



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL



PROTEÍNA BRUTA NA ALIMENTAÇÃO DE MATRIZES DE PACU,
Piaractus mesopotamicus **MANTIDAS EM TANQUES-REDE**

FÁBIO BITTENCOURT

Zootecnista

Jaboticabal
São Paulo – Brasil

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL



PROTEÍNA BRUTA NA ALIMENTAÇÃO DE MATRIZES DE PACU,
Piaractus mesopotamicus **MANTIDAS EM TANQUES-REDE**

Fábio Bittencourt

Orientadora: Profa. Dra. Elizabeth Romagosa

Co-orientador: Prof. Dr. Aldi Feiden

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura da UNESP – CAUNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Aquicultura.

Jaboticabal

São Paulo – Brasil

2012

Bittencourt, Fábio
B624p Proteína bruta na alimentação de matrizes de pacu, *Piaractus mesopotamicus* mantidas em tanques-rede. / Fábio Bittencourt. -- Jaboticabal, 2012
112 f. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2012
Orientadora: Elizabeth Romagosa
Co-orientador: Aldi Feiden
Banca examinadora: Rosicleire Veríssimo Silveira, Eduardo de Medeiros Ferraz, Altevir Signor, Wilson Rogério Boscolo
Bibliografia

1. Reprodução induzida. 2. Desova. 3. Desenvolvimento embrionário. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura

CDU 639.3.03

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

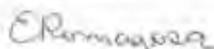
TÍTULO: PROTEÍNA BRUTA NA ALIMENTAÇÃO DE MÃTRIZES DE PACU, *Piaractus mesopotamicus*, MANTIDAS EM TANQUES-REDE

AUTOR: FÁBIO BITTENCOURT

ORIENTADORA: Profa. Dra. ELIZABETH ROMAGOSA

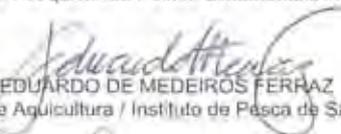
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. ALDI FEIDEN

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Aquicultura, pelo Comissão Examinadora:



Profa. Dra. ELIZABETH ROMAGOSA

Centro de Pesquisa Em Peixes Ornamentais / Instituto de Pesca de São Paulo



Prof. Dr. EDUARDO DE MEDEIROS FERRAZ

Centro de Aquicultura / Instituto de Pesca de São Paulo



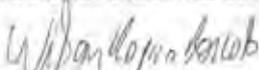
Profa. Dra. ROSICLEIRE VERISSIMO SILVEIRA

Departamento de Biologia e Zootecnia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira



Prof. Dr. ALTEVIR SIGNOR

/ Universidade Estadual do Oeste do Paraná



Prof. Dr. WILSON ROGÉRIO BOSCOLO

Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Data da realização, 27 de julho de 2012.

A Deus

Pelo dom da vida

Aos

Meus pais

Elliot Rehder Bittencourt e Vera R. F. Bittencourt

Pelo carinho, apoio, incentivo, ensinamentos,
atenção, por acreditarem no meu sonho e
sempre estarem presentes nos momentos mais
difíceis da minha vida

Ao

Meu irmão, cunhada e sobrinha

Rodrigo Bittencourt, Gisleine Barbati Bittencourt e Giovana
Barbati Bittencourt

Pelo apoio, amizade, carinho, amor e muita
paciência

À

Minha namorada

Cinthia Eyng

Pelo apoio, enorme paciência, amizade,
compreensão e amor

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” pela oportunidade e pelo ensino de qualidade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura pela oportunidade, excelente ensino e convívio com os profissionais gabaritados.

A professora, orientadora, “segunda mãe” e, acima de tudo, amiga Dra. Elizabeth Romagosa pela grande oportunidade a mim ofertada, incentivo, compreensão, imensurável paciência e grandes ensinamentos.

Ao professor, amigo e co-orientador Dr. Aldi Feiden por sempre incentivar a galgar novas etapas, ultrapassar desafios, pelos ensinamentos repassados e pela oportunidade de usufruir a estrutura necessária para a realização dos experimentos.

Ao professor e amigo Wilson Rogério Boscolo pelo apoio contínuo durante o doutorado, pela oportunidade de usufruir da estrutura necessária para a realização dos experimentos, pelos momentos de descontração, atenção e ensinamentos.

Ao professor Dr. Bruno Estevão de Souza pelo companheirismo, ajuda e paciência durante os meses experimentais.

As graduandas em Engenharia de Pesca da Unioeste – Toledo, Tatiane Andressa Lui e Juliana Alice Lösch pela companhia, ajuda, paciência, trabalho, empenho e amizade, artifícios fundamentais pelo sucesso durante os experimentos.

Ao aluno de doutorado do CAUNESP, Eduardo Antônio Sanches pela companhia, divertimento, ajuda e grande amizade durante o período de doutorado.

Aos Dr. Alexandre A. O. Santos, famoso Bauru e Fábio Sabbadin Zanuzzo, vulgo Spinha, pela ajuda durante o doutorado principalmente por propiciarem as estadias na república, pela amizade, companheirismo e apoio.

Ao Grupo de Estudos de Manejo em Aquicultura – GEMAQ por ser fundamental durante a realização dos experimentos com a utilização das estruturas existentes além de seus participantes Dacley H. Neu, César Sary, Odair Diemer, Ronan Roger Rorato (*in memoriam*), professor Dr. Altevir Signor, professor Dr. Fábio Pedron, entre outros, pelo auxílio, amizade, paciência e companheirismo.

A professora Dra. Maria Inês Borella do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo – USP e seus orientados Chayrra Chehade Gomes e Lázaro Wender Oliveira de Jesus pela paciência, apoio, auxílio e ensinamento durante os procedimentos realizados em seu laboratório.

Ao técnico de laboratório do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo – USP, Cruz Alberto Mendoza Rigonati pelos esclarecimentos, ensinamentos, dedicação, atenção e competência.

A Itaipu Binacional que, através do convênio existente com a Unioeste, possibilitou a execução do experimento.

Ao Rafael Glenn por ajudar durante todo o período de realização do experimento com empenho e dedicação.

A FAPESP pelo apoio financeiro durante todo o período de doutorado através do processo número 2010/0013-7.

ÍNDICE

1.0 RESUMO GERAL.....	11
2.0 ABSTRACT.....	12
3.0 INTRODUÇÃO GERAL.....	13
4.0 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
4.1 Local de desenvolvimento do experimento (Fonte: <i>www.itaipu.gov.br</i>).....	15
4.1.1 Rio Paraná.....	16
4.1.2 Itaipu.....	16
4.1.3 Projeto Cultivando Água Boa.....	17
4.2 Espécie estudada.....	19
4.3 Proteína na Nutrição de Reprodutores.....	22
4.4 Criação de Peixe em Tanque-rede.....	24
4.5 Maturação Ovariana.....	27
4.6 Seleção de Reprodutores (características macro e microscópicas).....	30
4.7 Indução Hormonal.....	33
4.8 Desenvolvimento embrionário.....	36
5.0 OBJETIVOS.....	39
5.1 Objetivo geral.....	39
5.2 Objetivos específicos.....	39
6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
7.0 ARTIGO 1 – Enviado ao Journal of Applied Ichthyology (no prelo).....	65
7.1. Dietas protéicas promovem a maturação dos ovócitos e desova em.....	65
<i>Piaractus mesopotamicus</i> estocado em tanques-rede.....	65
7.2. Introdução.....	66
7.3. Material e Métodos.....	67
7.4. Resultados e Discussão.....	71
7.5. Referências Bibliográficas.....	82
8.0 ARTIGO 2 – A ser enviado à Zygote.....	94
8.1 Biologia do desenvolvimento do pacu, <i>Piaractus mesopotamicus</i> , proveniente de matrizes mantidas em tanques-rede.....	94
8.2 INTRODUÇÃO.....	95
8.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	97
8.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	99
8.5 CONCLUSÃO.....	107
8.6 REFERÊNCIAS.....	108
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	111

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

Figura 1. Fotomicrografias de ovócitos e ovários de *P. mesopotamicus*, alimentadas com rações contendo níveis crescentes de proteína bruta, mantido em tanque-rede: (A; B; C; D = 1ª amostra (A) núcleos centrais; (B e D) grânulos de vitelo; (C) núcleos periféricos; (E; F = 2ª amostra = desova) (E) quebra da vesícula germinativa - QVG. (F) Micrópila; (G; H = ovários pós-desova (G) Folículos pós-ovulatórios = PO; ovócitos atresícos (AT) e pré-vitelogênicos (setas); (H) Folículos pós-ovulatórios (PO)..... 73

Figura 2. Distribuições de freqüências porcentuais dos diâmetros dos ovócitos de *P. mesopotamicus* mantidos em tanques-rede: A - antes da 1ª aplicação hormonal (1as amostras); B - momento da liberação dos ovócitos (2as amostras)..... 74

Figura 3. Taxas de fertilização (A) e de eclosão (B) de *P. mesopotamicus*, alimentado com dietas contendo níveis crescentes de proteína bruta, em tanques-rede. 77

Figura 4. Peso dos ovários remanescentes de *P. mesopotamicus*, alimentado com dietas contendo níveis crescentes de proteína bruta, mantido em tanque-rede. 79

Figura 5. Fator de condição (K) de fêmeas de *P. mesopotamicus* alimentadas com dietas contendo níveis crescentes de proteína bruta, em tanques rede... 81

ARTIGO 2

Figura 1. Fotomicrografias das fases do desenvolvimento embrionário e larval de *Piaractus mesopotamicus* proveniente de matrizes mantidas em tanque-rede. A) Ovo fertilizado e hidratado; B) Formação do blastodisco com diferenciação dos polos animal (PA) e vegetal (PV); C) Início da segmentação do polo animal e surgimento de dois blastômeros; D) Continuação das clivagens (quatro blastômeros); E) Mórula; F) Blástula; G) Início da epibolia; H) Início da gastrulação; I) Final da gastrulação; J) Organogênese; K) Desenvolvimento das regiões cefálica (crânio – Cr) com vesículas ópticas (Op) e caudal (Cd) e surgimento dos somitos (So); L) Fase final de segmentação com visualização da notocorda (No), cauda livre e início dos movimentos; M) e N) Larva recém-eclodida. Barra: 100 µm.....104

Figura 2. Fotomicrografias das fases do desenvolvimento embrionário e larval de *Piaractus mesopotamicus* proveniente de matrizes mantidas em tanque-

rede. A) Ovo fertilizado e hidratado; B) Início da movimentação citoplasmática para definição dos pólos animal (AP) e vegetal (VP); C) e D) Completa formação dos pólos animal e vegetal e início da segmentação do pólo animal; E) e F) Continuação das clivagens (oito blastômeros); G) Mórula; H) Blástula; I) Início da epibolia; J) Gástrula (movimentos de epibolia); K) Formação das duas camadas: epiblasto (e) e hipoblasto (h).....106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Médias de peso (Wt) e comprimento total (Lt) de <i>Piaractus mesopotamicus</i> mantido em tanque-rede e alimentado com rações contendo diferentes teores protéicos.	67
Tabela 2. Composição percentual e química das rações experimentais contendo diferentes níveis de proteína bruta	68
Tabela 3. Parâmetros reprodutivos de <i>P. mesopotamicus</i> alimentado com dietas contendo diferentes níveis protéicos, em tanques-rede.	77

LISTA DE ANEXOS

ANEXO I	87
----------------------	-----------

1.0 RESUMO GERAL

O objetivo do presente trabalho foi fundamentar o conhecimento das necessidades proteicas de fêmeas de pacu, *Piaractus mesopotamicus* avaliando-se a qualidade dos ovócitos, seus índices reprodutivos e a ontogenia dos embriões quando mantidas em tanques-rede. Para tanto, o experimento foi conduzido no Centro de Desenvolvimento de Tecnologias para Piscicultura em Tanques-rede localizado no Refúgio Biológico, município de Santa Helena – PR. Foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado, composto por quatro tratamentos (teores de proteína bruta-PB %) e quatro repetições, 224 reprodutores de pacu em 16 tanques-rede (5,0 m³ cada). Foram formuladas, quatro dietas contendo 18, 24, 30 e 36% de PB, sendo as mesmas isocalóricas, isocálcicas e isofosfóricas para fornecimento aos peixes durante seis meses. No período em que as fêmeas e os machos encontraram-se aptos a desova (dezembro/2009 a janeiro/2010) foram selecionados e aplicadas as doses de extrato hipofisário de carpa. Foram coletadas amostras de ovócitos antes da etapa preparatória e no momento da desova. As mesmas foram divididas em parcelas da seguinte maneira: em solução de Gilson (tamanho ou diâmetro dos ovócitos) e em formol (avaliações histológicas). O restante do material foi fertilizado e disposto em incubadoras cônicas experimentais (20L) para, posteriormente, serem coletados os ovos, embriões e larvas para o acompanhamento do desenvolvimento embrionário e aferição dos demais parâmetros reprodutivos. A distribuição da frequência porcentual dos diâmetros dos ovócitos coletados antes da 1ª aplicação hormonal apresentou comportamento unimodal para o menor teor protéico e tendências polimodais para os demais tratamentos. No momento da desova, situação similar foi verificada. As taxas de fertilização e eclosão foram menores no tratamento com 30% de PB, diferindo ($p < 0,05$) dos demais. O maior valor de eclosão foi encontrado para as fêmeas alimentadas com dietas contendo 18% de PB. O maior peso dos ovários remanescentes foi constatado para os exemplares que receberam 30 e 36% de PB. O menor índice de K foi observado para fêmeas alimentadas com a dieta contendo o maior teor protéico. Conclui-se que a dieta contendo 18% de PB satisfaz a exigência de fêmeas-reprodutoras da espécie adaptada ao sistema e que o desenvolvimento embrionário do *Piaractus mesopotamicus* proveniente de matrizes mantidas em tanque-rede apresentou seis estágios de delimitação dos pólos vegetal e animal com sucessivas clivagens, mórula, blástula, gástrula, organogênese e eclosão.

2.0 ABSTRACT

The aim of this work was to substantiate the knowledge of protein requirements of female pacu, *Piaractus mesopotamicus* evaluating the oocytes quality, reproductive index and the embryo ontogeny when kept in cages. For that, the experiment was conducted in the Centro de Desenvolvimento de Tecnologias para Piscicultura em Tanques-rede located in the Refúgio Biológico, Santa Helena county – PR. Were distributed in a completely randomized design, composed of four treatments (crude protein tenors – PB %) and four replicates, 224 breeding pacu *P. mesopotamicus* in 16 cages (5,0 m³ each). Were formulated four diets containing 18, 24, 30 and 36% of PB, being isocalorics, isocalcium and isophosphoric to feed the fish. In the period which females and males were able to spawn (December/2009 to January/2010) were selected and applied the doses of carp pituitary extract. Were collected oocytes samples before the preparatory stage and at the spawning moment. They were divided in parts as follows: Gilson's solution (size or oocytes diameters) and in formol (histological evaluations). The material remainder was fertilized and placed on experimental conic incubators (20L) to, subsequently, to collect the eggs, embryos and larvae for monitoring embryonic development and measurement the others reproductive parameters. The oocytes diameter percentage frequency distribution collected before the 1st hormonal application showed unimodal behavior for the lower protein content and polymodal trends for the other treatments. At the moment of spawning, similar situation was verified. The fertilization and hatching rates were lower in treatments with 30% of PB having differences ($p < 0,05$) from others. The highest hatching values was found to females fed with diets containing 18% of PB. The highest remaining ovaries weight was found for specimens that received 30 and 36 of PB. The lowest K index was observed for females fed with the diet containing the highest protein tenor level. It was concluded that diet containing 18% of PB satisfies the requirement of breeding female of this species adapted to the system and *Piaractus mesopotamicus* embryo development from matrices kept in cages presented six stages of animal and vegetal poles with successive cleavages, morula, blastula, gastrula, organogenesis and hatching.

