juveniles. *Journal of Fish Biology*, v. 67, p. 1094–1106, 2005.

MATSUOKA, M. *Development of sense organs in the Japanese sardine Sardinops melanostictus*. Fisheries Science, v.67 p. 1036-1045, 2001.

MENIN, E. *Anátomo-histologia funcional comparativa do aparelho digestório de seis Teleostei (Pisces) de água doce*. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Brasil, p.557, 1988.

MENIN, E. e MIMURA, O. M.. Anatomia funcional da cavidade bucofaringeana de *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1974) (Characiformes, Erythrinidae). *Revista Ceres*, v.38, n.217, p. 240-255, 1991.

MICALE, V.; GARAFFO, M.; GENOVESE, L.; SPEDICATO, M.T.; MUGLIA, U. The ontogeny of the alimentary tract during larval development in common pandora *Pagellus erythrinus* L. *Aquaculture*, v. 251, p.354– 365, 2006.

NAKATANI, K.; AGOSTINHO, A.A.; BAUMGARTNER, G.; BIALETZKI, A.; SANCHES, P.V.; CAVICCHIOLI, M. *Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação*. Maringá: EDUEM/Nupélia, p. 359, 2001.

NOAKES, D. L. G.; GODIN, J. G. J. Ontogeny of behaviour and concurrent developmental changes in sensory systems in teleost fishes. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. (Ed) *Fish Physiology*. New York: Academic Press, v.11-B, p. 345–395, 1988.

O'CONNELL, C. P. Development of systems in the Northern anchovy, *Engraulis mordax*, and others teleosts. *American Zoology*, U. S. A., v. 21, p. 429-446, 1981.

PAES, M.C.F.; MAKINO, L.C.; VASQUEZ, L.A.; FERNANDES, J.B.K.; NAKAGHI, L.S.O. Early development of *Astronotus ocellatus* under stereomicroscopy and scanning electron microscopy. *Zygote*, v.2, p. 269–276, 2011.

PAPADAKIS, I.E.; ZAISS, M.M.; KYRIAKOU, Y.; GEORGIU, G.; DIVANACH, P.; MYLONAS, C.C. Histological evaluation of the elimination of *Artemia* nauplii from larval rearing protocols on the digestive system ontogeny of shi drum (*Umbrina cirrosa* L.). *Aquaculture*, v. 286, p.45–52, 2009.

QU, M.; DING, S.; XU, X.; SHEN, M.; YOU, Y.; SU, Y. Ontogenetic development of the digestive system and growth in coral trout (*Plectropomus leopardus*). *Aquaculture*, v. 334-337, p.132–141, 2012.

RICKER, W.E. Methods for assessment of fish production in fresh waters. *Oxford: Blackwell Scientific Publications*, p. 313, 1968.

RODRIGUES, S. S. AND E. MENIN. Adaptações anatômicas da cavidade bucofaringeana de *Pseudoplatystoma corruscans* (Spix e Agassiz, 1829)(Siluriformes, Pimelodidae) em relação ao seu hábito alimentar. *Revista Ceres*, v.53, n.305, p. 135 – 146, 2006a.

RODRIGUES, S. S. AND E. MENIN. Anatomia da cavidade bucofaringeana de *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1817) (Pisces, Characidae, Salmininae). *Biotemas*, v. 19, n.1, p. 41-50, 2006b.

RODRIGUES, S. S.; NAVARRO, R. D.; MENIN, E. Anatomia do tubo digestivo de *Leporinus macrocephalus* Garavello & Britski, 1988 (Characiformes, Anostomidae). *Resumo expandido do III Congresso Iberoamericano Virtual de Acuicultura*, Zaragoza, Espanha, p. 333-342. Disponível em <http://www.civa2004.org>, 2004.

RODRIGUES, S. S.; OLIVEIRA, A. L. S.; MENIN, E. Anatomia funcional do tubo digestivo de *Conorhynchus conirostris* (Valenciennes, 1840) (Siluriformes, Pimelodidae). *Anais do 24º Congresso Brasileiro de Zoologia*, Itajaí, Brasil, p.293, 2002.

RODRIGUES, S. S.; R. D. NAVARRO; E. MENIN, 2008: Anatomia do tubo digestório de *Leporinus macrocephalus* Garavello & Britski, 1988 (Characiformes, Anostomidae) em relação ao seu hábito alimentar. *Bioscience Journal*, v. 24, n. 3, p. 86-95, 2008.

ROTTA, M. A. Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestivo dos peixes relacionados à piscicultura. Documentos 53 – EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. ISSN: 1517 – 1973, p. 48, 2003.

SANTIN, M.; BIALETZKI, A.; NAKATANI, K. Mudanças ontogênicas no trato digestório e dieta de *Apareiodon affinis*. *Acta Scientiarum*. Biological Sciences. Maringá, v.26, n. 3, p. 291-298, 2004.

SANTOS, C. M.; DUARTE, S.; SOUZA, T. G. L.; RIBEIRO, T. P.; SALES, A.; ARAÚJO, F. G. Histologia e caracterização histoquímica do tubo gastrointestinal de *Pimelodus maculatus* (Pimelodidae, Siluriformes) no reservatório de Funil, Rio de Janeiro, Brasil. *Iheringia, Série Zoologia*, Porto Alegre, v. 97, n. 4, p.411-417, 30 de dezembro de 2007.

SEIXAS-FILHO, J. T.; BRÁS, J. M.; GOMIDE, A. T. M.; OLIVEIRA, M. G. A.; DONZELE, J. L.; MENIN, E. Anatomia funcional e morfometria dos intestinos e dos cecos pilóricos do Teleostei (Pisces) de água doce *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849). *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v. 29, n. 2, p. 313-324, 2000.

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.

SILVA, N. B.; H. C. B. Gurgel; M. D. Santana. Histologia do sistema digestório de saguiri *Steindachnerina notonota* (Miranda Ribeiro, 1937) (Pisces, Curimatidae) do Rio Ceará Mirim, Rio Grande do Norte, Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca*, v.31, n.1, p.1-8, 2005.

TOLOSA, E.M.C.; RODRIGUES, C.J.; BEHMER, O.A.; FREITAS NETO, A.G. *Manual de técnicas para histologia normal e patológico*. 2ed. Barueri: Manole, p. 341, 2003.

VICENTINI, C. A.; I. B. FRANCHESCHINI; M. T. BOMBONATO; B. BERTOLUCCI; S. G. LIMA; A. S. SANTOS. Morphological study of the liver in the teleost *Oreochromis niloticus*. *Internatinal Jounal of Morphology*, v. 3, n. 3, p. 211 – 216, 2005.

YÚFERA, M., DARIAS, M.J. The onset of exogenous feeding in marine fish larvae. *Aquaculture*, v. 268, p.53–63, 2007.

ZAMBONINO-INFANTE, J.L., CAHU, C.L. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 130, p. 477–487, 2001.

ZAVALA-CAMIN, L. A. *Introdução ao estudo sobre alimentação natural de peixes*. Maringá. Ed. EDUEM, p.129, 1996.

**ARTIGO 2: Desenvolvimento Gonadal em *Betta splendens*: aspectos morfológicos.**

Será submetido: *The International Journal of developmental Biology* (Impact Factor 2,95).

**Resumo**

Dentre os fatores que determinam o sucesso da criação, o desenvolvimento normal das gônadas é imprescindível. Neste sentido, este trabalho descreve, pela primeira vez, o desenvolvimento gonadal de *B. splendens* por meio de técnicas de morfologia macro e microscópica. As larvas foram obtidas a partir de reprodução natural e mantidas sob cuidado parental do macho. Elas foram coletadas a partir da eclosão (tempo zero) e posteriormente a cada 2 horas até atingir 20 horas pós-eclosão (hpe), seguindo, a cada 4 horas até 44 hpe, depois a cada 6 horas até completar 92 hpe, após um intervalo de 9 dias, seguidos de coletas semanais até completar 118 dias de desenvolvimento pós-eclosão. Em cada tempo de coleta, 10 peixes foram anestesiados em solução de bezoncaína, pesados e fixados em formol 4% tamponado e também em Karnovsky modificado. A temperatura da água durante o experimento foi de  $28,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$  e o pH  $6,9 \pm 0,3$ . A eclosão ocorreu com 28 horas pós-fertilização e as larvas apresentaram em média  $2,32 \pm 0,23\text{mm}$  de comprimento total (CT),  $2,23 \pm 0,21\text{mm}$  de comprimento padrão (CP) e peso de  $215 \pm 49,93\mu\text{g}$ . Com quatro dias pós-eclosão (dpe) os peixes apresentaram gônadas indiferenciadas localizadas dentro da cavidade celomática. Com 13 dpe foi observado um aumento na quantidade de gônias preenchendo a gônada. Uma estreita cavidade surgiu ao longo do ovário com 20 dpe, quando a gônada mostrava morfologia de um ovário indiferenciado, contendo ninhos de ovogônias indiferenciadas, diferenciadas e células somáticas distribuídas ao redor dos ninhos. Com 76 dpe, os ovócitos em crescimento primário apresentavam poucos grânulos de vitelogenina em seu citoplasma e as células foliculares deram início à formação da teca. Ovários com ovócitos em crescimento primário, alvéolos corticais e núcleo centralizado com nucléolos perinucleolares foram visualizados com 111 dpe. Quando as fêmeas alcançaram 118 dpe, os ovários eram formados predominantemente por ovócitos em crescimento secundário ou vitelogênico. Os ovários são do tipo cistovariano e os ovócitos apresentaram desenvolvimento sincrônico. Fêmeas, quando alimentadas e manejadas adequadamente, podem reproduzir-se com quatro meses de idade. Estes resultados são importantes e servirão de base para aperfeiçoar a reprodução e a produção em cativeiro do *B. splendens*.

**Palavras-chave:** gônadas, peixe ornamental, desenvolvimento, histologia.



## Abstract

Among the factors that determine the success of rearing, the normal development of the gonads is essential. Therefore, this study describes for the first time, gonadal development of *B. splendens* by macro and microscopic morphology techniques. The larvae were obtained from natural reproduction and were kept under male parental care. They were collected starting from the hatching (time zero) and then every 2 hours until reach 20 hours post-hatching (hph), following every 4 hours to 44 hph, then every 6 hours up to complete 92 hph, after this period, after an interval of 9 days, followed by weekly collections until 118 days of post-hatching development. At each sampling time, 10 fish were anesthetized in a solution of bezoncaína, weighed and fixed in 4% buffered formaldehyde y and either in modified Karnovsky solution. The water temperature during the experimente was  $28,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$  and pH  $6,9 \pm 0,3$ . Hatching occurred at 28 hours post-fertilization and the larvae were on average  $2,32 \pm 0,23\text{mm}$  in total length (TL),  $2,23 \pm 0,21\text{mm}$  standard length (SL) and weight of  $215 \pm 49,93\text{g}$ . With four days post-hatching (dph), fish had undifferentiated gonads located within the coelomic cavity. At 13 dph, we observed an increase in the amount of gônias filling the gonad. A narrow cavity appeared along the ovary with 20 dph, when the gonad showed undifferentiated morphology of an ovary containing oogonia, nests of undifferentiated oogonia, differentiated somatic cells distributed around the nests. With 76 dph, oocytes in primary growth had few vitellogenin granules in their cytoplasm and follicular cells initiated the formation of teak. Oocytes in the ovaries with primary growth, cortical alveoli, central nuclei and nucleoli perinucleolares were visualized with 111 dph. When the females reached 118 dph, the ovaries were composed predominantly of secondary growth oocytes or vitellogenic ones. The ovaries are the ovarian cysts type and the oocytes presented sincronous developemnt. Females, when appropriately feed and managed, can breed with four months of age. The information from this study are importante and will contribute to the improvement of the hatchery, breeding and rearing of captive *Betta splendens*.

**Keywords:** gonads, ornamental fish, development, histology.



## 1. INTRODUÇÃO

O *B. splendens* é um peixe ornamental muito importante para a aquicultura mundial, porém, é imprescindível a adequada compreensão da biologia da espécie para o sucesso da criação (ROTTA, 2003). Um dos fatores que garantem o sucesso reprodutivo dos animais sexualmente adultos de qualquer espécie é o desenvolvimento normal das gônadas (DEVLIN e NAGAHAMA, 2002).

As condições de cultivo afetam fortemente o desenvolvimento gonadal, principalmente durante a fase de vitelogênese, de modo que, uma limitação na qualidade ou quantidade do alimento, densidade de estocagem excessiva e o estresse, podem induzir a reabsorção de ovócitos vitelogênicos, resultando num menor número de ovócitos maduros, ou ainda, podem atuar numa fase anterior, impedindo o início da vitelogênese (HARVEY e CAROLSFELD, 1993), impossibilitando a ocorrência de desovas.

Santos *et al.* (2009) verificaram o tempo de rematuração em fêmeas de *Betta splendens* quando submetidas a dietas com diferentes níveis proteicos, porém pouco se conhece sobre a maturação gonadal nesta espécie.

O conhecimento do desenvolvimento ovocitário de *Betta splendens* é de grande importância, pois permite estabelecer o período reprodutivo, sua duração e quais eventos estão envolvidos durante a maturação ovocitária.

Constatando que na literatura não há trabalhos científicos, até o momento, com desenvolvimento gonadal de *Betta splendens*, assim, esta pesquisa teve por objetivo acompanhar e registrar o desenvolvimento gonadal desta espécie durante seu desenvolvimento até a formação total das gônadas.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Manejo reprodutivo**

O experimento foi realizado no Laboratório de Peixes Ornamentais do Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), Campus de Jaboticabal-SP, Brasil no período de Abril a Julho de 2001. Machos e fêmeas reprodutores de *Betta splendens* (variedade véu) foram selecionados e mantidos em aquários individualizados de 2 litros dentro de um sistema de recirculação de água composto por dez caixas de polietileno, durante dez dias para aclimação. Após esse período, as fêmeas foram acondicionadas em recipientes plásticos transparentes perfurados e introduzidas nos aquários dos machos por um dia, permitindo assim, a troca de água e ferormônios entre os recipientes, estimulando os animais ao comportamento de corte e à construção ou aumento dos ninhos de bolhas sob um substrato plástico. Passado um dia, as fêmeas foram soltas no aquário dos machos para o acasalamento, onde permaneceram durante três dias. Durante este período, ocorreram observações constantes para que fosse registrado o momento da desova. As fêmeas, então, eram retiradas e devolvidas aos seus aquários de origem. Se houvesse desova o macho era mantido no aquário juntamente com os ovos para o cuidado parental.

### **2.2 Coletas amostrais**

Os peixes foram coletadas no momento da eclosão (tempo zero), e posteriormente a cada 2 horas até atingir 20 horas pós-eclosão (hpe), seguindo a cada 4 horas até completar 2 dias pós-eclosão (dpe), a cada 6 horas até perfazer 4 dpe, depois disso, com um intervalo de 9 dias pós-eclosão, seguidos de coletas semanais até totalizar 118 dpe, sendo coletados 10 peixes por tempo de amostragem.

Os animais foram anestesiados e depois eutanasiados por prolongamento do plano anestésico, pesados e, posteriormente, fixados em solução de Formaldeído 4% com tampão

fosfato 0,1M, pH7,4 e, em solução de Karnovsky modificado (contendo aldeído glutárico a 2,5% e paraformaldeído a 1,0%, com tampão cacodilato 1,0M, pH7,2) e ambas amostras foram armazenadas sob baixas temperaturas (-4°C) para análise em microscopia e mensuração de comprimentos com auxílio de estereomicroscópio. Os peixes foram mantidos em água com temperatura de  $28,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$  durante todo o período experimental.