3.0 INTRODUÇÃO GERAL

O pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), pertence a superordem Ostariophysi na qual, segundo Urbinati e Gonçalves (2010), incluem-se os peixes sul-americanos de maior valor comercial na pesca e piscicultura brasileira. A espécie encontra-se distribuída nas bacias dos rios Paraná, Paraguai e Uruguai (Nakatani et al., 2001) e apresenta rápido crescimento, rusticidade ao manejo, fácil adaptação à alimentação artificial e grande aceitação do mercado consumidor (Cantelmo, 1993). Por ter um papel de destaque na aquicultura brasileira tem recebido atenção especial pelos pesquisadores principalmente, no que diz respeito ao aperfeiçoamento de técnicas reprodutivas empregadas em seu cultivo (Urbinati e Gonçalves, 2010).

Inúmeras são as vantagens da criação de espécies nativas quando comparadas às exóticas, pois estas se encontram aclimatadas e são bem aceitas nos mercados consumidores (Zaniboni-Filho, 2000).

Rações balanceadas vêm sendo utilizadas de forma decisiva no cultivo de peixes quer como fator de sustentabilidade ecológica ou de viabilidade técnico-econômica da atividade (Lazzari et al., 2007).

Sabe-se que as proteínas correspondem aos nutrientes de máxima importância para o animal em crescimento e o perfil aminoacídico é decisivo para a sua qualidade, determinando seu valor como componente da dieta (Pezzato, 1999). São encontrados cerca de 20 aminoácidos nas proteínas, mas somente dez são essenciais aos peixes, dentre eles, arginina, histidina, isoleucina, leucina, metionina, valina, fenilalanina, treonina, lisina e triptofano (Proença e Bittencourt, 1994).

Os alimentos protéicos representam a maior proporção dos custos da ração em sistemas de cultivo intensivo e semi-intensivo, pois além de entrarem em grande quantidade na formulação, são mais caros que os alimentos energéticos (Boscolo, 2003). Uma vez que os peixes em tanques-rede estão impossibilitados de procurar por alimentos naturais que possam suprir alguma deficiência nutricional apresentada pela dieta fornecida, os nutrientes exigidos pelo peixe devem estar contidos na ração (Carneiro et al., 2002).

Em 2009, Reidel et al. (2010) estudaram a influência da interação entre a nutrição de reprodutores alimentados com diferentes níveis de proteína bruta (PB) e energia digestível (ED) durante o processo de maturação gonadal de *Rhamdia quelen*, quando mantidos em tanques-rede e, notaram que somente o tratamento que recebeu 35% de PB e 3250kcal/Kg de ED afetou o desenvolvimento ovariano permitindo antecipar assim, a maturação ovariana.

O sistema de cultivo em tanques-rede vem tornando a atividade uma alternativa em regiões onde a pesca está em declínio e possibilita o aproveitamento dos ambientes aquáticos existentes, dispensando o desmatamento de grandes áreas e evitando problemas de erosão e assoreamento (Cardoso et al., 2005; Bittencourt et al., 2010).

O cultivo de peixes em tanques-rede pode incrementar consideravelmente à produção aquícola, criar condições para atrair novos investidores e, tornar-se excelente alternativa de geração de emprego e renda além de diminuir a pressão sobre os estoques pesqueiros naturais e sobre as várzeas (Ayroza et al., 2005).

Outro fato que justifica a utilização de tal sistema de criação, é que nos reservatórios brasileiros a diminuição da quantidade de espécies de peixes

vem acarretando baixa produtividade da pesca e, em consequência, baixa remuneração onde segundo Okada et al. (1997) no reservatório de Segredo a renda diária média por pescador era de R\$ 10,88, um pouco abaixo do encontrado no baixo Tietê (R\$ 12,83) e médio Tietê (R\$ 16,13) (Maruyama et al., 2009). Sendo assim, atividades alternativas como a piscicultura aparecem como fonte extra de renda àqueles que dependem da atividade extrativista.

Estima-se que o potencial hídrico no Brasil seja de 5,5 milhões de hectares de grandes reservatórios naturais e artificiais, representando grande potencial para a criação de peixes continentais em tanques-rede (Zaniboni-Filho et al., 2005). Isto associado à grande disponibilidade de grãos para o processamento de rações balanceadas de ótima qualidade para piscicultura intensiva, o que tem permitido nos últimos anos sua expansão.

Um dos principais aspectos para a intensificação da produção piscícola, acompanhada da sustentabilidade tanto econômica como ambiental, é a utilização da propagação artificial ou reprodução induzida (Romagosa, 2006). Para tal, deve-se utilizar gametas masculinos e femininos de qualidade promovendo máxima fertilização e, subsequentemente, desenvolvimento normal do embrião (Nordeide, 2007; Babin et al., 2007). Neste aspecto, estudos envolvendo o manejo visando uma melhor qualidade dos gametas do pacu, *Piaratus mesopotamicus* em tanques-rede, tornam-se necessários para gerar informações e, subsidiar técnicas de produção, que garantam a produção sistemática de alevinos e larvas dessa espécie.

4.0 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Local de desenvolvimento do experimento (Fonte: www.itaipu.gov.br)

4.1.1 Rio Paraná

O rio Paraná, principal formador da bacia do Prata, é o décimo maior do mundo em descarga e o quarto em área de drenagem, sendo responsável por receber o volume hídrico do centro-sul da América do Sul até a Serra do Mar, nas proximidades da costa atlântica. De sua nascente, no planalto central, até a foz, no estuário do Prata, percorre 4.695 km. Em território nacional drena uma área de 891.000 km². Seus principais tributários são o rio Grande e o Parnaíba (formadores), Tietê, Paranapanema e Iguaçu.

Entre as principais bacias hidrográficas da América do Sul, a do Paraná foi a que sofreu maior número de represamentos para a geração de energia. Existem mais de 130 barragens, considerando-se apenas aquelas com alturas superiores a 10m que transformaram o rio Paraná e seus principais tributários em uma sucessão de lagos. Dos 809 km originais do rio em território brasileiro, somente 230 km ainda são de água corrente.

4.1.2 Itaipu

A usina de Itaipu é resultado de intensas negociações entre os dois países que ganharam impulso na década de 60. Em 22 de junho de 1966, os ministros das Relações Exteriores do Brasil, Juracy Magalhães, e do Paraguai, Sapena Pastor, assinaram a “Ata do Iguaçu”, uma declaração conjunta que manifestava a disposição para estudar o aproveitamento dos recursos hídricos pertencentes em condomínio aos dois países, no trecho do rio Paraná “desde e

inclusive o Salto de Sete Quedas até a foz do rio Iguaçu”. Em fevereiro do ano seguinte foi criada a Comissão Mista Brasil – Paraguai para por em prática o que decidiram ambas as Federações.

Em 26 de abril de 1973, Brasil e Paraguai assinaram o Tratado de Itaipu. Instrumento legal para o aproveitamento hidrelétrico do Rio Paraná pelos dois países. Em maio de 1974, foi criada a entidade binacional Itaipu, para gerenciar a construção da usina. As obras começaram no ano seguinte.

Em 13 de outubro de 1982, com a conclusão das obras da barragem de Itaipu, as comportas do canal de desvio foram fechadas e começou ser formado o reservatório da usina. O Lago de Itaipu, com área de 1.350 km², foi formado em apenas 14 dias. Nesse período, as águas subiram 100 metros e chegaram as comportas do vertedouro as 10 horas do dia 27 de outubro.

Em 5 de maio de 1984, entrou em operação a primeira unidade geradora de Itaipu. Em 2005 funcionavam 18 unidades geradoras de 700 megawatts cada uma. Finalmente, em maio de 2007, no mês em que o Brasil e Paraguai completaram 33 anos de assinatura do Tratado de Itaipu, entram em funcionamento as últimas duas das 20 turbinas em operação. Com esse total, a bacia pode chegar a capacidade máxima de operação de 100 bilhões de quilowatts-hora.

A barragem possui 8 km de extensão e uma altura de 196 metros. Em sua construção foram utilizados 12,3 milhões de metros cúbicos de concreto e o ferro e aço utilizados permitiriam a construção de 380 Torres Eiffel.

4.1.3 Projeto Cultivando Água Boa

O projeto Cultivando Água Boa é parte das ações voltadas a conservação ambiental desenvolvidas na Usina Hidrelétrica de Itaipu Binacional, fundamentado em documentos nacionais e que visa estabelecer critérios e condições para orientar as ações socioambientais relacionadas a conservação dos recursos naturais e centradas na qualidade e quantidade das águas e qualidade de vida das pessoas. Dentro dos focos buscados por essa iniciativa encontra-se o “modo de produzir”, que procura estabelecer a criação e fornecer a tecnologia necessária para processos de produção sustentáveis e saudáveis.

O projeto tem como abrangência 16 municípios lindeiros que tiveram suas áreas inundadas no lado brasileiro pela construção da usina e mais 13 outras cidades perfazendo um total de 29 unidades compreendidas na Bacia do Paraná 3.

Entre as linhas que fazem parte do Cultivando Água Boa, existem o sub-programa “Mais Peixes em Nossas Águas” que tem como finalidade dar suporte teórico e prático as atividades de pesca e aquicultura. Os pescadores profissionais (mais de 700 entre Foz do Iguaçu e Guaira – PR), índios (130 famílias com aproximadamente 600 pessoas), assentados da reforma agrária, ribeirinhos e pescadores amadores que dependem do reservatório para seus sustentos sofrem gradativamente com a depleção dos estoques pesqueiros e, conseqüentemente, com a diminuição de renda.

A partir de então, houve o entendimento para desenvolver ações voltadas ao incentivo da pesca e a aquicultura por meio do cultivo sustentável de peixes em sistema de tanques-rede. Desse modo, foram instalados pioneiramente as primeiras unidades no reservatório e as parcerias com as

instituições de ensino iniciaram-se para dar o suporte técnico aos beneficiários do sub-programa. Desde então, projetos de pesquisa em parceria com a Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste – *Campus* de Toledo – PR, vem sendo realizados para o desenvolvimento de um pacote tecnológico para a criação do pacu, *Piaractus mesopotamicus* em tanque-rede. Tal ação teve como objetivo esclarecer os principais entraves existentes para a criação dessa espécie de peixe no que tange a nutrição, manejo e reprodução.

4.2 Espécie estudada

No Brasil a criação de peixes em cativeiro tem aumentado e, entre as espécies nativas que vêm sendo utilizadas destaca-se o pacu que apresenta grande potencial para a piscicultura intensiva devido à adaptabilidade ao cultivo, menor exigência de proteína e baixa necessidade de grandes quantidades de farinha de peixe na ração (Fernandes et al., 2000), rápido crescimento, rusticidade ao manejo, fácil adaptação à alimentação artificial e grande aceitação do mercado consumidor, podendo ser explorado na criação comercial e na pesca esportiva (Cantelmo, 1993). Segundo Silva (1985) citado por Fernandes et al. (2001) o pacu é uma espécie onívora. Esse hábito alimentar é caracterizado pela combinação da ingestão de alimento animal, que apresenta alto valor energético, porém requer um certo esforço para obtê-lo, com ingestão de alimento de origem vegetal, que apresenta baixo valor energético, porém pode ser obtido com menor esforço (Zavala-Camin, 1996). Sua alimentação sofre flutuações de acordo com a disponibilidade do alimento, em consequência de variações ambientais e da migração reprodutiva. Na

estação chuvosa, o pacu permanece em áreas de inundação, onde se alimenta de itens de origem vegetal, porém, na época de estiagem, permanece no leito dos rios com pouca disponibilidade de alimentos (Urbinati e Gonçalves, 2010).

Uma das características que limita a intensificação de produção de peixes redondos é a comercialização devido a existência de espinhas em “y” em sua musculatura, porém, hoje em dia, há cortes específicos que possibilitam sua retirada e, conseqüentemente, viabilizam os cortes do tipo filé. Outra alternativa para a comercialização desse tipo de pescado é na forma de carne mecanicamente separada (CMS) com o uso de despolpadeiras, visando a elaboração de produtos processados como bolinhos, fishburgueres, nuggets, entre outros (Antunes, 1997), que pode se tornar uma forma de incrementar a oferta de produtos a base de pescados e estimular a produção, pois o rendimento de tronco limpo destes peixes é de aproximadamente 60% (Benke et al., 2005), devido a baixa porcentagem de cabeça. Os peixes com cabeça grande e comprimida proporcionam baixos rendimentos de filé, como verificado para a tilápia, enquanto naqueles com cabeça pequena, como o pacu, o rendimento atinge valores mais altos, evidenciando a existência de uma relação inversa entre tamanho de cabeça e o rendimento do filé (Faria et al., 2003).

Existem estudos relacionados ao desempenho produtivo do pacu desenvolvidos em experimentos a campo (densidade de estocagem, sistemas de policultivo, cultivo em tanques-rede, entre outros), porém muitos deles foram realizados na década de 80 e início de 90, quando a maioria das dietas disponíveis no mercado eram oriundas da avicultura. Dessa forma, justifica-se a continuidade desses estudos, principalmente em função do atual

conhecimento das exigências nutricionais da espécie, para atualização e otimização dos parâmetros produtivos (Urbinati e Gonçalves, 2010).

As técnicas reprodutivas desenvolvidas para o *P. mesopotamicus* foram objetos de constantes pesquisas (Godinho et al., 1977; Castagnolli e Donaldson, 1981; Romagosa et al., 1990; Bock e Padovani, 2000). A espécie só se reproduz em cativeiro por meio da utilização de injeções hormonais para a liberação dos ovócitos e espermatozóides (Romagosa, 2008). O período reprodutivo compreende os meses de outubro a março (Romagosa et al., 1990) e os indivíduos maduros são reconhecidos por meio de estruturas morfológicas externas tais como, ventre macio e abaulado e papila urogenital intumescida nas fêmeas; e fluidez de sêmen verificado através de massagem abdominal suave nos machos (Torres, 1994). Os primeiros resultados satisfatórios foram conseguidos na década de 70 com a aplicação de gonadotropina coriônica humana (Godinho et al., 1977). Posteriormente, foram realizados estudos com extrato hipofisário de salmão bruto (Romagosa et al. 1985a, b; Romagosa et al., 1990) e, parcialmente purificado (Castagnolli e Donaldson, 1985), LHRH-a (Bernardinho et al., 1986; Godinho e Godinho, 1986) e HCG (Romagosa et al., 1990).