### **2.3 Análise estereomicroscópica e morfometria**

As análises morfológicas externas das larvas foram realizadas em estereomicroscópio LEICA MZ 8, acoplado à câmera digital LEICA DFC 280 utilizando-se o programa IM 50-LEICA. Foram realizadas medidas do comprimento total (CT) que se obtém através da distância entre a ponta do focinho e a extremidade da última vértebra caudal e de comprimento padrão (CP) sendo obtido pela distância da extremidade mais anterior do focinho à base dos raios medianos da nadadeira caudal, em linha reta, conforme RICKER (1968).

### **2.4 Processamento das amostras e análise em microscopia de luz (ML)**

Para análise em microscopia de luz, os peixes fixados em solução de formol a 4% tamponado foram incluídos em histosec® (Merck), enquanto que, os peixes fixados em solução de Karnovsky modificado tamponado foram incluídos em historesina Leica até o processamento.

#### **2.4.1 Inclusão em Historec®**

O material previamente fixado em formol 4% tamponado foi lavado em tampão fosfato 0,1M, em seguida, desidratados em uma bateria de concentração crescente de etanol, sendo 70%, 80%, 90%, 95%, e, etanol absoluto I, II e III, diafanizado em xilol I, II e III e, finalmente, incluídas em histosec® (Merck). Foram realizados cortes com 5 µm de

espessura e corados com Hematoxilina-Eosina (TOLOSA *et al.*, 2003). Para a fotodocumentação os corte foram fotomicrografados em fotomicroscópio (Leica DM 2500).

#### **2.4.2 Inclusão em Histeresina**

As amostras fixadas em solução de Karnovsky modificado tamponado foram lavadas em tampão fosfato 0,1M, desidratadas por 24 horas em solução de etanol 80% e realizadas lavagens com duração de 30 minutos cada em etanol 90%, 95% e 100%. Permaneceram, posteriormente, 4 horas na solução de pré-infiltração GMA (glicolmetacrilato) com etanol de concentração de 100%, na proporção 1:1, em seguida, foram submetidas por 16 horas na etapa de infiltração (somente GMA) e então, foram incluídas em GMA com solução endurecedora nos histomoldes. As amostras foram levadas para estufa a 50°C, permanecendo por no mínimo 24 horas para polimerização. Os cortes foram obtidos em micrótomo LEICA RM2255 com 2 µm de espessura, utilizando-se navalha de tungstênio e corados com Hematoxilina-Floxina (TOLOSA *et al.*, 2003). A análise das lâminas e fotodocumentação ocorreram em fotomicroscópio Leica DM 2500 utilizando o software Leica Application Suite (LAS).

Alguns ovários foram fotografados com câmera digital *Canon SX120IS* para mostrar a morfologia externa das gônadas femininas que, posteriormente foram processadas em histologia.

#### **2.5 Processamento das amostras e análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

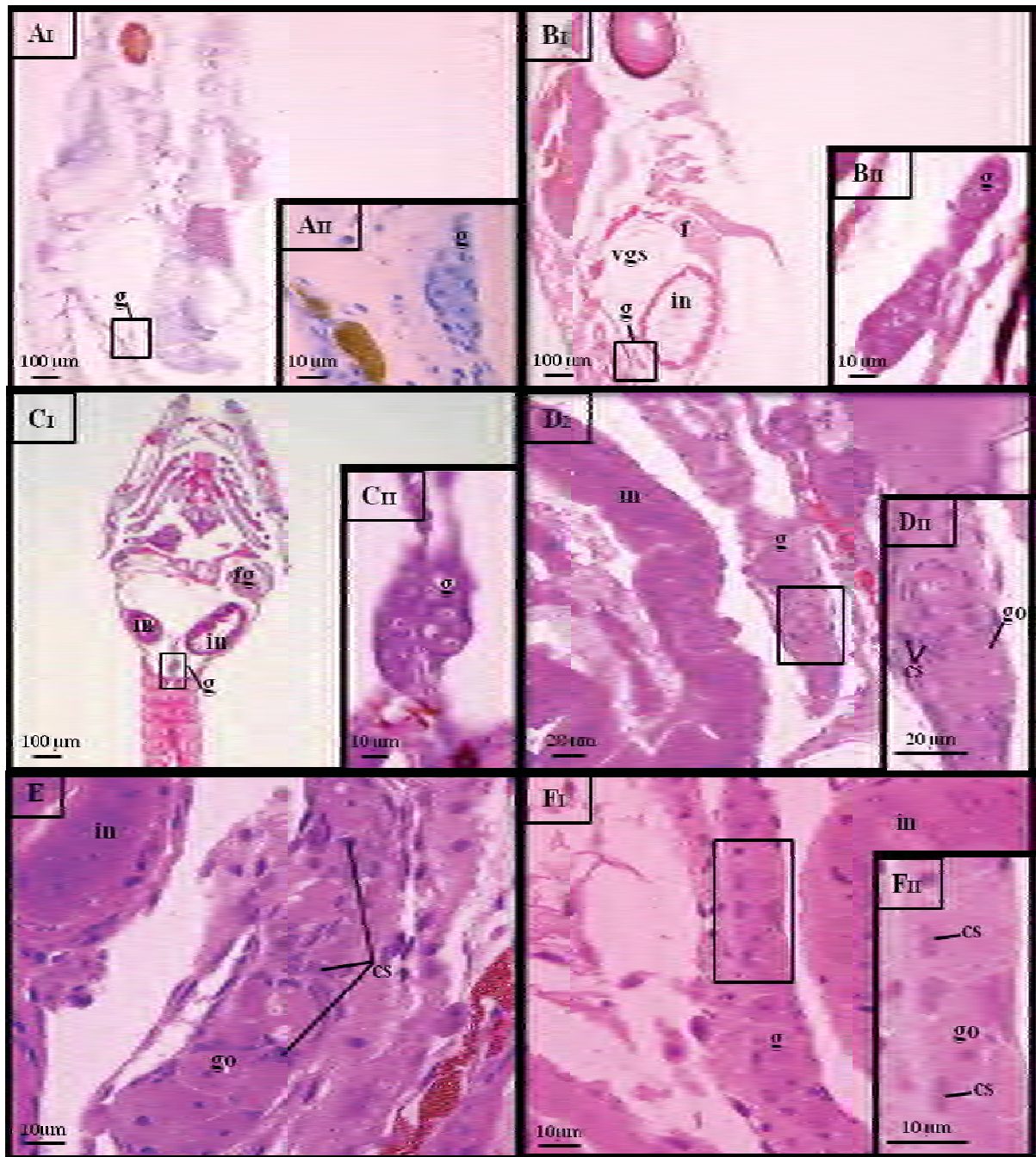
Para complementação das análises referentes às características morfológicas externas das larvas, os animais fixados em Karnovsky modificado tamponado, foram transferidos para solução tampão cacodilato de sódio, posteriormente pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio a 1% por duas horas, lavadas novamente em tampão e submetidas à desidratação em bateria crescente de concentração de etanol (30%, 50%,

70%, 80%, 90% 95% e três banhos de 10 minutos cada em etanol 100%), em seguida as amostras foram secas em secador de ponto crítico com CO<sub>2</sub> líquido em aparelho BAL-TEC, montadas em suporte de cobre, metalizadas com ouro e eletronicografadas em microscópio eletrônico de varredura (JEOL-JSM 5410).

### 3. RESULTADOS

Nos peixes com até três dias pós-eclosão (dpe) não foram visualizados vestígios gonadais, porém, com quatro dpe apresentaram gônadas indiferenciadas que estiveram localizadas dentro da cavidade celomática. Neste período, foi observado que alguns animais apresentaram inicialmente uma estrutura simples e compacta, denominada primórdio gonadal, contendo células germinativas primordiais, podendo ser visualizadas em cortes longitudinal e sagital (**Figuras AI, AII, BI, BII e CI e CII**), e em outros peixes, as gônadas apresentaram algumas células germinativas primordiais que, por sua vez, eram envoltas por várias células somáticas (**Figuras DI e DII**).

Já com 13 dpe as gônadas apresentaram-se mais desenvolvidas, notando-se um visível aumento na quantidade de gônias preenchendo toda a gônada e estas gônias estavam envoltas por células somáticas que se mostraram de várias formas, exibindo-se de forma pavimentosa, fusiforme ou triangular (**Figuras E, FI e FII**). Morfologicamente não foi possível distinguir gônada feminina de gônada masculina, neste tempo de desenvolvimento.



**Figura 1:** Fotomicrografias de gônadas indiferenciadas de larvas *B. splendens*. Coloração HE. (A, B, C, D: peixes com 4 dpe; E, F peixes com 13 dpe). **AI, AII, BI e BII:** Corte longitudinal: primórdio gonadal dorsalmente ao trato intestinal. **CI e CII:** Corte sagital: gônadas aos pares. **DI:** Gônada compacta. **DII:** Em detalhe, gônias e células foliculares. **E:** Células foliculares com formato pavimentoso. **FI:** Células foliculares apresentando formato triangular. **FII:** Em detalhe, células somáticas e ovogônias. **Legenda:** gônada (g); gônias (go); fígado (f); vesícula gasosa (vgs); intestino (in) e células somáticas (cs).

Com 20 dpe a gônada apresentava morfologia de um ovário indiferenciado, notando-se o surgimento de uma estreita cavidade ao longo deste ovário (**Figura 2A**), o qual continha ninhos de ovogônias indiferenciadas, diferenciadas e células somáticas distribuídas ao redor dos ninhos e dispersas na gônada (**Figura 2B**). Foi observado um notável aumento do volume dos ovários em um período de 34 a 48 dpe, sendo que neste período os ovários mostraram-se diferenciados (**Figuras 2C e 2D**). Estes eram envolvidos por uma camada de tecido conjuntivo denso, a túnica albugínea (**Figura 2E**). Inicialmente a cavidade ovariana se estendeu por todo ovário até o pedúnculo e, através deste, a gônada conectou-se ao mesentério (**Figura 2F**).

Com o decorrer do desenvolvimento, os ovários apresentaram lamelas ovígeras que sustentavam os ovócitos em crescimento primário e as ovogônias. Entre as lamelas havia um espaço, denominado espaço interlamelar. Também foram observados ninhos de ovogônias próximo ao epitélio germinativo (**Figura 2G**).

Com 76 dpe, os ovócitos em crescimento primário ou pré-vitelogênicos apresentavam núcleo em posição central com nucléolos perinucleolares, poucos grânulos de vitelo em seu citoplasma e as células foliculares deram início à formação da teca (**Figura 2H e 2I**).

Com 90 dpe, as fêmeas de *Betta splendens* apresentaram um par de ovários do tipo cistovariano, localizados na cavidade celomática. (**Figura 3A**). E, quando maduros, ocupavam grande parte desta cavidade, estendendo-se ventralmente ao rim e dorsalmente ao intestino.

Com 111 dpe os ovários continham ovócitos em crescimento primário, os quais apresentavam alvéolos corticais e núcleo centralizado. O citoplasma mostrou-se mais basófilo que o núcleo, devido à grande quantidade de vitelogenina (**Figura 3B, 3C e 3D**).

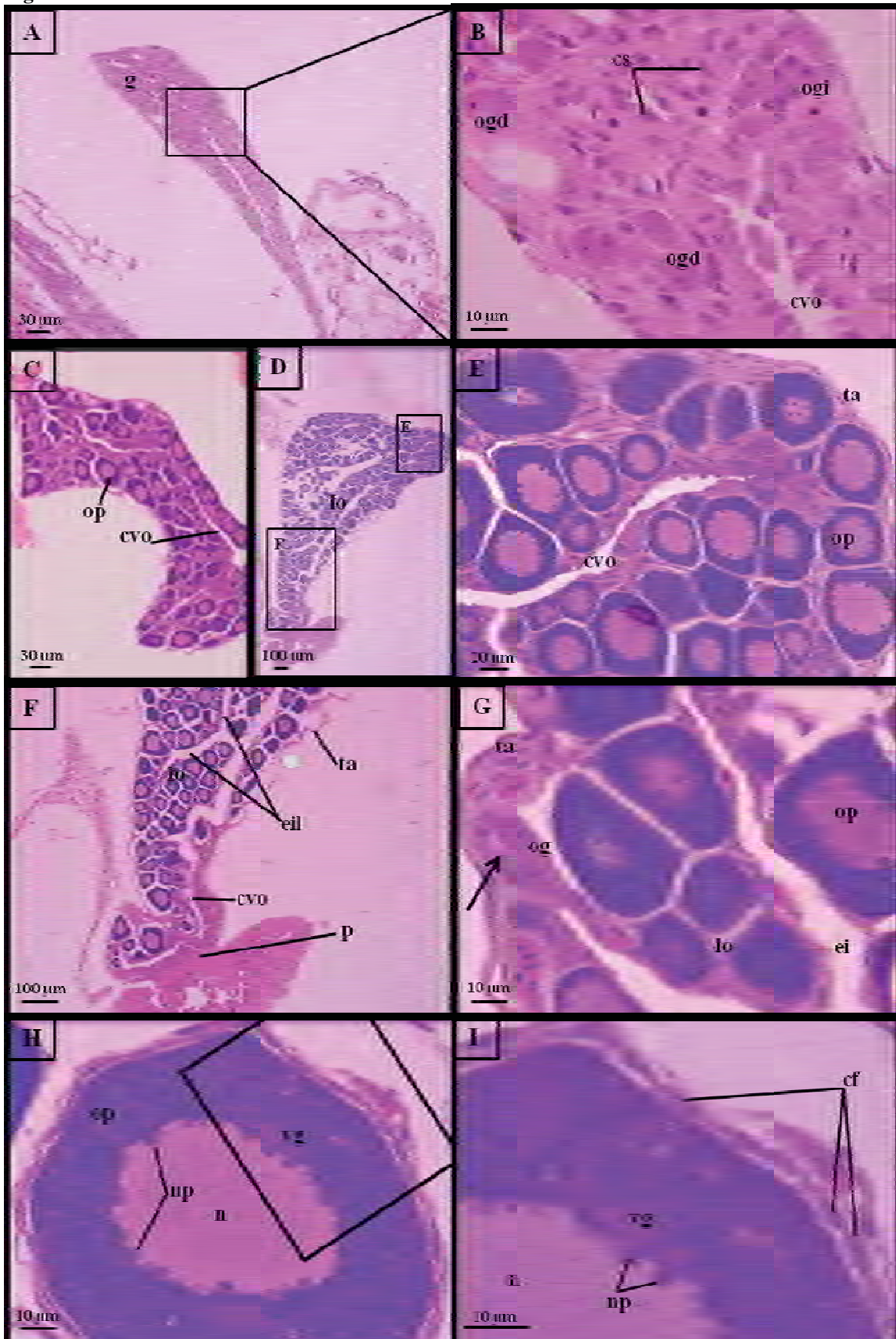


Quando as fêmeas alcançaram 118 dpe, os ovários eram formados predominantemente por ovócitos em crescimento secundário ou vitelogênico. Por todo o citoplasma, pode-se notar grânulos de vitelo, que são quase sempre esféricos, porém de tamanhos variados (**Figura 3H**). A vesícula germinativa se deslocou em sentido centro-periferia, não apresentando contornos nítidos. Gotículas de lipídios puderam ser vistas na região mais interna do citoplasma, próxima à vesícula germinativa. Os alvéolos corticais, dispostos em várias camadas, localizaram-se predominantemente na periferia dos ovócitos variados (**Figura 3F**). Em alguns ovócitos em crescimento secundário foram notadas reentrâncias da zona radiata em direção ao ovócito (**Figuras 3F e 3H**). Em outros ovócitos de menor tamanho a zona radiata apresentou-se totalmente irregular (**Figura 3J e 3K**).