A partir de então, parâmetros mais detalhados começaram a ser alvo dos pesquisadores para melhorar o desempenho reprodutivo da espécie. Romagosa et al. (1990) estudaram os padrões de distribuição da frequência dos diâmetros dos ovócitos de fêmeas de pacu, *P. mesopotamicus* e verificaram que os indivíduos em seu primeiro ou segundo ano de maturação gonadal que apresentam ovócitos verdes e modas de 876,4; 939,0 e 1001,6

µm com maior frequência para o valor intermediário encontravam-se aptas a serem induzidas a desova.

As técnicas de propagação artificial possibilitam o suprimento de ovos de qualidade para a piscicultura (Bock e Padovani, 2000), sendo fundamental a produção de formas jovens, em equilíbrio a demanda exigida atualmente pelo mercado crescente de alimentos protéicos para alimentação humana.

4.3 Proteína na Nutrição de Reprodutores

A nutrição de reprodutores é, sem dúvida nenhuma, a área menos estudada e entendida na alimentação de peixes (Izquierdo et al., 2001), porém os avanços científicos são necessários para contribuir com o incremento produtivo (Adewumi, 2006). O conhecimento dos requerimentos nutricionais para reprodutores continua incipiente e as rações comerciais existentes no mercado são inadequadas aos peixes nativos (Arbeláez-Rojas et al., 2002). Os hábitos alimentares e suas dietas influenciam não só o comportamento, integridade estrutural, saúde, fisiologia, crescimento e reprodução como também alteram as condições ambientais do meio onde vivem (Cyrino et al., 2010).

Os estudos para a definição da proteína dietética são fundamentais pois além de ser o ingrediente de maior custo na composição das rações (El-Sayed, 1999), a possibilidade de sua redução implica em menores excreções de resíduos nitrogenados ao meio ambiente (Almeida et al., 2011).

As proteínas são de fundamental importância na alimentação animal por estarem intimamente relacionadas aos processos vitais das células e,

consequentemente, do organismo (Bittencourt et al., 2010). Os peixes são alimentados com dietas contendo altas porcentagens de proteína em comparação aos mamíferos, tal fator está diretamente relacionado a baixa exigência energética dos indivíduos pecilotérmicos (Lovell, 1991). Mesmo assim, os peixes devem receber, durante a vida, uma quantidade mínima diária de proteínas que atenda as suas necessidades (estrutural, funcional e energética), podendo ser para o crescimento, recuperação dos tecidos, produção dos gametas, capacidade de fertilização dos ovócitos e desenvolvimento embrionário (Washburn et al., 1990).

A proteína foi objeto de estudos com tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* para verificar sua influência nos parâmetros reprodutivos. Três dietas purificadas com níveis de 10, 20 e 35% de proteína foram ofertadas aos animais. Passado o período do ensaio, verificou-se que a ração com menor teor protéico proporcionou infertilidade dos ovócitos, porém os mecanismos controlados por esse nutriente que agem diretamente nos órgão reprodutivos ainda não foram explicados, talvez haja uma rota alternativa dos aminoácidos livres que podem ocasionar tais alterações (Gunasekera et al., 1996).

Reidel et al. (2010), elaboraram seis dietas práticas variando os níveis protéicos (25, 30 e 35% de PB) e energéticos (3.250 e 3.500 kcal.kg⁻¹ de ração) e forneceu a jundiás, *Rhamdia quelen* mantidos em tanques-rede com o intuito de verificar qual seria a melhor ração para o desenvolvimento gonadal dos reprodutores. Ao final do período experimental, os pesquisadores concluíram que a dieta contendo 3.250 kcal.kg⁻¹ de ração e 35% de PB proporcionou melhor desenvolvimento gonadal ao final da fase de vitelogênese e, ainda,

apresentou melhores desempenhos reprodutivos com longos períodos de desova (quatro meses) e quatro picos de maturação dos ovócitos.

Sink et al. (2010) estudando as fontes protéicas e suas interações com os lipídios na produção, qualidade e composição bioquímica dos ovos, e porcentagem de eclosão e desempenho de alevinos do bagre do canal *Ictalurus punctatus*, verificaram que para incrementar os parâmetros reprodutivos da espécie as dietas comerciais utilizadas devem ser supridas em pelo menos mais 10% de lipídios (12% no total de lipídios) e a fonte protéica deve ser de pelo menos dois alimentos de origem animal.

A nutrição de reprodutores de *P. mesopotamicus* é uma lacuna a ser preenchida devido a inexistência de material científico para embasamento no preparo de dietas balanceadas com o objetivo de potencializar o desempenho reprodutivo da espécie e fornecer formas jovens ideais em termos quantitativos e qualitativos.

4.4 Criação de Peixe em Tanque-rede

O sistema de produção em tanques-rede é definido como a criação de peixes em um volume delimitado que permite a livre e constante circulação de água (Baldisserotto e Radünz Neto, 2004). As unidades produtivas são estruturas flutuantes de variados formatos e tamanhos, constituídos por redes ou telas que permitem a passagem livre da água (Beveridge, 1996).

Esse tipo de cultivo iniciou-se há mais de 50 anos, no delta do rio Mekong, na Ásia. As primeiras criações comerciais ocorreram no Japão, em 1961, com espécies marinhas e, em 1963, começaram a ser instalados os primeiros tanques-rede nos lagos Suwa e Kazumigaura, com o cultivo da carpa comum (Castagnolli, 2000).

Esta modalidade de exploração possui algumas vantagens sobre o sistema convencional por proporcionar o aproveitamento de ambientes aquáticos existentes como oceanos, rios, lagos, grandes reservatórios, entre muitos outros (Ono e Kubitzka, 1999), devido a possibilidade de sua instalação em áreas de difícil acesso, onde a construção de represas e viveiros escavados é inviável, e também das condições de manejo que permitem seu uso em escala comercial e familiar (Cavero et al., 2003).

Em contrapartida, Kubitzka (2000) ressalta que as desvantagens desse sistema produtivo estão relacionadas: ao pequeno acesso dos peixes aos alimentos naturais, demandando assim o uso de rações nutricionalmente completas e de custo mais elevado; a maior chance de ocorrência de problemas nutricionais e maior estresse dos animais; a facilidade para roubos e vandalismo; e ao risco de fuga dos peixes pelo rompimento das redes e telas que compreendem a unidade de produção.

A piscicultura em gaiolas no Brasil parece ser muito promissora, especialmente, em áreas onde o pescado apresenta um elevado valor de mercado ou simplesmente não está disponível, como em alguns municípios do sertão nordestino (Zimmermann e Fitzsimmons, 2004). Segundo os autores, há, em quase todo o território nacional, todas as condições necessárias para o sucesso desta modalidade de piscicultura, que foi o principal impulso para a aquicultura mundial na década de 80, mas que, atualmente, é muito questionada pelos elevados custos de produção.

No Brasil, apesar do grande potencial representado pelos seis milhões de hectares de águas represadas nos açudes de grandes reservatórios, construídos com a finalidade de geração de energia hidrelétrica, a produção comercial de peixes em tanques-rede está apenas começando e num futuro próximo poderá tornar o país um dos maiores produtores mundiais (Marengoni, 2006). Associado a isso, a grande disponibilidade de grãos para o processamento de rações completas de ótima qualidade para a piscicultura intensiva (Signor, 2010), permitiu a expansão do cultivo de peixes em tanques-rede nos últimos anos.

Por ser recente, essa atividade necessita de maiores informações e de adequação da cadeia produtiva. Nesse contexto, a legislação assume grande importância como ferramenta para o direcionamento da aquicultura, como o decreto nº 2.869 de 9 de dezembro de 1998, onde ficou regulamentada a cessão de águas públicas para a exploração da atividade. Sua implantação depende de compatibilizar a viabilidade econômica com a sustentabilidade ambiental, evitando assim conflitos no uso de recursos hídricos e promovendo o desenvolvimento regional.

O Decreto nº 4.895 de 25 de novembro de 2003 definiu que os espaços físicos em corpos d'água da União poderão ter uso autorizado para fins da prática de aquicultura. Para tanto, deve-se observar os critérios de ordenamento, localização e preferência para fins de desenvolvimento sustentável, o que foi regulamentado pela Instrução Normativa Interministerial nº 6 de 28 de maio de 2004.

O cultivo de peixes em tanques-rede vem crescendo nos últimos anos e estima-se que o maior desenvolvimento esteja relacionado à produção de espécies alóctones como a tilápia, praticadas em unidades pequenas de 2 a 6 m³ de volume útil e produtividade entre 25 a 150 kg.m⁻³ (Zimmermann e Fitzsimmons, 2004). Para o *P. mesopotamicus*, Bittencourt et al. (2010) encontraram menor peso final do indivíduos quando estocados 60 peixes por m³ porém com maior biomassa final.

Nessa modalidade produtiva, deve-se considerar que os peixes confinados estão submetidos a locais restritos sendo impedidos de buscar ambientes onde a qualidade da água apresente condições satisfatórias ao desenvolvimento dos animais, sendo de suma importância o monitoramento das características físicas e químicas do corpo hídrico e também o posicionamento dos tanques nos corpos d'água (Bozano e Cyrino, 1999). Portanto, a aquicultura intensiva deve ser conduzida de maneira planejada, gerenciada com critérios técnico-científicos e balizada por diretrizes legais,

para garantir o desenvolvimento sustentável da atividade e o uso múltiplo dos recursos hídricos (Ayroza et al., 2006).

4.5 Maturação Ovariana

O peixe imaturo atravessa uma época transitória até um estágio adulto, com o aparelho reprodutor maduro, constituído pelas gônadas e sistema endócrino, que controla a atividade fisiológica ovariana e testicular, através do eixo hipotalâmo-hipófise-gônada (HHG) (Murgas et al., 2009). Dentro de um plantel de reprodutores padrão de peixes, a idade de maturação e o ciclo gonadal diferenciam-se entre os indivíduos e populações (King e Pankhurst, 2003; Dziejulska e Domagaza, 2005) e devem ser conhecidos para melhor elucidar o comportamento reprodutivo (Dorostghoal et. al., 2009).

O sucesso de estratégias e técnicas reprodutivas piscícolas depende de modificações dos processos básicos do desenvolvimento dos ovócitos envolvendo uma série de alterações bioquímicas e morfológicas (Romagosa et al., 2005), sendo os estudos que envolvem a ovogênese e a classificação gonadal fundamentais para a compreensão do ciclo de vida (Takahashi et. al., 2008).

Para se entender a dinâmica do crescimento ovariano deve-se utilizar ferramentas como a histologia para auxiliar na classificação dos ovócitos nos diferentes estádios de desenvolvimento (Coward e Bromage, 1998). Seguindo essa lógica, Ganeco et al. (2001) definiram que, para teleósteos, o mesmo deve ser dividido em fases, para melhor compreensão das alterações morfológicas ovarianas por que passam as células germinativas e concluíram,

que para piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, em cativeiro, foram caracterizadas seis fases: cromatina-nucléolo (I), perinucleolar (II), alvéolo-cortical (III), vitelogênico (IV), pósvitelogênico (V) e atrésicos (VI). Em contrapartida, para o matrinxã, *Brycon cephalus*, Romagosa (1998) dividiu a ovogênese em duas etapas: crescimento primário (representado pelos cromatina-nucléolo e perinuclear) e crescimento secundário (constituído pelos alvéolo-cortical, vitelogênese e maturação final). No entanto, Çek e Yilmaz (2007), para *Clarias gariepinus*, inferem somente três estádios: crescimento primário e secundário e maturação, incluindo a fase de hidratação.

Independentemente das discrepâncias existentes nas classificações descritas anteriormente, é importante frisar que o ciclo reprodutivo de matrizes de teleósteos é caracterizado pela vitelogênese (Blythe et al., 1994). Tal processo é definido como a produção de vitelogenina pelos hepatócitos (Wallace e Selman, 1981) por intermédio do hormônio estradiol (Takemura e Kim, 2001; Solé et al., 2001). A vitelogenina é uma lipofosfoglicoproteína que, liberada na corrente sanguínea, é carregada até os ovócitos onde são incorporadas por meio de receptores mediados por endocitose para serem proteoliticamente clivadas em moléculas menores (fosfovítina, lipovítelina e α -componente) aumentando as reservas vitelogênicas nos ovócitos (Tyler et al., 1988). Constata-se então, segundo Mañanos et al. (2009), uma importante ferramenta na aquicultura por proporcionar técnicas de imunensaio para detectar o sexo de peixes que não apresentam dimorfismo sexual ou para se definir o estágio de desenvolvimento gonadal em período de reprodução, pois os níveis sanguíneos de vitelogenina aumentam concomitantemente com o processo de ovogênese.

De uma maneira geral, antes do início do ciclo reprodutivo, os ovários imaturos contêm ninhos de oogônias esparsas na lamela ovígera, que se proliferam por divisões mitóticas (Mañanos et al., 2009). Em um determinado momento, parte da população de ovogônias entra em meiose e transforma-se em ovócito primário, estabilizando imediatamente na prófase I (Nagahama e Yamashita, 2008). Nesse momento, o ovócito aumenta de tamanho pela deposição de material translúcido em seu citoplasma e há o aparecimento das células da granulosa e da teca (previtelogênico) (Mañanos et al., 2009).

A segunda etapa de crescimento (vitelogênese) é caracterizada pela síntese e enorme acúmulo de vitelogenina e algumas proteínas nos ovócitos, resultando em um aumento da ordem de dez vezes em seu tamanho. Conforme a progressão da vitelogênese, novas inclusões no citoplasma aparecem como alvéolo cortical, glóbulos lipídicos e grânulos de vitelo. Acompanham o crescimento dos ovócitos a zona radiata e as camadas da teca e granulosa, tornando mais espessas suas membranas a fim de suportar o crescimento celular (Nagahama e Yamashita, 2008; Mañanos et al. 2009).

Ao final da vitelogênese, os ovócitos pós-vitelogênicos são caracterizados pela grande transparência do citoplasma totalmente cheio de grânulos de vitelo e glóbulos lipídicos, núcleo ou vesícula germinativa localizada centralmente a célula e a espessa e claramente estriada zona radiata, envelopados pelas camadas foliculares da granulosa e da teca. Após esse momento, os ovócitos passam a maturação (Romagosa, 1998), com o recomeço da meiose e o avanço até a metáfase II, quando o primeiro corpúsculo polar é liberado, tornando, a célula, denominada ovócito secundário (Leonardo et al., 2004).