**Figura 2:** Fotomicrografias de ovário de *B. splendens*. **A e B:** 20 dpe, cavidade na região central da gônada, ovogônias indiferenciadas e diferenciadas. **C, D, E e F:** 34 dpe, ovócitos em crescimento primário, lamelas ovíferas, espaço interlamelar, túnica albugínea e cavidade ovariana. **G:** 41 dpe, ninhos de ovogônias próximos ao epitélio germinativo (seta). **H e I:** 76 dpe, ovócitos em crescimento primário, núcleo com nucléolos perinucleolares, grânulos de vitelogenina e células foliculares. **Legenda:** gônada (g); ovogônia (og); ovogônia indiferenciada (ogi); ovogônia diferenciada (ogd); cavidade ovariana (cvo); células somáticas (cs); ovócito em crescimento primário (op); lamela ovífera (lo); túnica albugínea (ta); espaço interlamelar (ei); vitelogenina (vg); núcleo (n); nucléolos perinucleolares (np) e células foliculares (cf).

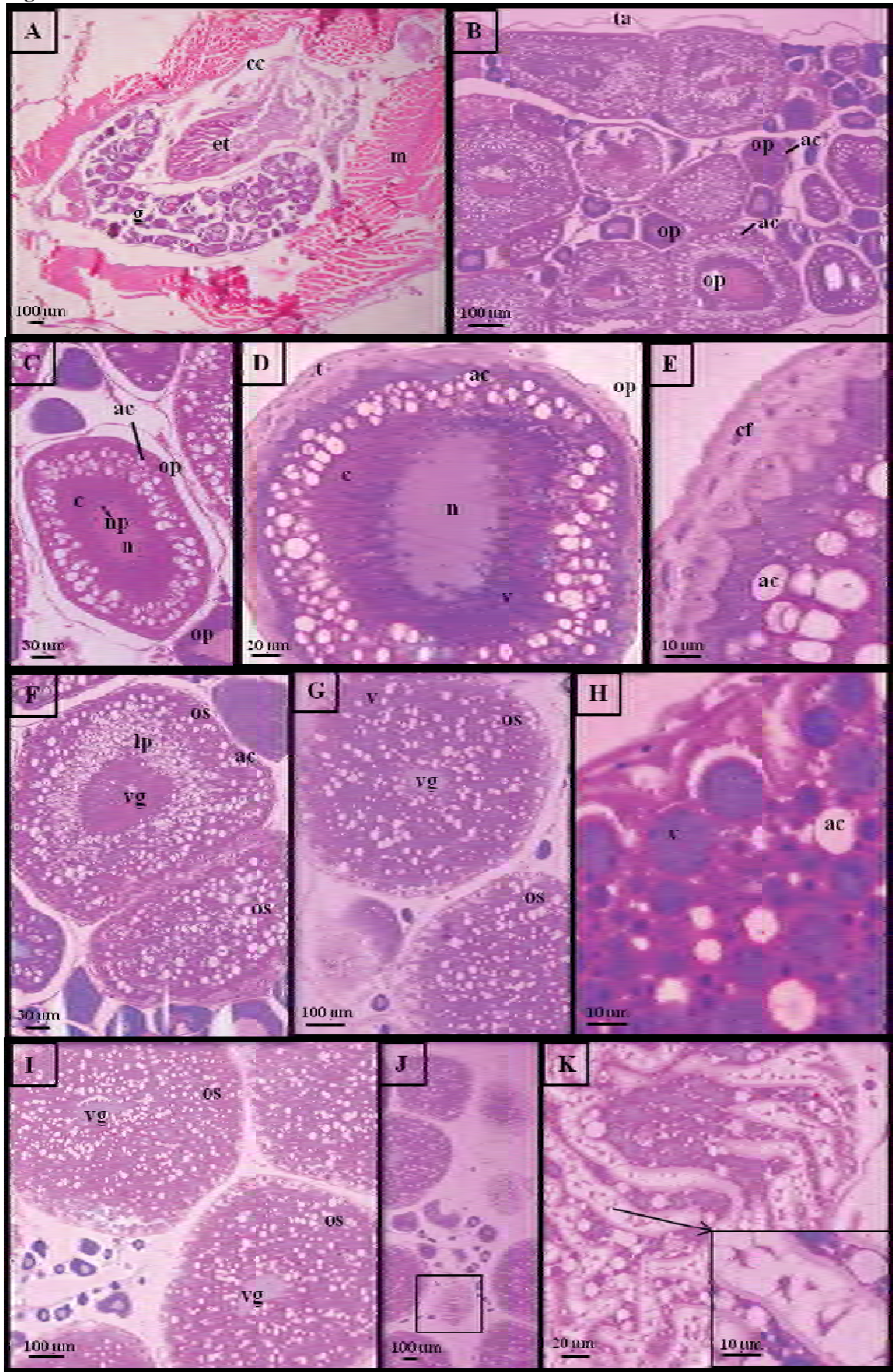
Figura 2



**Figura 3:** Fotomicrografias de ovário de *B. splendens*. **A:** 90 dpe, cavidade celomática preenchida pelo ovário. Observar ovócitos em crescimento primário. **B e C:** 111 dpe, ovócitos em crescimento primário com alvéolos corticais e nucléolos. **D:** 118 dpe, ovócito em crescimento primário, citoplasma com grânulos de vitelogenina e sem nucléolos evidentes **E:** 118 dpe, em detalhe, células foliculares hipertróficas. **F:** 118 dpe, ovócito em crescimento secundário, vesícula germinativa circundada por lipídios. **G:** 118 dpe, grânulos de vitelogenina. **H:** Grânulos de vitelogenina com formato esférico e alvéolos corticais. **I:** ovócito em crescimento secundário com vesícula germinativa migrando em direção à periferia. **J:** ovócito apresentando reentrâncias e sulcos **K:** Sulcos no ovócito. **Legenda:** gônada (g); estômago (et); cavidade celomática (cc); túnica albugínea (ta); ovócito em crescimento primário (op); alvéolos corticais (ac); nucléolos perinucleolares (np); núcleo (n); teca (t); citoplasma (c); células foliculares (cf); ovócito em crescimento secundário (os); lipídios (lp); vesícula germinativa (vg) e vitelogenina (v).

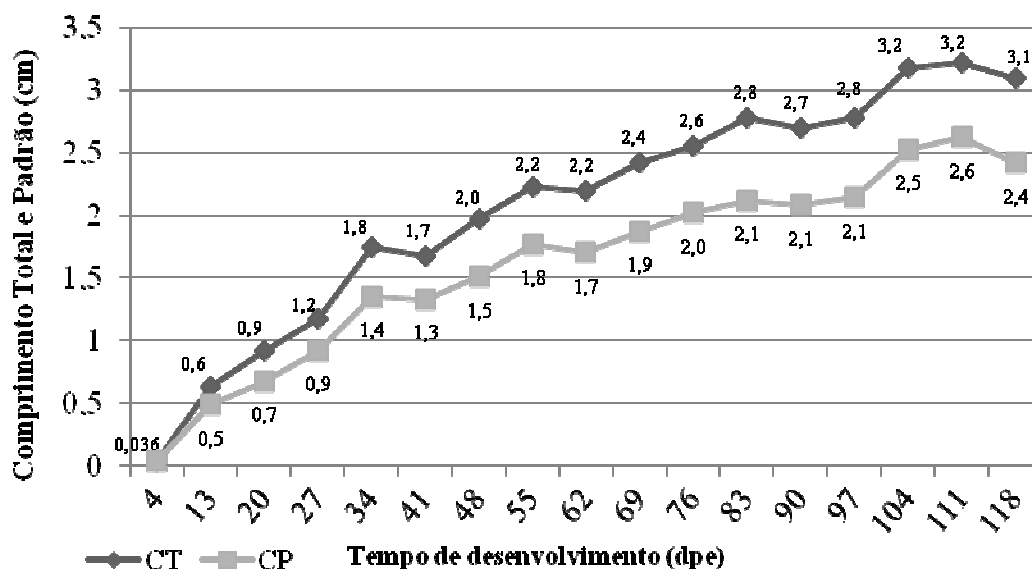


Figura 3



No momento em que foi observado o primórdio gonadal, os animais apresentaram em média 0,36cm de comprimento total e padrão e pesavam em média 36,0mg, e ao atingirem 20 dpe o comprimento total e padrão mantiveram um aumento linear (**Figura 4**). Porém, o ganho de peso teve um aumento considerável (**Figura 5**). Os peixes com 104 dpe começaram a perder peso passando de 574,40 para 397,95mg quando atingiram os 118 dpe, conforme demonstrado na figura 5.