No início da maturação, os glóbulos lipídicos e os grânulos de vitelo começam a coalescer e a vesícula germinal inicia sua migração ao pólo animal. Tais processos continuam conforme o avanço da maturação. O final dessa etapa caracteriza-se pela dissolução da membrana nuclear, também denominada de quebra da vesícula germinativa. A transformação causada pela inclusão de vitelo e lipídio altera a composição iônica do citoplasma, causando drástica incorporação de água no interior dos ovócitos através do aumento da pressão osmótica. Após a hidratação, a parede folicular se rompe e o ovócito é liberado na cavidade ovariana ou abdominal para, posteriormente, ser expelido durante a desova (Mañanos et al. 2009).

Posteriormente há o aparecimento dos folículos pós ovulatórios (Romagosa, 1991). Informações entre o tempo de duração e consequente degeneração dessas estruturas em peixes confinados são praticamente inexistentes (Romagosa, 1998). No entanto, sabe-se que os folículos pós ovulatórios, após a desova, apresentam inexistente função endócrina e são reabsorvidos, envolvendo morte celular programada ou apoptose das células foliculares (Drummond et al., 2000).

4.6 Seleção de Reprodutores (características macro e microscópicas)

O sucesso da reprodução depende de um ajuste temporal que garanta que a desova ocorra no melhor local e no momento exato, quando as condições ambientais se apresentem as mais favoráveis para a sobrevivência dos descendentes. Dessa forma, a sincronia entre os processos fisiológicos reprodutivos com as condições ambientais faz-se extremamente necessária

(Zaniboni Filho e Weingartner, 2007) e compõe um método acurado para detectar o estágio de maturação gonadal dos reprodutores (Romagosa, 2008; 2010). Todavia, o número exacerbado de espécies piscícolas existente reflete em grande variabilidade das características reprodutivas, significando que determinadas técnicas de propagação artificial empregadas a certos indivíduos sejam ineficiente quando procedidas em outros plantéis. Assim sendo, faz-se necessário conhecer a espécie de trabalho, definindo época e local de desova, parâmetros abióticos e bióticos do habitat natural, fisiologia dos peixes, hábito alimentar, idade, fecundidade, viabilidade de ovos e larvas (Romagosa et al., 2001) entre outros, como maneira de se adequar as práticas a serem empregadas na proliferação desses animais (Andrade e Yasui, 2003).

Uma questão que tem merecido atenção em trabalhos de reprodução induzida de peixes é o critério para identificação dos animais aptos à indução (Narahara et al., 2002). A escolha dos machos é relativamente fácil, pois, na época da reprodução eles eliminam, sob leve pressão do abdômen, certa quantidade de sêmen que, de acordo com Murgas et al. (2009) apresenta-se como um líquido branco e leitoso.

Geralmente, matrizes que apresentem características macroscópicas como abdômen volumoso, macio e com a papila urogenital intumescida (Andrade e Yasui, 2003; Bock e Padovani, 2000; Murgas et al., 2009; Romagosa et al., 2001; Romagosa, 2006; Romagosa, 2008; Romagosa, 2010; Pereira et al., 2009; Sampaio e Sato, 2009; Silva et al., 2009) além de ovócitos homogêneos em tamanho e coloração, são escolhidas e definidas como capazes de receber as substâncias indutoras. Porém, deve-se reconhecer que este procedimento de seleção não permite escolher com segurança a fêmea

mais apta a ser induzida por serem métodos subjetivos (Zaniboni Filho e Weingartner, 2007). Diante deste fato, recorre-se conjuntamente a determinação do grau de maturação dos ovócitos avaliando-se características microscópicas como a visualização da posição da vesícula germinativa ou núcleo nos estádios finais de maturação (Bruzka, 1979; Romagosa et al., 1990).

Segundo Vazzoler (1996) e Andrade-Talmelli et. al. (2002) deve-se ressaltar que a maturação final dos ovócitos de peixes é caracterizada pela migração da vesícula germinativa (VG) ou núcleo para a periferia da célula, processo que ocorre a meiose e, os ovócitos encontram-se repletos de vitelo e gotículas de material lipídico (Ramsay e Witthames, 1996; Mylonas et al., 2010). A próxima etapa é caracterizada pelo rompimento da membrana nuclear (quebra da VG) ou desintegração e, posteriormente, o aumento do volume dos ovócitos decorrente da absorção hídrica.

Outro parâmetro considerado para definir com maior precisão os programas de indução a utilizar para cada fêmea, em particular, tem sido o diâmetro (tamanho) dos ovócitos, cujo procedimento prático tem por intenção otimizar os processos reprodutivos (Fenerich-Verani et al., 1984; Romagosa et al., 1990; Torres, 1994; Andrade-Talmelli et al., 2002; Leonardo et al., 2005). Tal técnica foi utilizada pioneiramente por Fenerich-Verani et al. (1984) em exemplares de *Prochilodus scrofa* submetidos a reprodução. O resultado encontrado foi distribuição do tipo unimodal, com moda ao redor de 1100 µm. Da mesma forma, distribuição unimodal foi registrada por Romagosa et al. (1990) em *Piaractus mesopotamicus* e por e Andrade-Talmelli (1997) em *Brycon insignis*. Em contrapartida, para matrinxã, *Brycon cephalus*, Romagosa

et al. (2001) verificaram que fêmeas com alta taxa de fertilização apresentavam ovócitos com duas modas: 939 e 1001 μm .

O importante a ressaltar é que essas características de seleção de peixes aptos a desova foram descritas para os animais mantidos e/ou criados em viveiros escavados. No entanto, segundo Bittencourt et al. (2011) os pacus, *P. mesopotamicus*, confinados em sistema de tanque-rede apresentam, em sua constituição morfológica no período reprodutivo, semelhanças peculiares como ventre abaulado e macio, papila urogenital intumescida e avermelhada, migração da vesícula germinativa para a periferia dos ovócitos, entre outros.

Os trabalhos com as espécies de peixe de interesse zootécnico de clima tropical são necessários a fim de potencializar seus índices reprodutivos quando adaptados em condições ambientais brasileiras (Murgas et al., 2009).

4.7 Indução Hormonal

Um dos principais aspectos para a intensificação da produção piscícola, acompanhada da sustentabilidade tanto econômica como social, é a utilização da propagação artificial ou reprodução induzida (Romagosa, 2006; Narahara et al., 1994) administradas em peixes na fase de dormência (Zaniboni Filho e Weingartner, 2007). As técnicas empregadas nesses procedimentos possibilitam o suprimento de ovos, larvas e alevinos de espécies migradoras (Andrade-Talmelli et al., 2002) destinadas a criação em viveiros e outros corpos hídricos (Bock e Padovani, 2000).

Devido ao grande número de espécies autóctones existentes com suas particularidades biológicas torna-se necessário o aprimoramento dos processos

indutores identificando o intervalo exato na administração hormonal bem como a concentração/dosagem do mesmo que aperfeiçoe, satisfatoriamente, a obtenção de formas jovens (Andrade-Talmelli et al., 2002).

Existem vários tipos de substâncias com singulares estruturas químicas e princípios ativos diferenciados utilizados na indução reprodutiva em peixes de água doce (Pereira et al., 2009). No entanto, a mais empregada e com melhor definição tecnológica é o extrato bruto de hipófises (Bock e Padovani, 2000; Zaniboni Filho e Weingartner, 2007). A gonadotropina apresenta-se em máxima concentração na hipófise no período vitelogênico final e prolonga-se no intervalo de dormência, época ideal para a coleta do material hipofisário para ser administrado nos plantéis reprodutores a fim de complementar a quantidade hormonal produzida pelo peixe receptor (Andrade-Talmelli et al., 2002), sendo responsável pelo final da maturação. Contudo, o viés negativo de tal procedimento é caracterizado pelo custo elevado juntamente a escassez em ocasiões sazonais os quais influenciam a busca por alternativas mais viáveis em termos econômicos e produtivos (Orbolatto et al., 2006).

Romagosa et al. (2001) em estudo da seleção e caracterização de fêmeas de matrinxã, *Brycon cephalus*, utilizaram o extrato bruto hipofisário de carpa comum (EBHC), *Cyprinus carpio*, e constataram, em consonância com outros fatores avaliados, a viabilidade no ciclo reprodutivo com taxas de fertilização e eclosão consideradas dentro dos padrões aceitáveis para a atividade.

Existem, ainda, gonadotrofinas de mamíferos facilmente obtidas no comércio e de baixo custo que podem ser utilizadas na indução a reprodução de peixes (Pereira et al., 2009). Os autores, avaliando a gonadotropina

coriônica equina (eCG) juntamente ao EBHC na desova de curimba, *Prochilodus lineatus*, verificaram que o eCG é ineficiente quando administrado em conjunto ao EBHC para a espécie em questão. Tal fator é elucidado pela suposta ação do composto químico equino ser responsável analogamente ao hormônio folículo estimulante (FSH), tendo possibilidade de maior sucesso quando administrado na dose preparatória e não na final (Pereira et al., 2009).

Em pesquisa semelhante, Andrade-Talmelli et al. (2002) estudaram a ação da gonadotropina coriônica humana (hCG) isoladamente ou em conjunto com o EBHC na reprodução da piabanha, *Brycon insignis*, e definiram que a hCG mostrou-se superior ao EBHC quando aplicada solitariamente e em uma única etapa, proporcionando a ovulação de um grande número de fêmeas.

Além dos mamíferos, substâncias extraídas de outros animais como coelho (EHCo) e frango (EHF) também foram frutos de estudos nos parâmetros reprodutivos masculinos de peixes como o piavuçu, *Leporinus macrocephalus*, a curimba, *P. lineatus*, e a carpa comum, *C. carpio*, e, segundo Moraes et al. (2004) o EHCo não é indicado para indivíduos machos de piavuçu por proporcionar características indesejáveis nos espermatozóides liberados por tal espécie quando induzida com o extrato hipofisário de coelho.

Para algumas espécies ainda não se tem o conhecimento dos hormônios atuantes no período pós-vitelogênico de matrizes/reprodutoras, resultando em falhas no ciclo reprodutivo quando estimuladas com substâncias exógenas. A identificação da obscuridade apresentada no mecanismo que envolve o eixo hipotálamo-hipófise-gonada, responsável pela abstenção de desova em cativeiro, é um passo importante para o desenvolvimento fisiológico

efetivo em terapias hormonais (Mylonas et al., 1997). O mesmo foi verificado para espécies de peixes nativos (Romagosa et al., 2005; Romagosa, 2008).

4.8 Desenvolvimento embrionário

O desenvolvimento embrionário é um processo complexo que exige o conhecimento da ontogenia dos peixes que contribui para o aporte de informações a respeito da biologia, morfologia, fisiologia (Faustino et al., 2011) filogenética e produção (Faustino et al., 2010) das distintas espécies piscícolas. Dessa maneira, serve tanto para experimentos biotecnológicos quanto como bioindicador ambiental para avaliar o efeito das substâncias tóxicas nos organismos aquáticos (Marques et al., 2008; Stekoll et al., 2009). Outro ponto interessante de se salientar é que tal ciência colabora na identificação dos embriões nos ambientes naturais permitindo a avaliação precisa dos locais de desova dos peixes (Reynalte-Tataje et al., 2004).

Os peixes ovíparos apresentam ovócitos envoltos por um envelope (córion, zona radiata) uma simples e espessa proteção que, após a fertilização, transforma-se em um componente insolúvel e enrijecido (Shibata et al., 2003). O processo embriogênico inicia-se quando o ovócito é fertilizado pelo espermatozóide através da micrópila e, então, há uma reorganização dos elementos constituintes dos ovos (Faustino et al., 2010b).

Segundo Nakatani et al. (2001), o desenvolvimento embrionário do pacu, *P. mesopotamicus*, ocorre, resumidamente, da seguinte maneira: formação do blastodisco (com separação posteriormente a fecundação); segmentação (caracterizado por clivagens sequenciais do blastodisco em 2, 4,

8, 16 e assim por diante, originando os blastômeros); blastulação (etapa cujo o blastodisco está estratificado e alto, com pequenas cavidades entre os blastômeros e presença de uma lâmina sincicial perivitelínica); gastrulação (células do blastodisco deslocam-se e separam-se em epiblasto (futuro folheto externo) e hipablasto (notocorda, meso e endoderme)); fechamento do blastóporo (recobrimento de três regiões do vitelo: zona embriogênica (corpo do embrião, exceto a cauda), bordas de fechamento (porção caudal) e parede do saco vitelínico); vesícula ótica; vesícula auditiva (aparecimento dos otólitos); liberação da cauda; e eclosão (ocorre através de contrações musculares vigorosas da cauda e do corpo).

No entanto, as diversas espécies de peixe apresentam diferenças quanto ao seu desenvolvimento inicial. Cardoso et al. (1995) estudaram a embriogênese de *Pseudoplatystoma corruscans* e concluíram que essa etapa é composta por nove fases, sendo elas: formação do blastodisco; blástula superior; blástula inferior; gástrula; fechamento do blastóporo; vesículas óticas; vesículas auditivas e de Kupffer; aberturas olfativas e otólitos; e eclosão. Em contrapartida, Faustino et al. (2010), verificaram que o desenvolvimento embrionário de híbridos de *P. corruscans* X *P. fasciatum* é compreendido por sete passos, sendo eles: zigoto; clivagem; mórula; blástula; gástrula; histogênese e organogênese; e eclosão. Para o *Brycon gouldingi*, Faustino et al. (2010b) encontraram seis etapas distintas em seu desenvolvimento, sendo elas: zigoto; clivagem (incluindo a fase de mórula); blástula; gástrula; histogênese e organogênese; e eclosão.

Os conhecimentos acerca do desenvolvimento embrionário de espécies nativas permanecem como um entrave para o aprimoramento das

técnicas de cultivo (Luz et al., 2001) todavia podem trazer benefícios a sua produção (Streit Júnior et al., 2007). Muitos estudos com larvas de peixe enfocam a sistemática e a filogenia, porém nada se tem feito a respeito do desenvolvimento morfológico em relação a sua função (Paes et al., 2001). Do ponto de vista biológico, cada passo da embriogênese apresenta grande importância, pois os embriões são suscetíveis as alterações ambientais (Pereira et al., 2006). Pesquisas nesse setor têm evidenciado assincronismo nas etapas iniciais da embriogênese em ovos provenientes da mesma desova (Kimmel et al., 1995).

Vários trabalhos estão sendo conduzidos para avaliar o efeito de xenobióticos, das variáveis abióticas, entre outras coisas, no ambiente de criação, porém aqueles em que a nutrição seja o ponto principal no desenvolvimento embrionário de espécies de peixes permanecem escassos.

5.0 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Fundamentar o conhecimento das necessidades proteicas de fêmeas de pacu, *Piaractus mesopotamicus* avaliando-se a qualidade dos ovócitos, seus índices reprodutivos e a ontogenia dos embriões quando mantidas em tanques-rede.

5.2 Objetivos específicos

Avaliar as fêmeas (matrizes) de pacu, *Piaractus mesopotamicus* aptas à indução hormonal, com base nas observações externas associadas à diâmetro e morfologia dos ovócitos e, verificar também, o efeito do extrato hipofisário na ovulação e desova, quando alimentadas com dietas contendo diferentes níveis proteicos.

Estimar as taxas de fertilização e eclosão dos ovos de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (matrizes), alimentados com dietas contendo diferentes níveis protéicos.

Avaliar o desenvolvimento embrionário e larval do pacu, *Piaractus mesopotamicus* proveniente de matrizes mantidas em tanques-rede.

6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIDIN, M.Z.; HASHIM, R.; CHIEN, A.C.S. Influence of dietary protein levels on growth and egg quality in broodstock female bagrid catfish (*Mystus nemurus* Cuv. & Val.). **Aquaculture Research**, v.37, p.416-418, 2006.

ABIMORAD, E.G.; CARNEIRO, D.J. Digestibility and performance of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) juveniles — fed diets containing different protein, lipid and carbohydrate levels. **Aquaculture Nutrition**, v.13, p.1–9, 2007.

ADEWUMI, A.A. The growth and gonadal maturation of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell) broodstock fed differently heated soybean-based diets. **Aquaculture Nutrition**, v.12; p.267–274, 2006.

AFZAL KHAN, M.; JAFRI, A.K.; CHADHA, N.K. Effects of varying dietary protein levels on growth, reproductive performance, body and egg composition of rohu, *Labeo rohita* (Hamilton). **Aquaculture Nutrition**, v.11, p.11-17, 2005.

ALMEIDA, L.C.; AVILEZ, I.M.; HONORATO, C.A.; HORI, T.S.F.; MORAES, G. Growth and metabolic responses of tambaqui (*Colossoma macropomum*) fed different levels of protein and lipid. **Aquaculture Nutrition**, v.17, p.253-262, 2011.

ANDRADE, D.R.; YASUI, G.S. O manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, p.166-172, 2003.

ANDRADE, V.X.L.; HONJI, R.M.; ROMAGOSA, E. Processo de maturação das gônadas de *Pseudoplatystoma corruscans* alimentados com dietas contendo diferentes níveis protéicos e suplementados com óleo de milho. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, p.1 - 6, 2010.

ANDRADE-TALMELLI, E.F.; KAVAMOTO, E.T.; NARAHARA, M.Y.; FENERICH-VERANI, N. Reprodução induzida da piabanha, *Brycon insignis* (Steindachner, 1876), mantida em cativeiro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.2, p.803-811, 2002 (suplemento).

ANTUNES, S.A. Recentes avanços e perspectivas da industrialização do pescado de água doce. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE PEIXES, 2, Piracicaba, SP, 1997. **Anais...** Piracicaba: CBNA, 1997, p.131-136.

ARBELÁEZ -ROJAS, G.A.; FRACALLOSSI, D.M.; FIM, J.D.I. Body composition of tambaqui, *Colossoma macropomum*, and matrinxã, *Brycon cephalus* when raised in intensive (Igarapé Channel) and semi-intensive (Pond) culture systems. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, 1059–1069, 2002.

AYROZA, L.M.S. Criação de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* em tanques-rede, na Usina Hidrelétrica de Chavantes, Rio Paranapanema, SP/PR.

Jaboticabal, São Paulo. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Jaboticabal, SP. Tese de Doutorado. 2009.

AYROZA, D.M.M.R.; FURLANETO, F.P.B.; AYROSA, L.M.S. Regularização dos projetos de tanques-rede em águas públicas continentais de domínio da União no estado de São Paulo. **Boletim Técnico do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 36, p. 131, 2006.

AYROZA, D.M.M.R. DE; FURLANETO, F.P.B.; AYROZA, L.M.S. Regulamentação do acesso territorial aos tanques-rede em áreas de preservação permanente – APP, no estado de São Paulo. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, 15, 90: 63-65, 2005.

BABIN, P.; CERDÀ, J.; LUBZENS, E. The fish oocyte from basic studies to biotechnological applications. Springer, The Netherlands. 2007.

BALDISSEROTO, B.; RADÜNZ NETO, J. **Criação de jundiá**. Santa Maria: Ed. UFSM, 2004. 232p.

BENKE, B. et al. Características morfométricas e rendimento de cortes da carne do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) cultivado em tanques-rede no reservatório de Itaipu. In: CONBEP – Congresso Brasileiro de Engenharia de Pesca, 14, Fortaleza, 2005. **Anais...** Fortaleza, 2005.

BERNARDINO, G.; FERRARI, V.A. Indução para ovulação do tambaqui, *Colossoma macropomum*, usando dois análogos LHRHa. **Síntese dos trabalhos realizados com espécies do gênero *Colossoma***. CEPTA: Pirassununga, p.13, 1986.

BEVERIDGE, M.C.M. **Cage aquaculture**. Cambridge, Inglaterra: Fishing News Books, 1996. 351p.

BITTENCOURT, F.; LUI, T.A.; SOUZA, B.E.; BOSCOLO, W.R.; FEIDEN, A.; ROMAGOSA, E. **Crude protein can affect the oocytes evolution of pacu, *Piaractus mesopotamicus*, kept in cages**. In.: 3th International Workshop on the Biology of Fish Gametes, Budapest, Hungary... 3th International Workshop on the Biology of Fish Gametes 2011.

BITTENCOURT, F.; FEIDEN, A.; SIGNOR, A.A.; BOSCOLO, W.R.; FREITAS, J.M.A. Proteína e energia em rações para alevinos de piavuçu. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.12, 2010.

BITTENCOURT, F.; FEIDEN, A.; SIGNOR, A.A.; BOSCOLO, W.R.; LORENZ, E.K.; MALUF, M.L.F. Densidade de estocagem e parâmetros eritrocitários do pacu criado em tanque-rede. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.11, p.2323-2329, 2010.

BITTENCOURT, F.; SOUZA, B.E.; BOSCOLO, W.R.; LUI, T.A.; LÖSCH, J.A.; FEIDEN, A. ROMAGOSA, E. **Indicadores reprodutivos de fêmeas de pacu**

Piaractus mesopotamicus, **alimentadas com dietas protéicas distintas em tanques-rede**. In.: Congresso da Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática - AQUACIÊNCIA 2010, Recife... Anais de Resumos Aquacultura 2010.

BLYTHE, W.G.; HELFRICH, L.A.; SULLIVAN, C.V. Sex steroid hormone and vitellogenin levels in striped bass (*Morone saxatilis*) maturing under 6-, 9-, and 12-month photothermal cycles. **General and Comparative Endocrinology**, v.94, p.122-134, 1994.

BOCK, C.L.; PADOVANI, C.R. Considerações sobre a reprodução artificial e alevinagem de pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) em viveiros. **Acta Scientiarum**, v.22, p.495-501, 2000.

BORGHETTI, J.R.; CANZI, C. The effect of water temperature and feeding rate on the growth rate of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) raised in cages. **Aquaculture**, v.114, p.93-101, 1993.

BOSCOLO, W.R. **Farinha de resíduos da indústria de filetagem de tilápias na alimentação da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.)**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2003. 98p. Tese (Doutorado em Produção Animal) – UEM, 2003.

BOSCOLO, W. R. et al. Digestibilidade aparente da energia e nutrientes de alimentos convencionais e alternativos para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, L.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.13, n.2, p.539-545, 2002.

BOZANO, L.N.; CYRINO, J.E.P. Produção intensiva de peixes em tanques-rede e gaiolas. **Panorama da aquicultura**, v.9, n.56, p.25-30, 1999.

BROWN, M.R.; BATTAGLENE, S.C.; MOREHEAD, D.T.; BROCK, M. Ontogenetic changes in amino acid and vitamins during early larval stages of striped trumpeter (*Latris lineata*). **Aquaculture**, v.248, p.263– 274, 2005.

BRUZSKA, E. The *in vivo* method of estimating the stages of oocyte maturation in carp (*Cyprinus carpio* L.). **Acta Hydrobiol**, v.21, p.423-433, 1979.

BUENO, G.W.; Marengoni, N.G.; Gonçalves Júnior, A.C.; Boscolo, W.R.; Teixeira, R.A. Estado trófico e bioacumulação do fósforo total no cultivo de peixes em tanques-rede na área aquícola do reservatório de Itaipu. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v.30, n.3, p.237-243, 2008.

CANTELMO, O.A. **Níveis de proteína e energia para o crescimento do pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887)**. Florianópolis, 1993. 55p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina, 1993.

CARDOSO, E.L.; FERREIRA, R.M.A.; PEREIRA, T.A.; CARDOSO, M.M.F. Cultivo de peixes em tanques-rede: EPAMIG/IEF. In: CARDOSO, E. L & FERREIRA, R.M.A. **Cultivo de peixes em tanques-rede: desafios e oportunidades para o desenvolvimento sustentável**. EPAMIG, Minas Gerais. p.9-22, 2005.

CARDOSO, E.L.; ALVES, M.S.D.; FERREIRA, R.M.A.; GODINHO, H.P. Embryogenesis of the neotropical freshwater Siluriforme *Pseudoplatystoma coruscans*. **Aquatic Living Resource**, v.8, p.343-346, 1995.

CARNEIRO, P.C.F.; BENDHACK, F.; MIKOS, J.D.; SCHORER, M.; OLIVEIRA FILHO, P.; BALDISSEROTTO, B.; GOLOMBIESKI, J.I. Jundiá: um grande peixe para a região do sul. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, 12, 69: 41-46, 2002.

CASTAGNOLLI, N. Piscicultura Intensiva e Sustentável. In: VALENTI, W.C.; POLI, C.R.; PEREIRA, J.A. et al. **Aquicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável**. Brasília: CNPq/Ministério da Ciência e Tecnologia, 2000. 399p.

CASTAGNOLLI, N.; DONALDSON, E.M. Induced ovulation and rearing of the pacu (*Colossoma mitrei*). **Aquaculture**, v.25, p.275-279, 1981.

CAVERO, B.A.S. PEREIRA-FILHO, M.; ROUBACH, R.; ITUASSÚ, D.R.; GANDRA, A.L.; CRESCÊNCIO, R. Biomassa sustentável de juvenis de

pirarucu em tanques-rede de pequeno volume. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 6, p.723-728, 2003.

CECCARELLI, P.S.; SENHORINI, J.A.; VOLPATO, G. **Dicas em piscicultura: perguntas e respostas**. Botucatu:Santana Gráfica Editora, 2000. 247p.

ÇEK, S.; YILMAZ, E. Gonad development and sex ratio of sharptooth catfish (*Clarias gariepinus* Burchell, 1822) cultured under laboratory conditions. **Turkey Journal of Zoology**, v.31, p.35-46, 2007.

CHAPOVETSKY, V.; GATTEGNO, T.; ADMON, A. Proteomics analysis of the developing fish oocyte. In: BABIN, P.J.; CERDÀ, J.; LUBZENS, E. The fish oocyte: from basic studies to biotechnological applications. Netherlands: **Springer**, 2007. 508p.

CHONG, A.S.C.; ISHAK, S.D.; Osman, Z.; Hashim, R. Effect of dietary protein level on the reproductive performance of female swordtails *Xiphophorus helleri* (Poeciliidae). **Aquaculture**, v.234, p.381–392, 2004.

CLARK, A.E.; WATANABE, W.O.; OLLA, B.L.; WICKLUND, R.I. Growth, feed conversion and protein utilization of Florida red tilapia fed isocaloric diets with different protein levels in seawater pools. **Aquaculture**, v.88 p.75-85, 1990.

COWARD, K.; BROMAGE, N.R. Histological classification of oocyte growth and the dynamics of ovarian recrudescence in *Tilapia zillii*. **Journal of Fish Biology**, v.53, p.285–302, 1998.

CYRINO, J.E.; BICUDO, A.J.A.; SADO, R.Y.; BORGHESI, R.; DAIRIKI, J.K. A piscicultura e o ambiente – o uso de alimentos ambientalmente corretos em piscicultura. **R. Bras. Zootec.**, v.39, p.68-87, 2010 (supl. especial).

DOROSTGHOAL, M.; PEYGHAN, R.; PAPAN, F.; KHALILI, L. Macroscopic and microscopic studies of annual ovarian maturation cycle of Shirbot *Barbus grypus* in Karoon river of Iran. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v.10, p.172-179, 2009.

DRUMMOND, C.D.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E. Postovulatory follicle: a model for experimental studies of programmed cell death or apoptosis in teleosts. **Journal of Experimental Zoology**, v.287, p.176-182, 2000.

DZIEWULSKA, K.; DOMAGAZA, J. Differentiation of gonad maturation in sibling precocious males of the sea trout (*Salmo trutta m. trutta* L.) in their first year of life. **Aquaculture**, v.250, p.713– 725, 2005.

EL-SAYED, A. F. M. Alternative dietary protein sources for farmed tilapia, *Oreochromis* spp. **Aquaculture**, v.179, p.149-168, 1999.

FARIA, R.H.S.; SOUZA, M.L.R.; WAGNER, P.M.; POVH, J.A.; RIBEIRO, R.P. Rendimento do processamento da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1757) e do pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v.25, n.1, p.21-24, 2003.

FAUSTINO, F.; NAKAGHI, L.S.O., MARQUES, C.; GANECO, L.N.; MAKINO, L.C. Structural and ultrastructural characterization of the embryonic development of *Pseudoplatystoma* spp. hybrids. **International Journal of Developmental Biology**, v.54, p.723-730, 2010a.

FAUSTINO, F.; NAKAGHI, L.S.O.; NEUMANN, E. *Brycon gouldingi* (Teleostei, Characidae): aspects of the embryonic development in a new fish species with aquaculture potential. **Zygote**, v.19, p.1-13, 2010b.

FENERICH-VERANI, N.; GODINHO, H.M.; NARAHARA, M.Y. The size composition of the eggs of curimbata, *Prochilodus scrofa* Steindachner 1881, induced to spawn with human chorionic gonadotropin (HCG). **Aquaculture**, v.42, p.37-41, 1984.

FERNANDES, J.B.K.; CARNEIRO, D.J.; SAKOMURA, N.K. Fontes e Níveis de Proteína Bruta em Dietas para Juvenis de Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.3, p.617-626, 2001.

FERNANDES, J.B.K. et al. Fontes e níveis de proteína bruta em dietas para alevinos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.3, p.246-253, 2000.

FLAMM, B. World forestry. Amazonian fruit-eating fish and the várzea forest. **Journal of Forestry**, p.106-109, 1983.

GANECO, L.N.; NAKAGHI, L.S.O.; URBINATI, E.C.; DUMONT NETO, R.; VASQUES, L.H. Análise morfológica do desenvolvimento ovocitário de piracanjuba, *Brycon orbignyanus*, durante o ciclo reprodutivo. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.27, p.131-138, 2001.