Os ovários aos pares de *B. splendens* geralmente eram de tamanhos iguais, apresentaram forma alongada, contendo um oviduto que desembocava na papila urogenital, localizada posteriormente ao ânus. Os ovários estavam presos à cavidade celomática pelo tecido conjuntivo frouxo, o mesentério. O tamanho, coloração e vascularização variavam de acordo com o estágio de desenvolvimento, que quando maduros mostraram-se altamente vascularizados, com cor amarelada e cranialmente fundiram-se entre si (**Figuras 6 e 7**). Também pode-se notar que o acúmulo de gordura visceral diminuiu, conforme o desenvolvimento gonadal progredia (**Figura 6**).



**Figura 4:** Média de comprimento total (CT) e padrão (CP) em centímetros (cm) de *Betta splendens*.

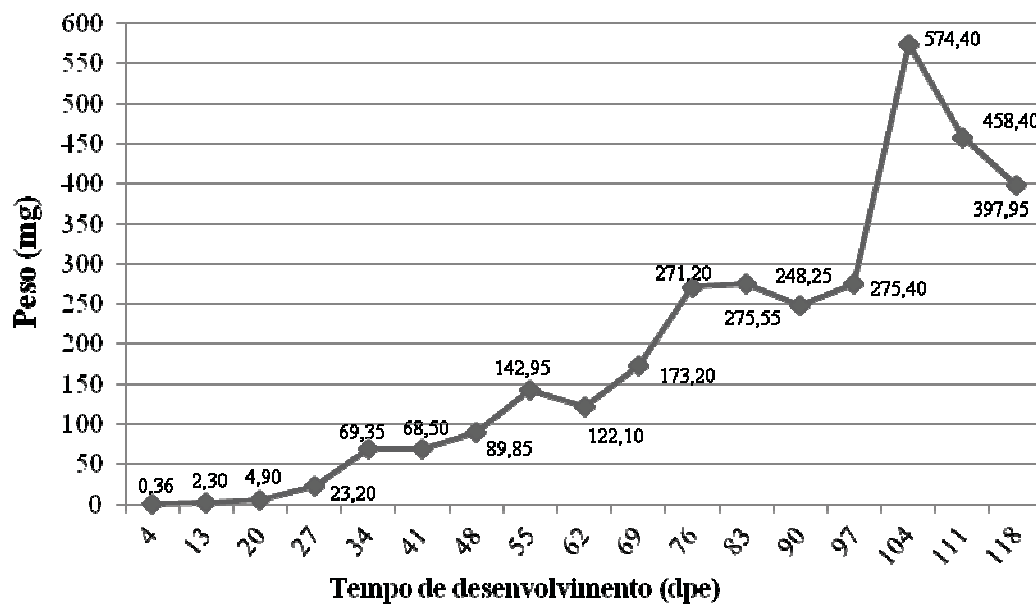


Figura 5: Média de peso em miligramas (mg) de *Betta splendens*.

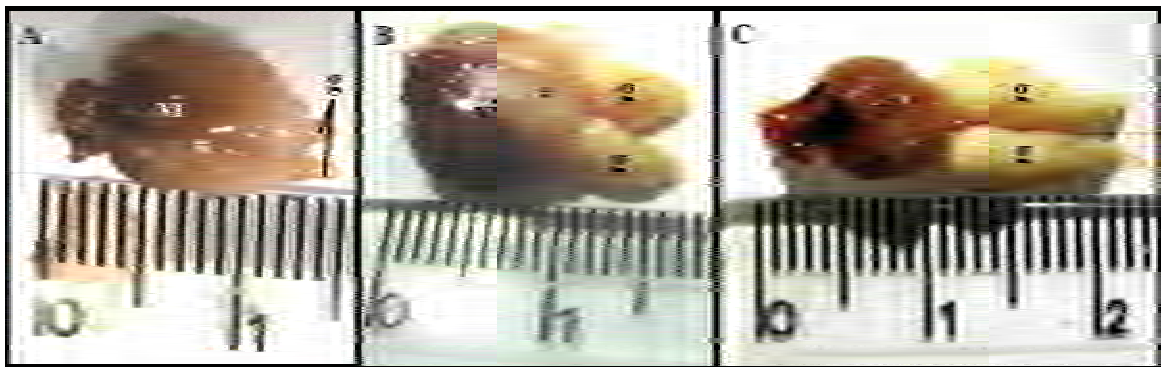
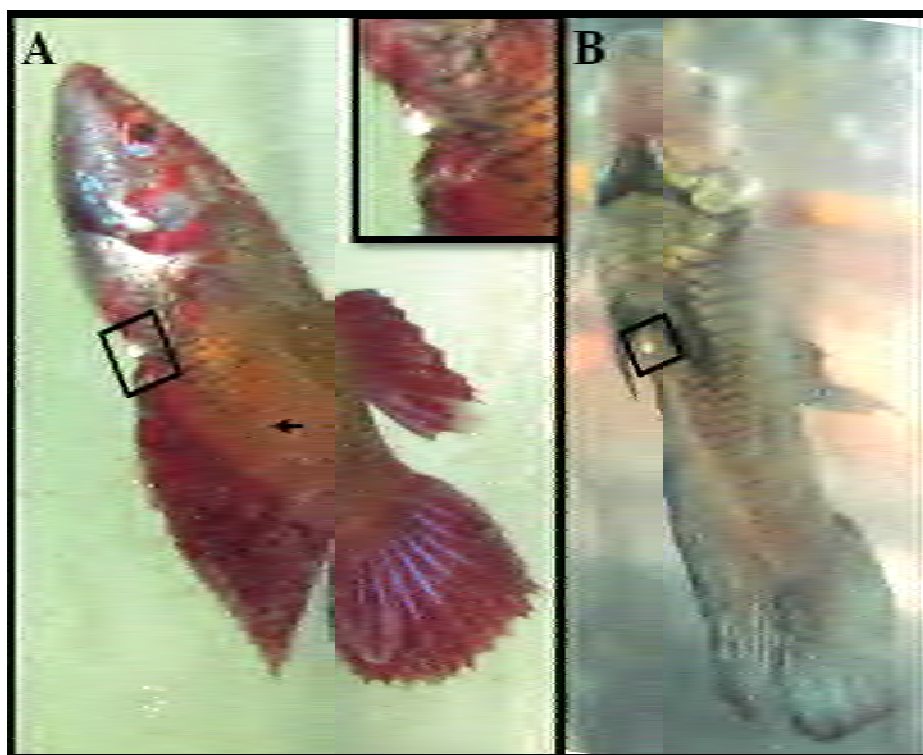


Figura 6: Ovários de fêmeas de *B. splendens* em diferentes estágios de desenvolvimento (macroscopicamente). A: Gônadas imaturas. B: Gônadas em maturação e C: Gônadas em maturação avançada. **Legenda:** gônadas (g); vísceras (vi) e gordura visceral (\*).