GODINHO, H.M.; FENERICH, N.A.; NARAHARA, M.Y.; BARKER, J.M. 1977. Sobre a reprodução induzida do pacu, *Colossoma mitrei* (Berg, 1885). **Ciência e Cultura**, v.29, n.7, p.796-797, 1977 (Suplemento)

GODINHO, H.P.; GODINHO, A.L. Induced spawning of pacu, *Colossoma mitrei* (Berg., 1895), by hypophysation with crude carp pituitary extract. **Aquaculture**, v.55, p.69-73, 1986.

GUNASEKERA, R.M.; SHIM, K.F.; LAM, T.J. Influence of dietary protein content on the distribution of amino acids in oocytes, serum and muscle of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **Aquaculture**, v.152, p.205-221, 1997.

GUNASEKERA, R.M.; SHINM, K.F.; LAM, T.J. Influence of protein content of broodstock diets on larval quality and performance in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **Aquaculture**, v.146, p.245-259, 1996.

IZEL, A.C.U.; PEREIRA-FILHO, M.; MELO, L.A.S.; MACÊDO, J.L.V. Avaliação de níveis protéicos para a nutrição de juvenis de Matrinxã (*Brycon cephalus*). **Acta Amazonica**, v.34, n.2, p.179-184, 2004.

IZQUIERDO, M.S.; FERNÁNDEZ-PALACIOS, H.; TACON, A.G.J. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. **Aquaculture**, v.197, p.25–42, 2001.

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

KING, H.R.; PANKHURST, N.W. Ovarian growth and plasma sex steroid and vitellogenin profiles during vitellogenesis in Tasmanian female Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, v.219, p.797–813, 2003.

KJORSVIK, E.; LONNING, S. Effects of egg quality on normal fertilization and early development of the cod, *Gadus morhua* L. **Journal of Fish Biology**, v. 23, p.1 –12, 1983.

KUBITZA, F. **Tilápia**: tecnologia e planejamento na produção comercial. Jundiaí: F. Kubitza, 2000. 285p.

LAZZARI, R.; NETO, R. J.; CORRÊA, V.; SUTILI, F. J. VEIVERBERG, C. A.; BERGAMIN, G. T.; FERREIRA, C. C. Estudos de correlação entre rendimento de cortes e índices digestivos em jundiás criados em diferentes densidades. In: Workshop sobre Jundiá, 2007, Santa Maria. **Resumos...**, p.2, 2007.

LE CREN, E.D. The length-weight relationship and seasonal cycle in gonad weight and condition in the perch (*Perca fluviatilis*). **Journal of Animal Ecology**, v.20, p.201-209, 1951.

LEONARDO, A.F.G.; ROMAGOSA, E.; BATLOUNI, S.R.; BORELLA, M.I. Characterization and hormonal efficiency in female cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766), kept in captivity. **Aquaculture**, v.42, p.451-461, 2005.

LEONARDO, A.F.G.; ROMAGOSA, E.; BATLOUNI, S.R.; BORELLA, M.I. Characterization and hormonal efficiency in female cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766), kept in captivity. **Aquaculture**, v.42, p.451-461, 2004.

LOCHMANN, S.E.; GOODWIN, K.J.; LOCHMANN, R.T.; STONE, N.M.; CLEMENT, T. Volume and lipid, fatty acid, and amino acid composition of golden shiner eggs during a spawning season. **North American Journal of Aquaculture**, v.69, p.116–126, 2007.

LOVELL, R.T. Nutrition of aquaculture species. **Journal of Animal Science**, v.69, p.4193-4200, 1991.

LUZ, R.K.; REYNALTE-TATAJE, D.A.; FERREIRA, A.A.; ZANIBONI FILHO, E. Desenvolvimento embrionário e estágios larvais do mandi-amarelo *Pimelodus maculatus*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 27, p. 49-55, 2001.

MAÑANOS, E.; DUNCAN, N.; MYLONAS, C. Reproduction and control of ovulation, spermiation and spawning in cultured fish. *In*: CABRITA, E.; ROBLES, V.; HERRÁEZ, P. **Methods in reproductive aquaculture: marine and freshwater species**. Boca Raton: CRC Press, 2009. 549p.

MARENGONI, N.G. Produção de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* (linhagem chitralada), cultivada em tanques rede, sob diferentes densidades de estocagem. **Archivos de Zootecnia**. v.55, p.127-138, 2006.

MARQUES, C.; NAKAGHI, L.S.O.; FAUSTINO, F.; GANECO, L.N.; SENHORINI, J.A. Observation of the embryonic development in *Pseudoplatystoma coruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) under light and scanning electron microscopy. **Zygote**, v.16, p. 333-342, 2008.

MARUYAMA, L.S.; CASTRO, P.M.G.; PAIVA, P. Pesca artesanal no médio e baixo tietê, são paulo, brasil: aspectos estruturais e socioeconômicos. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, p.61-81, 2009.

MORAES, G.V.; STREIT JR, D.P.; RIBEIRO, R.P.; SAKAGUTI, E.S.; SOUZA, E.D.; POVH, J.A. Ação de diferentes indutores reprodutivos hormonais no aparecimento de anormalidades morfológicas em espermatozóides de piavuçu (*Leporinus macrocephalus*), curimatá (*Prochilodus lineatus*) e carpa comum (*Cyprinus carpio*). **Boletim do Instituto de Pesca**, v.30, p.109-116, 2004.

MURGAS, L.D.S.; DRUMOND, M.M.; PEREIRA, G.J.M.; FELIZARDO, V.O. Manipulação do ciclo e da eficiência reprodutiva em espécies nativas de peixes de água doce. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Suplemento, n.6, p.70-76, 2009.

MYLONAS, C.C.; FOSTIER, A.; ZANUY, S. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. **General and Comparative Endocrinology**, v.195, n.3, p.516-534, 2010.

MYLONAS, C.C.; MAGNUS, Y.; KLEBANOV, Y.; GISSIS, A.; ZOHAR, Y. Reproductive biology and endocrine regulation of final oocyte maturation of captive white bass. **Journal of Fish Biology**, v.51, p.234–250, 1997.

NAGAHAMA, Y.; YAMASHITA M. Regulation of oocyte maturation in fish. **Development, Growth and Differentiation**, v.50, p.195–219, 2008.

NAKATANI, K.; AGOSTINHO, A.A.; BAUMGARTNER, G.; BIALETZKI, A.; SANCHES, P.V.; MAKRAKIS, M.C.; PAVANILLI, C.S. **Ovos e larvas de peixes de água doce**. Maringá: EDUEM, Universidade Estadual de Maringá. 2001. 378p.

NARAHARA, M.Y.; ANDRADE-TALMELLI, E.F.; KAVAMOTO, E.T.; GODINHO, H.M. Reprodução Induzida da Pirapitinga-do-Sul, *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819), Mantida em Condições de Confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.3, p.1070-1075, 2002.

NARAHARA, M.Y.; KAVAMOTO, E.T.; GODINHO, H.M. Pesquisas sobre a criação de espécies do gênero *Brycon*, no Instituto de Pesca. In: SEMINÁRIO SOBRE A CRIAÇÃO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Brycon*, 1., 1994, Pirassununga, SP. **Anais...** Pirassununga: 1994. p.5-6.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of warmwater, fishes and shellfishes: nutrient requirements of domestic animals.** Washington, 1993, 114p.

NG, W.K.; SOON, S.C.; HASHIM, R. The dietary protein requirement of a bagrid catfish, *Mystus nemurus* (Cuvier & Valenciennes), determined using semipurified diets of varying protein level. **Aquaculture Nutrition**, v.7, p.45-51, 2001.

NORDEIDE, J.T. Is there more in 'gamete quality' than quality of the gametes? A review of effects of female mate choice and genetic compatibility on offspring quality. **Aquaculture Research**, v.38, p.1-16, 2007.

OKADA, E. K.; GREGORIS, J.; AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C. Diagnóstico da pesca profissional em dois reservatórios do rio Iguaçu. In: AGOSTINHO, A.A., GOMES, L. C. **Reservatório de Segredo: bases ecológicas para o manejo.** Maringá: Eduem. p. 293-316. 1997.

ONO, E.A.; KUBITZA, F. **Cultivo de peixes em tanques-rede**. 2 ed. Jundiaí : F. Kubitza, 1999. 68p.

ORBOLATO, T.S.; GIRARDI, L.; AQUINO SILVA; M.R.; FIORINI, M.P. Reprodução induzida do lambari, *Astyanax bimaculatus*(Linnaeus,1758). In: X ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E VI ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 2006, São José dos Campos, SP. **Anais...** São José dos Campos: 2006. p.212-215.

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**, p.1-8, 2011.

PEREIRA, C.R.; BARCELLOS, L.J.G.; KREUTZ, L.C.; QUEVEDO, R.M.; RITTER, F.; SILVA, L.B. Embryonic and larval development of jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard, 1824, Pisces, Teleostei), a south american catfish. **Brazilian Journal of Biology**, v.66, p.1057-1063, 2006.

PEREIRA, G.J.M.; MURGAS, L.D.S.; SILVA, J.M.A.; MILIORINI, A.B.; LOGATO, P.V.R.; LIMA, D. Indução da desova de curimba (*Prochilodus lineatus*) utilizando eCG e EBHC. **Revista Ceres**, v.56, p.156-160, 2009.

PEZZATO, L.E.; MIRANDA, E.C.; BARROS, M.M.; PINTO, L.G.Q.; FURUYA, L.E.; PEZZATO, A.C. Digestibilidade aparente de ingredientes pela tilápia do

Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.31, n.4, p.1595-1604, 2002.

PEZZATO, L.E. Alimentação de peixes - Relação custo benefício. **Anais...** In: REUNIÃO ANUAL SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 37, 1999, Porto Alegre. Porto Alegre: SBZ, p. 109-118. 1999.

PROENÇA, C.E.M.; BITTENCOURT, P.R.L. **Manual de piscicultura tropical**. Brasília, 196p. 1994.

RAMSAY, K.; WITTHAMES, P. Using oocytes size to assess seasonal ovarian development in *Solea solea* (L.). **Journal of Sea Research**, v.36, n.3/4, p.275-283, 1996.

REIDEL, A.; BOSCOLO, W.R.; FEIDEN, A.; ROMAGOSA, E. The effect of diets with different levels of protein and energy on the process of final maturation of the gametes of *Rhamdia quelen* stocked in cages. **Aquaculture**, v.298, p.354–359, 2010.

REYNALTE-TATAJE, D.; ZANIBONI-FILHO, E.; ESQUIVEL, J.R. Embryonic and larvae development of piracanjuba, *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1849 (Pisces, Characidae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 26, p. 67-71, 2004.

ROMAGOSA, E. Reproductive status in females of the Brazilian catfish, *Pseudoplatystoma fasciatum* reared in cages. **Journal of Applied Ichthyology**, v.26, p.806–811, 2010.

ROMAGOSA, E. Avanços na reprodução de peixes migradores. In: **Tópicos especiais em biologia aquática e aquicultura**. SÃO PAULO:JABOTICABAL, 2008, v. único, capítulo 3, p.1-16.

ROMAGOSA, E. Biologia reprodutiva e fisiologia de peixes em confinamento: o cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* como modelo. Páginas. 108-116 in *Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aquicultura*. JE.C.Cyrino, e E.C.Urbinati.. AquaCiência 2004, Jaboticabal, SP., 2006.

ROMAGOSA, E.; BATLOUNI, S.R.; BORELLA, M.I.; LEONARDO, A.F.G. Involução dos folículos pós-ovulatórios em *Pseudoplatystoma fasciatum* (PISCES, TELEOSTEI). **Boletim do Instituto de Pesca**, v.31, p.129-135, 2005.

ROMAGOSA, E.; NARAHARA, M.Y.; BORELLA, M.I.; FENERICH-VERANI, N. Seleção e caracterização de fêmeas de matrinxã, *Brycon cephalus*, induzidas a reprodução. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.27, p.139-147, 2001.

ROMAGOSA, E. Mudanças morfológicas (microscopia de luz e eletrônica) das gônadas do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), durante o ciclo reprodutivo, em condições de confinamento. Rio Claro, SP. Universidade

Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Rio Claro, SP. Tese de Doutorado. 1998.

ROMAGOSA, E. Desenvolvimento gonadal (morfologia; ultra-estrutura) e indução da reprodução do matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869) em cativeiro. Vale do Ribeira, São Paulo. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP. Dissertação de Mestrado. 1996.

ROMAGOSA, E.; PAIVA, P. DE; GODINHO, H.M. Pattern of oocyte diameter frequency distribution in females of the pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887) (= *Colossoma mitrei* Berg 1895), induced to spawn. **Aquaculture**, v.86, p.105-110, 1990.

ROMAGOSA, E.; PAIVA, P.; CESTAROLLI, M.A. Reprodução induzida de pacu *Colossoma mitrei*, Berg., 1895, mantido em condições de cultivo intensivo. **Ciência e Cultura**, v.37, n.7, p.849, 1985a.

ROMAGOSA, E.; PAIVA, P.; GODINHO, H.M.. Indução da reprodução de pacu, *Colossoma mitrei* Berg., 1895, em primeira maturação gonadal, mantido sob condições de cultivo intensivo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA DE PESCA, Curitiba. **Anais...** Curitiba: 1985b. p.55.

SÁ, M.V.C.; FRACALLOSSI, D.M. Exigência protéica e relação energia/proteína para alevinos de Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.1, p.1-10, 2002.

SALHIA, M.; BESSONARTA, M.; CHEDIAKB, G.; BELLAGAMBA, M.; CARNEVIA, D. Growth, feed utilization and body composition of black catfish, *Rhamdia quelen*, fry fed diets containing different protein and energy levels. **Aquaculture**, v.231, p.435–444, 2004.

SAMPAIO, E.V.; SATO, Y. Aspectos reprodutivos de *Ieporinus piau* Fowler, 1941 (osteichthyes, anostomidae) da bacia do rio São Francisco, submetido à desova induzida. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, n.1, p.157-165, 2009.

SHIBATA, Y.; NAGAHAMA, Y.; YOSHIKUNI, M. An astacin-like protease, alveolin, is released from cortical vesicles and induces changes in egg envelope proteins during fertilization of medaka (*Oryzias latipes*) eggs. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.28, p.365, 2003.

SIDDIQUI, A.Q.; AL-HAFEDH, Y.S.; ALI, S.A. Effect of dietary protein level on the reproductive performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L). **Aquaculture Research**, v.29, p.349-358, 1998.

SIGNOR, A.A.; BOSCOLO, W.R.; FEIDEN, A.; BITTENCOURT, F. COLDEBELLA, A.; REIDEL, A. Proteína e energia na alimentação de pacus criados em tanques-rede. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.11, p.2336-2341, 2010.

SILVA, A.L.N.; SIQUEIRA, A. T. **Piscicultura em tanques-redes: princípios básicos**. Recife: UFRPE, 1997. 72 p.

SILVA, J.M.A.; MURGAS, L.D.S.; FELIZARDO, V.O.; PEREIRA, G.J.M.; NAVARRO, R.D.; MELLO, R.A. Características seminais e índices reprodutivos de curimba (*Prochilodus lineatus*) em diferentes períodos reprodutivos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.10, p 668-677, 2009.

SIMPSON, A. C. The fecundity of the plaice. **Fishery Investigation**, v.2 ,n.17, p.27, 1951.

SINK, T.D.; LOCHMANN, R.T.; POHLENZ, C.; BUENTELLO, A.; GATLIN III, D. Effects of dietary protein source and protein–lipid source interaction on channel catfish (*Ictalurus punctatus*) egg biochemical composition, egg production and quality, and fry hatching percentage and performance. **Aquaculture**, v.298 p.251–259, 2010.

SOLÈ, M.; PORTE, C.; BARCELÓ, D. Analysis of the estrogenic activity of sewage treatment works and receiving waters using vitellogenin induction in fish as a biomarker. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 20, p.518-525, 2001.

SOUZA, B.E.; BITTENCOURT, F.; LUI, T.A.; LÖSCH, J.A.; LORENZ, E.K.; FEIDEN, A.; Boscolo, W.R.; Romagosa, E. Tanques-rede: Reprodução induzida do pacu, *Piaractus mesopotamicus*. **Anais...In: Congresso da**

Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, IV, 2010, Recife, Aquaciência, 2010.

STEKOLL, M.S.; SMOKER, W.W.; FAILOR-ROUNDS, B.J.; WANG, I.A.; JOYCE, V.J. Response of the early developmental stages of hatchery reared salmonids to major ions in a simulated mine effluent. **Aquaculture**, v.298, p.172–181, 2009.

STOECKEL, J. N. A method for viewing the germinal vesicle in oocytes of commercial catfishes. **North American Journal of Aquaculture**, v.62, p.240-247, 2000.

STREIT JÚNIOR, D.P.; DIGMAYER, M.; RIBEIRO, R.P.; SIROL, R.N.; MORAES, G.V.; GALO, J.M. Embriões de pacu submetidos a diferentes protocolos de resfriamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.1199-1202, 2007.

TAKAHASHI, E.L.H.; GOITEIN, R.; NAKAGHI, L.S.O. Maturidade do ovário no cascudo *Hypostomus strigaticeps* (Siluriformes, Loricaridae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 30, p.107-112, 2008.

TAKEMURA, A.; KIM, B.H. Effects of estradiol-17 β treatment on in vitro and in vivo synthesis of two distinct vitellogenins in tilapia. **Comparative Biochemistry and Physiology**, part A, v.129, p.641–651, 2001.

TORRES, W.V. Efeito de dietas com níveis crescentes de proteína e energia na evolução ovocitária da pirapitinga, *Piaractus brachypomus* (CUVIER, 1818). Florianópolis, Santa Catarina. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC. Dissertação de Mestrado. 1994.

TYLER, C.R.; SUMPTER, J.P.; BROMAGE, N.R. In vivo ovarian uptake and processing of vitellogenin in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Journal of Experimental Zoology**, v.246, p.171–179, 1988.

URBINATI E. C.; GONÇALVES F. D. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. 2. ed. rev. ampl. Santa Maria: Editora UFSM, 2010. 608p.

VAZZOLER A.E.A.M. Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática. Maringá: **EDUEM/NUPÉLIA**, 1996. 169p.

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

WASHBURN, B.S.; FRYE, D.J.; HUNG, S.S.O.; DOROSHOV, S.I. Dietary effects on tissue composition, oogenesis and reproductive performance of female rainbow trout (*Onkorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.90, p.179-195, 1990.

ZANIBONI FILHO, E.; WEINGARTNER, M. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.3, p.367-373, 2007.

ZANIBONI-FILHO, E. Z.; NUÑER, A. P. O.; GUERESCHI, R. M.; HERMES-SILVA, S. Cultivo de peixes em tanques-rede e impactos ambientais. In: CARDOSO, E. L & FERREIRA, R. M. A. **Cultivo de peixes em tanques-rede: desafios e oportunidades para o desenvolvimento sustentável**. EPAMIG, Minas Gerais, p. 57-80, 2005.

ZANIBONI-FILHO, E. Larvicultura de peixes. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, 21, 203, p. 69-77, mar./abr. 2000.

ZAVALA-CAMIN, L.A. **Introdução aos estudos sobre alimentação natural em peixes**. Maringá: EDUEM, 1996. 129p.

ZIMMERMANN, S.; FITZSIMMONS, K. Tilapicultura intensiva. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSSO, D.M. et al. **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo : TecArt, 2004. p.533.

7.0 ARTIGO 1 – Enviado ao Journal of Applied Ichthyology (no prelo)

7.1. Dietas protéicas promovem a maturação dos ovócitos e desova em

Piaractus mesopotamicus estocado em tanques-rede

Resumo: O conhecimento da nutrição de reprodutores de espécies nativas brasileiras é incipiente, portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o preparo de dietas balanceadas que possibilitem promover a maturação dos ovócitos, bem como, potencializar o desempenho reprodutivo de *P. mesopotamicus* em tanques-rede. Para tanto, foram distribuídas em um delineamento inteiramente casualizado 224 matrizes em 16 tanques-rede de 5 m³. Os tratamentos consistiram em dietas contendo 18, 24, 30 e 36% de proteína bruta (PB) fornecidas a vontade. Foram avaliadas as características morfológicas externas e internas dos exemplares e seus respectivos parâmetros reprodutivos como, posição da vesícula germinativa, distribuição de frequência porcentual dos diâmetros dos ovócitos, taxas de fertilização e eclosão, número de ovócitos liberados, número total de ovócitos, peso dos ovários remanescentes e total, índice gonadossomático (IGS), fator de condição (K) e histologia dos ovócitos e ovários pós-desova e em regressão ovariana. A distribuição da frequência porcentual dos diâmetros dos ovócitos coletados antes da 1ª aplicação hormonal apresentou comportamento unimodal para o menor teor protéico e tendências polimodais para os demais tratamentos. No momento da desova, situação similar foi verificada. As taxas de fertilização e eclosão foram menores no tratamento com 30% de PB diferindo ($p < 0,05$) dos demais. O maior valor de eclosão foi encontrado para as fêmeas alimentadas com dietas contendo 18% de PB. O maior peso dos ovários remanescentes foi constatado para os exemplares que receberam 30 e 36% de PB. O menor índice de K foi observado para fêmeas alimentadas com a dieta contendo o maior teor protéico. Conclui-se que a dieta contendo 18% de PB satisfaz a exigência de fêmeas-reprodutoras da espécie adaptada ao sistema.

7.2. Introdução

O *Piaractus mesopotamicus*, peixe migrador nativo sul-americano, tem merecido atenção especial principalmente no que diz respeito ao aperfeiçoamento de técnicas reprodutivas empregadas a sua criação (Urbinati e Gonçalves, 2010). De acordo com Romagosa (2008) a propagação artificial ou reprodução induzida é um dos principais aspectos para a intensificação da produção piscícola, acompanhada da sustentabilidade tanto econômica como ambiental. Contudo, destacam-se dois pontos cruciais como, o manejo do plantel de reprodutores e a qualidade dos gametas femininos e masculinos, ambos atuando na produção de uma nova prole (Romagosa, 2006; Hainfellner, 2011; Sanches et al., 2010; Sanches et al., 2011). Além disso, o sucesso reprodutivo dos peixes nativos depende de um ajuste temporal havendo a necessidade de existir sincronia entre o alimento ofertado (antes ou durante o período reprodutivo) e o momento da liberação de gametas (desova) (Romagosa, 2008).

A nutrição de reprodutores é, sem dúvida nenhuma, a área menos estudada e entendida na alimentação de peixes (Izquierdo et al., 2001), refletindo, até o momento, em conhecimentos incipientes e disponibilidade de rações comerciais inadequadas as espécies de peixes nativos tropicais (Arbeláez-Rojas et al., 2002). Porém, *Pseudoplatystoma corruscans* e *Rhamdia quelen* receberam dietas práticas que influenciaram o processo de desenvolvimento ovocitário conduzidos em tanques-rede (Andrade et al., 2010; Reidel et al., 2010; Coldebella et al., 2011). Entretanto, vale salientar que, Hainfellner (2011) realizou estudo comparativo entre a criação de *Prochilodus lineatus* em viveiros escavados e em tanques-rede e não recomenda a utilização desse último para a espécie, principalmente na fase vitelogênica.

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar dietas balanceadas com diferentes níveis de proteína bruta que possibilitem promover a maturação dos

ovócitos, bem como, potencializar o desempenho reprodutivo de *P. mesopotamicus* em tanques-rede.

7.3. Material e Métodos

O experimento foi realizado no “Centro de Desenvolvimento de Tecnologias para Piscicultura em Tanque-rede”, localizado na área de transição do reservatório da Usina Hidroelétrica de ITAIPU, situado no município de Santa Helena, Paraná, por um período de sete meses (agosto/2009 a fevereiro/2010). Foram distribuídas 224 matrizes de *Piaractus mesopotamicus* em 16 tanques-rede (TR) (5,0m³ - 2,0m X 2,0m X 1,25m) de volume útil, totalizando 14 peixes.TR⁻¹ (Tabela 1). Um TR com 14 exemplares foi considerado uma unidade experimental.

Tabela 1. Médias de peso (Wt) e comprimento total (Lt) de *Piaractus mesopotamicus* mantido em tanque-rede e alimentado com rações contendo diferentes teores protéicos.

Sexo	Parâmetros	Proteína Bruta (%)			
		18	24	30	36
Machos	Wt (g)	2,344±0,446	2,325±0,360	2,539±0,533	2,555±0,682
	Lt (cm)	46,69±2,35	46,29±1,95	47,18±2,96	47,5±2,6
Fêmeas	Wt (g)	2,722±0,488	3,030±0,501	2,903±0,526	3,132±0,737
	Lt (cm)	47,55±3,29	49,27±2,28	49,00±2,28	50,5±3,1

(P>0,05)

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado composto por quatro tratamentos constituídos por quatro rações experimentais com os seguintes níveis de proteína bruta (PB) 18; 24; 30 e 36% e quatro repetições (Tabela 2).

As rações foram processadas na Fábrica de Ração-Escola da Unioeste, PR/BR. Os alimentos foram pesados, pré-misturados e desintegrados. Em seguida, os ingredientes juntamente ao premix vitamínico mineral foram misturados e submetidos ao processo de extrusão. Os péletes de ração foram elaborados de maneira a conter

tamanhos compreendidos entre 4 e 6 mm. As dietas foram pesadas e fornecidas duas vezes ao dia aos animais até a saciedade aparente dos mesmos.

Os valores de pH, condutividade elétrica ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) e oxigênio dissolvido ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) da água foram registrados, quinzenalmente, com o auxílio de potenciômetros digitais, enquanto que, os de temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e transparência (m) da água foram monitoradas, diariamente, pela manhã e a tarde, dentro e no entorno dos tanques-rede (30m) por meio de um termômetro de mercúrio e disco de Secchi, respectivamente.

Tabela 2. Composição percentual e química das rações experimentais contendo diferentes níveis de proteína bruta

Ingredientes	Proteína Bruta (%)			
	18	24	30	36
Farinha de vísceras de aves	12,10	18,82	25,53	32,25
Farelo de soja	10,00	16,67	23,33	30,00
Arroz quirera	20,00	20,00	20,00	20,00
Milho	46,25	35,31	24,36	13,42
Farelo de trigo	3,00	3,00	3,00	3,00
Suplemento Min. Vit.	0,50	0,50	0,50	0,50
Sal comum	0,30	0,30	0,30	0,30
L-Lisina	0,28	0,26	0,24	0,22
Antifúngico (Propionato de cálcio)	0,20	0,20	0,20	0,20
DL-Metionina	0,03	0,05	0,07	0,09
Antioxidante (BHT)	0,02	0,02	0,02	0,02
Óleo de soja	4,30	2,87	1,43	0,00
Fosfato bicálcico	3,02	2,01	1,01	0,00
Total	100,00	100,00	100,00	100,00
Nutrientes (%)				
Amido	44,00	37,28	30,56	23,84
Cálcio	1,53	1,53	1,53	1,53
Energia Digestível ($\text{kcal}\cdot\text{kg}^{-1}$)	3300,00	3300,00	3300,00	3300,00
Fibra bruta	2,01	2,29	2,57	2,85
Fósforo total	1,10	1,10	1,10	1,10
Gordura	7,63	6,70	5,78	4,85
Lisina	1,08	1,44	1,80	2,16
Metionina+Cistina	0,65	0,85	1,04	1,24
Proteína	18,00	24,00	30,00	36,00
Metionina	0,36	0,48	0,60	0,72
Treonina	0,70	0,95	1,19	1,44

† Suplemento mineral e vitamínico (níveis de garantia.kg⁻¹ produto): vit. A = 2.000.000 UI; vit. D3 = 400.000 UI; vit. E = 30.000 mg; vit. K3 = 2.000 mg; vit. B1 = 4.000 mg; vit. B2 = 4.000 mg; vit. B6 = 3.000,00 mg; vit. B12 = 80 mg; ácido fólico = 1.000 mg; pantotenato de cálcio = 10.000 mg; vit. C = 60.000 mg; biotina = 200 mg; colina = 100.000 mg; niacina = 20.000 mg; ferro = 16.000 mg; cobre = 2.000 mg; manganês = 6.000 mg; iodo = 200 mg; cobalto = 60 mg. Composição segundo NRC (1993); Boscolo et al. (2002); Pezzato et al. (2002);

No período reprodutivo (novembro-fevereiro) os reprodutores de *P. mesopotamicus* foram pré-selecionados: machos - liberação de sêmen sob leve pressão da cavidade abdominal e fêmea - abdômen abaulado e papila urogenital

intumescida e avermelhada (Romagosa et al., 1990). Em seguida, transportados para o “Laboratório de Reprodução” localizado as margens do reservatório, onde foram individualmente, anestesiados (etil-aminobenzoato, nome comercial: benzocaína: 3,0g:150mL álcool 96,0°GL:40 L de água, por 04 minutos), pesados (*g*), medidos (*cm*), marcados e separados por sexo, em dois tanques circulares (1000L), com aeração e renovação de água constantes.

Associada as características externas do mesmo exemplar, por meio da técnica de canulação intra-ovariana, foram retiradas amostras de ovócitos respeitando-se as dietas experimentais distintas (por tratamento) e fixados em solução de Serra (Bruzska, 1979), por cinco minutos para verificar a posição da vesícula germinativa (VG), em estereomicroscópio (oc. 10X; obj. 17X) (Romagosa et al., 1990). Foram selecionadas somente as fêmeas que apresentaram frequência percentual dos valores da Vesícula Germinativa Periférica (VGP) acima de 50% para os quatro tratamentos.

Duas amostras de 200 ovócitos/cada (VGP \geq 50%) foram retiradas pela mesma técnica respeitando-se as dietas experimentais distintas (por tratamento): *1ª amostra* = antes da 1ª dose hormonal e *2ª amostra* = momento da liberação dos ovócitos. Essas duas amostras foram subdivididas em duas sub-amostras e fixadas:

(i) solução de Gilson (Simpson, 1951), por 30 minutos, em estereomicroscópio (oc. 10X; obj. 17X) para analisar as distribuições de frequência percentual dos diâmetros dos ovócitos (μm), por tratamento (Romagosa et al., 1990).