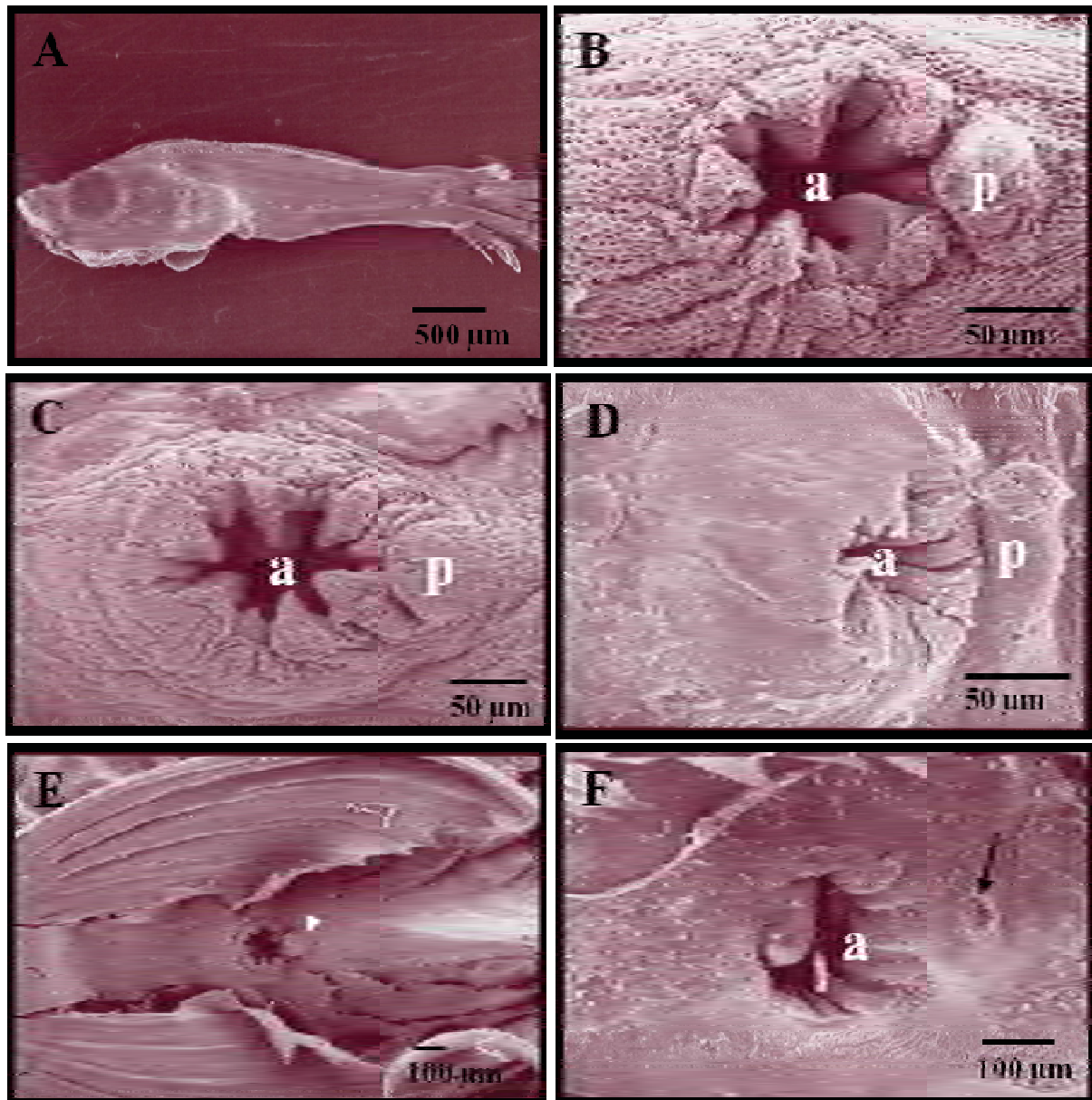
Figura 7: Ovário maduro de *B. splendens*.

No período reprodutivo as fêmeas desta espécie apresentavam sinais secundários, tais como, listras verticais e papila urogenital proeminente, os quais puderam ser visualizados macroscopicamente (**Figura 8**) e em microscopia eletrônica de varredura (**Figura 9**). Já os machos apresentavam comportamento de produzir ou aumentar o ninho de bolhas de ar.



**Figura 8:** Fotografias de fêmeas adultas de *B. splendens* com sinais secundários durante o período reprodutivo. **A:** Fêmea com papila urogenital proeminente e esbranquiçada; listras corporais verticais (seta). **B:** Papila urogenital localizou-se ventralmente e, entre as nadadeiras pélvicas.





**Figura 9:** Eletromicrografia de varredura de *B. splendens* com ênfase na papila urogenital. **A:** Juvenil, posição do peixe. **B e C:** Ânus e papila urogenital iniciando sua protuberância. **D:** papila urogenital bem externalizada, indicando aptidão da fêmea para acasalamento. **E:** Início da regressão papilar. **F:** Papila regredida. **Legenda:** ânus (a); papila urogenital (p); cabeça de seta mostra papila urogenital iniciando regressão e seta indica papila urogenital regredida.



#### 4. DISCUSSÃO

O *Betta splendens* apresentou os ovários como órgãos pares e alongados que sofreram modificações durante o ciclo reprodutivo, seguindo o padrão descrito para a maioria dos teleósteos, semelhantemente ao descrito por Mello *et al.*, (2005) em lambari-prata, *Astyanax scabripinnis*.

Acúmulo de gordura visceral foi evidente em fêmeas de *B. splendens* durante o início da maturação gonadal e, que ao longo do desenvolvimento das gônadas o volume de gordura visceral decrescia. Costa *et al.*, (2005) verificaram que os maiores valores médios do índice de gordura celomática em piau vermelho foram observados no estágio de repouso e maturação inicial, decrescendo em seguida nos subestádios de maturação intermediária, maturação avançada e desovado.

O decréscimo no conteúdo de gordura celomática ao longo dos estádios do ciclo reprodutivo sugere uma provável utilização das reservas graxas no processo de amadurecimento das gônadas e/ou migração reprodutiva (WOOTTON, 1995). Comportamento semelhante foi observado em *Leporinus piau* (TAVARES e GODINHO, 1994) e *Curimatella lepidura* (ANDRADE, 1990).

As análises microscópicas dos ovários de *B. splendens* permitiram verificar que os mesmos são revestidos pela túnica albugínea que é constituída de tecido conjuntivo denso e que emite projeções (lamelas), dividindo o ovário em compartimentos, onde as células germinativas são sustentadas por um tecido conjuntivo frouxo (estroma ovariano) igualmente ao verificado por Bernardes e Dias (2000) em peixes de água salgada, no caso, o peixe-porco, *Balistes capriscus*. Mazzoni *et al.*, (2010) também verificaram em *Cyprinus carpio* que no início do desenvolvimento ovariano pequenas invaginações começaram a se formar na região ventral do ovário e, no decorrer do desenvolvimento estas envaginações

formaram as lamelas ovígeras, sendo que estas projeções originaram-se a partir da túnica albugínea.

De acordo com os critérios propostos por Hoar (1969), a cavidade ovariana da espécie em estudo tem continuidade com o gonoducto, caracterizando os ovários como do tipo cistovariano. Entretanto, em algumas espécies de teleósteos, como os salmonídeos (KENDALL, 1921; ROBERTSON, 1953) e as anguilides (COLOMBO *et al.*, 1984) não apresentaram cavidade ovariana, sendo o ovário descrito como do tipo gimnovariano.

Nesta pesquisa observaram-se os estágios descritos para a maturação gonadal, inicialmente com a alta concentração de ovogônias, indicando sua proliferação, depois a diferenciação em ovócitos, seguidos de modificações morfológicas, ligadas ao processo de vitelogênese (COSTA *et al.*, 2005). Mello *et al.*, (2005) afirmaram que o desenvolvimento das células germinativas geralmente são semelhante nos teleósteos, com variações na composição e distribuição do vitelo, no grau de desenvolvimento dos alvéolos corticais e no desenvolvimento das camadas envoltórias.

Nem todos os ovócitos que iniciam o desenvolvimento serão liberados. Estes ovócitos podem sofrer o processo de atresia (FÁVARO e CHAVES, 1999). Segundo Leonardo *et al.*, (2006) ovócitos atrésicos apresentam ondulações e ruptura da zona radiata, hipertrofia e invaginações na camada folicular. No entanto, na espécie estudada nesta pesquisa a zona radiata, mostrou-se em formado irregular em ovócitos com desenvolvimento secundário, havendo reentrâncias que penetravam nos ovócitos, e alguns ovócitos de menores tamanhos apresentavam camada totalmente irregular. Tais achados sugerem que os ovócitos que apresentaram somente reentrâncias possam estar em um estágio inicial de atresia e os menores, que contém camada irregular por todo ovócito, estão em estágio mais avançado. A atresia folicular pode ter sido causada pelo manejo dos

animais. Evidentemente, são necessários mais estudos (ultraestruturais), para descobrir o papel destas estruturas e para confirmar se, de fato, estas estruturas estão relacionadas à atresia folicular.

## 5. CONCLUSÕES

De acordo com o desenvolvimento gonadal de fêmeas de *Betta splendens*, pode-se concluir que:

✓ Os ovários desta espécie são do tipo cistovariano e os ovócitos apresentaram desenvolvimento sincrônico.

✓ A fêmea tem seu peso reduzido durante a maturação final devido à utilização da gordura celomática em prol do desenvolvimento ovariano.

✓ Sinais secundários, tais como papila urogenital proeminente e listras corpóreas verticais, caracterizam o período reprodutivo, indicando que as fêmeas estão aptas ao acasalamento.

✓ Fêmeas quando alimentadas e manejadas adequadamente, podem reproduzir-se com 4 meses de idade.

✓ O manejo inadequado pode ocasionar degeneração ovocitária e impossibilitar as desovas, comprometendo a criação.

## 6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Professor Dr. João Batista Kochenborger Fernandes pelo fornecimento do material biológico e espaço físico, assim como o auxiliar agropecuário do Laboratório de Peixes Ornamentais do Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP) Valdecir Fernandes de Lima, pelo auxílio, ao Sr. Orandi Mateus, histotécnico do Laboratório de Histologia e Embriologia, à Claudia Aparecida Rodrigues e Claudia Regina Sanches Ribeirinho do Laboratório de Microscopia Eletrônica, da FCAV/UNESP pela colaboração no

processamento do material e pelo aprendizado, ao CAUNESP por oferecer o curso de pós-graduação e ao CNPq pela Bolsa de Mestrado (131977/2011-3).

## 7. REFERÊNCIAS

- ANDRADE, D.R. *Biologia reprodutiva da manjuba Curimatella lepidura (Eigenmann & Eigenmann, 1889) (Pisces, Curimatidae) da Represa de Três Marias, Rio São Francisco, MG*. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, p.217, 1990.
- BERNARDES, R.A.; DIAS, J.F. Aspectos da reprodução do peixe-porco, *Balistes capricus* (Gmelin) (Actinopterygii, Tetraodontiformes, Balistidae) coletado na costa sul do estado de São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 17, n.3, p.687-696, 2000.
- COLOMBO, G.; GRANDI, G.; ROSSI, R. Gonad differentiation and body growth in *Anguilla anguilla* L. *Journal of Fish Biology*, v. 24, p. 215-228, 1984.
- COSTA, A.P.R.; ANDRADE, D.R.; VIDAL-Jr., M.V.; SOUZA, G. *Indicadores quantitativos da biologia reprodutiva de fêmeas de piau-vermelho no Rio Paraíba do Sul. Pesquisa agropecuária brasileira*, Brasília, v.40, n.8, p.789-795, 2005.
- DEVLIN, R.H., NAGAHAMA, Y. Sex determination and sex differentiation in fish: 1128 an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, v. 208, p.191-364, 2002.
- HARVEY, B.; CAROLSFELD, J. *Induced breeding in tropical fish culture*. Ottawa: IDRC, p.144, 1993.
- HOAR, W.S. Reproduction. In: HOAR, W.S.; RANDALL, D.J. (Eds.). *Fish physiology*. London: Academic Press, v.3, p.1-72, 1969.
- KENDALL WC. *Peritoneal membranes, ovaries, and oviducts of salmonid fishes and their significance in fish-cultural practices*. Bull Bureau Fish, v. 37, p.184-208, 1921.
- LEONARDO, A.F.G.; ROMAGOSA, E; BATLOUNI, S.R.; BORELLA, M.I. Occurrence and significance of ovarian and follicular regression in cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766): a histology approach. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.58, n.5, p.831-840, 2006.
- MAZZONI, T.S.; GRIER, H.J.; QUAGIO-GRASSIOTTO, I. Germline Cysts and the Formation of the Germinal Epithelium During the Female Gonadal Morphogenesis in *Cyprinus Carpio* (Teleostei: Ostariophysi: Cypriniformes). *The Anatomical Record*, v.293, p.1581-1606, 2010.
- MELO, F.C.S.A.; MALDONADO, I.R..S.C.;BENJAMIN, L.A.; MATTA, S.L.P. Biologia reprodutiva de Fêmeas de Lambari-prata (*Astyanax scabripinnis*) (Characidae, Tetragonopterinae) em tanques de piscicultura. *Revista Ceres*, v. 52, n.304, p. 811-829, 2005.
- RICKER, W.E. Methods for assessment of fish production in fresh waters. *Oxford: Blackwell Scientific Publications*, p. 313, 1968.

ROBERTSON, J.G. Sex differentiation in the Pacific salmon *Oncorhynchus keta* (Walbaum). *Canadian Journal of Zoology*, v.31, p. 73-79, 1953.

ROTTA, M. A. Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestivo dos peixes relacionados à piscicultura. Documentos 53 – EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). *Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*. ISSN: 1517 – 1973, p. 48, 2003.

SANTOS, D.L.; SANTOS, C.J.A.; QUEIROZ, A.C.S; SANTOS, A.J.G. Tempo de rematuração em fêmeas de *Betta splendens* (REGAN, 1910) submetidas a dietas com diferentes níveis protéicos. *Revista Brasileira de Engenharia de Pesca*, v. 4, n. 2, p. 73-78, 2009.

TAVARES, E.F. e GODINHO, H.P. Ciclo reprodutivo do peixe piau-gordura (*Leporinus piau* Fowler, 1941) da Represa de Três Marias, Rio São Francisco. *Revista Ceres*, v.41, p.28-35, 1994.

TOLOSA, E.M.C.; RODRIGUES, C.J.; BEHMER, O.A.; FREITAS NETO, A.G. *Manual de técnicas para histologia normal e patológico*. 2ed. Barueri: Manole, p. 341, 2003.

WOOTON, R.J. *Ecology of teleost fishes*. London: Chapman & Hall Publishing, p.412, 1995.

## 8. ANEXOS

### 8.1 Certificado de Comissão de Ética no uso de Animais



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Jaboticabal



#### CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

#### CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 018092/11 do trabalho de pesquisa intitulado "**Ontogenia do trato digestório de *Betta splendens* e desenvolvimento gonadal: aspectos morfológicos**", sob a responsabilidade da Profª Drª Laura Satiko Okada Nakaghi está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 02 de Setembro de 2011.

Jaboticabal, 05 de Setembro de 2011.

  
**Prof. Dr. Jeffrey Frederico Lui**  
Presidente - CEUA

  
**Med. Vet. Maria Alice de Campos**  
Secretária - CEUA