(ii) solução de formol tamponado (24 h), posteriormente, mantidas em álcool 70°G.L. para acompanhar as modificações morfo-estruturais (microscopia de luz) (Leonardo et al., 2005), sendo o material processado na Universidade de São Paulo – USP, no Instituto de Ciência Biomédicas – IBC, Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento no Laboratório de Embriologia e Histologia, segundo as técnicas histológicas rotineiras. Foram obtidas secções histológicas (5 μm) coradas com Hematoxilina-Eosina. A análise e fotodocumentação foram realizadas em fotomicroscópio Zeiss Axioscop 2®.

As fêmeas receberam duas doses de 0,5 e 5,0 mg de extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC).kg⁻¹ de reprodutor, com intervalo de 12h entre as doses (Bernardino

et al., 1986). Os machos receberam dose única de 2,0 mg de extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC).kg⁻¹ de reprodutor concomitantemente a 2ª aplicação das fêmeas. O substrato hipofisário foi aplicado intraperitonealmente, na região da nadadeira peitoral.

A retirada do sêmen seguiu a metodologia descrita por Sanches et al. (2010) e Sanches et al. (2011), onde o volume de sêmen liberado foi mensurado e, homogeneizado dando origem a um “pool” por tratamento.

Após um período de 240 horas-grau (somatória da temperatura da água em função do tempo – Unidades Térmicas Acumuladas - UTAs) (Ceccarelli et al., 2000), as fêmeas foram massageadas na região ventral no sentido encéfalo-caudal aonde os ovócitos liberados (não-hidratados) de cada matriz por tratamento foram coletados em beakers (250 mL) e, colhidas três sub-amostras (0,1 mL cada) e, estimados o número total de ovócitos liberados (por extrusão).

A seguir, foi realizada a homogeneização dos ovócitos e sêmen por tratamento. As taxas de fertilização provenientes do material fecundante por tratamento foram estimadas em três beakers (250 mL) (observando-se a uniformidade do diâmetro e coloração dos ovócitos, bem como, ausência de ovócitos brancos - *não-viáveis* = gorados (Romagosa et al., 1990).

As fertilizações foram realizadas sequencialmente, em recipientes de 250 mL e amostras de ovócitos (2 mL) e sêmen (200 µL) ativados com 75 mL de água (proveniente das incubadoras), homogeneizados por um minuto. Cinco alíquotas (20,0 mL) de cada unidade experimental foram transferidas para cinco incubadoras experimentais (20 L).

A taxa de fertilização (TF, %) por tratamento foi estimada após 8 horas do início da hidratação dos ovos (fechamento do blastóporo) (Romagosa et al., 2001), utilizando-se 380 ovos de cada unidade experimental, amostra superior a recomendada por Zaniboni e Weingartner (2007). Foram descartados os ovos com clivagem irregular ou opacos.

A quantificação do desenvolvimento ovariano foi feita pelo índice gonadosomático (IGS), individual, definido como a razão entre o peso dos ovários e o peso total, multiplicado por cem (Romagosa et al., 1990).

Para se verificar a relação existente entre o grau de bem-estar das fêmeas-reprodutoras denominado de Fator de Condição (K) (Le CREN, 1951), foi considerada a relação entre os Wt e Lt . Neste estudo foi estimado o K alométrico. A expressão aplicada foi: $K_{alométrico} = Wt/Lt^b$ na qual b é estimado pela equação da relação peso-comprimento, após ajuste dos dados pelo método dos mínimos quadrados.

No final do experimento, as fêmeas induzidas de cada dieta experimental foram sacrificadas seguindo-se os princípios éticos de manipulação animal estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimento Animal (COBEA, <http://www.cobea.org.br>) e seus ovários retirados, pesados e fixados em solução de formol tamponado (24h), para verificar as modificações estruturais ocorridas pós-desova por meio de avaliações histológicas.

Após o término do período reprodutivo, as fêmeas permaneceram nos tanques rede para posteriores avaliações das alterações do processo de regressão ovariana. Para tanto, foram efetuadas duas coletas (março e junho/2010) sendo que dois exemplares de cada tratamento foram selecionados aleatoriamente, sacrificados e seus ovários retirados (vide item ii).

Os parâmetros avaliados foram tabulados e submetidos a análise de variância a 5% de significância e, quando verificado diferenças, o teste de Tukey (5%) foi aplicado com o auxílio do programa estatístico Statistic 7.0 (Statsoft, 2005).

7.4. Resultados e Discussão

Os parâmetros de qualidade de água apresentaram médias de $1,65 \pm 0,37$ m; $6,97 \pm 0,44$; $26,20 \pm 4,28^\circ\text{C}$; $6,77 \pm 0,92$ mg.L⁻¹ e $41,88 \pm 12,84$ $\mu\text{S.m}^{-1}$ para transparência,

pH, temperatura, oxigênio dissolvido e condutividade elétrica, respectivamente, durante o período experimental e permaneceram dentro da faixa recomendada para a espécie (Boyd, 1990; Sipaúba-Tavares, 1995).

Neste experimento pode-se constatar que os ovócitos de *P. mesopotamicus*, durante o processo de vitelogênese no sistema de criação adotado, podem ser caracterizados quando ocorre a migração da vesícula germinativa central (Figura 1 A) e presença de grânulos de vitelo (Figura 1 B) para a periferia dos ovócitos (reinício da meiose) (Figura 1 C e D) em direção a micrópila (Figura 1 F), nos quatro tratamentos.

Além disso, esses ovócitos apresentaram distintas modas relativas às distribuições de frequências percentuais dos diâmetros dos ovócitos antes da 1ª aplicação hormonal (1ª amostra) mostrando comportamento unimodal (719,9 µm) para os animais alimentados com dieta contendo 18% de PB. Os outros peixes arraçoados com 24, 30 e 36% de PB mostraram distribuições de frequência percentuais similares com tendências polimodais, com modas de 782,5; 845,1 e 970,3 µm (dieta 24%) e, 719,9; 845,1 e 970,3 µm (dieta 30%). A dieta contendo teor protéico mais elevado apresentou valores de 782,5; 845,1 e 970,3 µm (Figura 2A).

A ovulação de *P. mesopotamicus* (2ª amostra) ocorre rapidamente depois da maturação resultante do aumento do peso dos ovários e tamanho dos ovócitos, onde pode-se visualizar distribuições semelhantes (polimodais) (Figura 2B). Observou-se na periferia citoplasmática a presença de alvéolos corticais arranjados geralmente em duas camadas, semelhantes para os tratamentos de 18; 24 e 30% e, mais desorganizada, nas matrizes que receberam 36%.

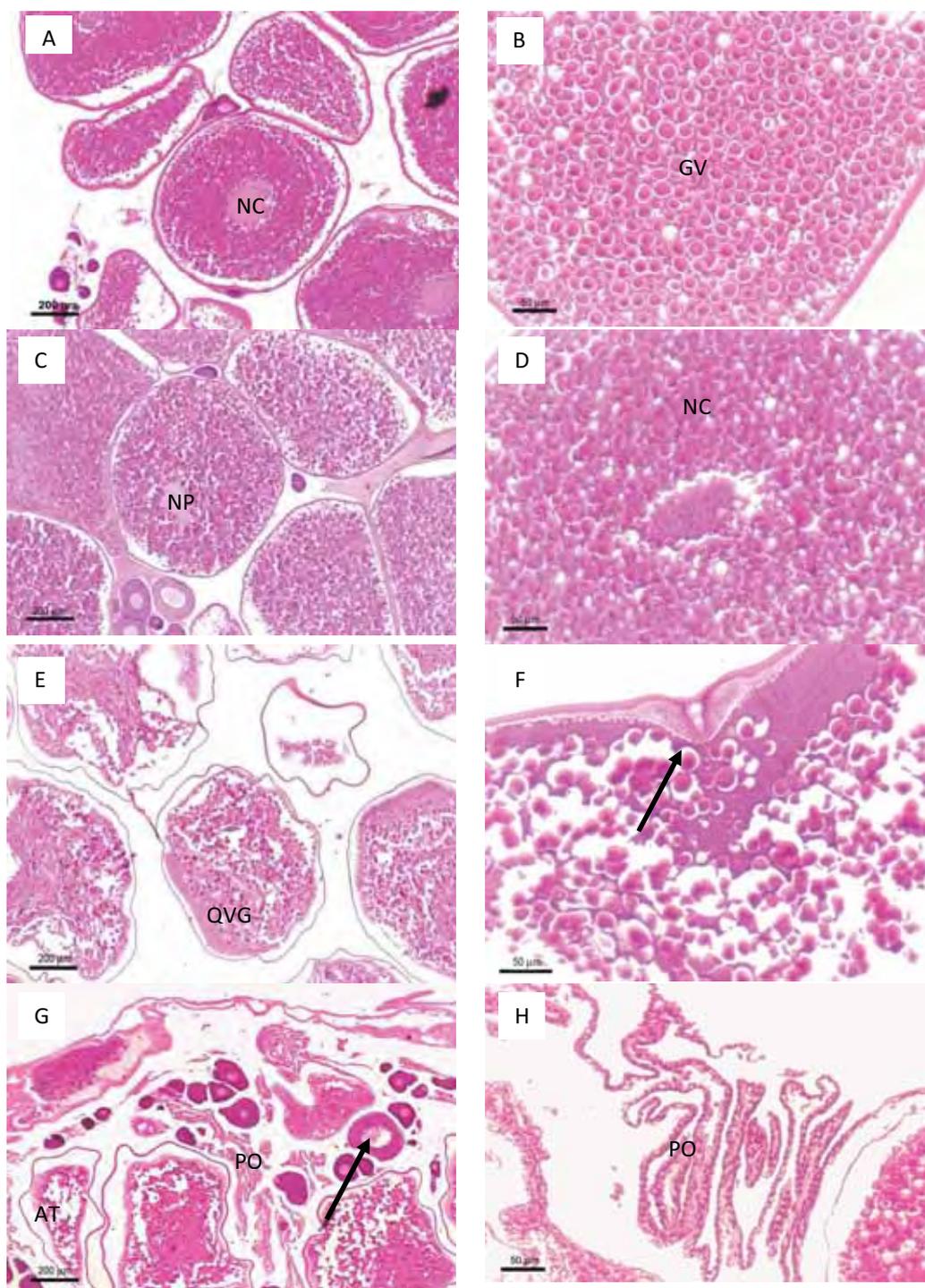


Figura 1. Fotomicrografias de ovócitos e ovários de *P. mesopotamicus*, alimentadas com rações contendo níveis crescentes de proteína bruta, mantido em tanque-rede: (A; B; C; D = 1ª amostra (A) núcleos centrais (NC); (B e D) grânulos de vitelo (GV); (C) núcleos periféricos (NP); (E; F = 2ª amostra = desova) (E) quebra da vesícula germinativa - QVG. (F) Micrópila; (G; H = ovários pós-desova (G) Folículos pós-ovulatórios = PO; ovócitos atrésicos (AT) e pré-vitelogênicos (setas); (H) Folículos pós-ovulatórios (PO).

Nesta fase os grânulos de vitelo tornam-se maiores e de diferentes formas porém, não ocorre a coalescência dos grânulos de vitelo extra-vesicular em uma massa contínua, entretanto, há o rompimento do envelope nuclear, as camadas foliculares se adelgaçam decorrente da absorção hídrica (Figura 1E), enquanto a zona radiata (córion) permanece proeminente (Fig. 1F). Resultados semelhantes foram observados para a mesma espécie (Romagosa et al., 1993) e em *Pseudoplatystoma fasciatum* em gaiolas (Romagosa, 2010).

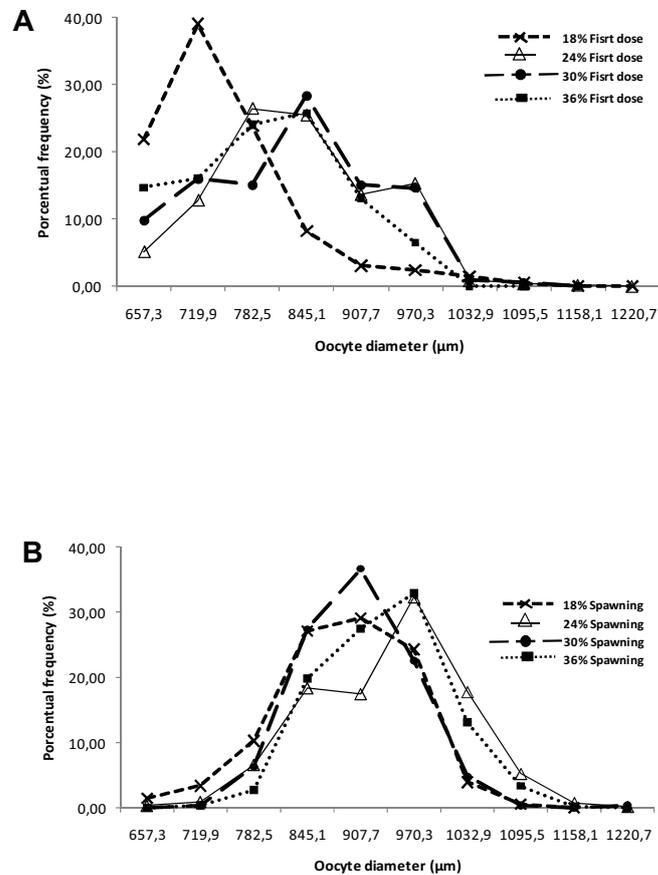


Figura 2. Distribuições de freqüências percentuais dos diâmetros dos ovócitos de *P. mesopotamicus* mantidos em tanques-rede: A - antes da 1ª aplicação hormonal (1ª amostra); B - momento da liberação dos ovócitos (2ª amostra) (n=4).

Considerando-se os diâmetros dos ovócitos de *P. mesopotamicus* nos dois sistemas de criação, verifica-se que o tamanho dos ovócitos daqueles mantidos em

tanques-redes foi inferior quando comparado aos de viveiros escavados em terra, que de acordo com Romagosa et al. (1990), apresentaram diâmetros ovocitários superiores, antes da 1ª dose, de 876,4; 939,0 ou 1001,6µm, com moda acentuada para o segundo valor. As matrizes deste experimento receberam suas respectivas dietas no início da maturação, ofertada seis meses antes do período da desova.

No momento da fertilização ocorre a fusão e quebra dos alvéolos corticais nos ovos de *P. mesopotamicus*, fundindo-se a zona radiata e, liberando seu conteúdo (região cortical) no espaço perivitelínico cuja função é proteger e atuar contra à polispermia. A seguir, ocorre o estreitamento e a ruptura folicular sob a ação de hormônios indutores da maturação – MIS (Nagahama e Yashita, 2008). Na Figura 1F verifica-se a micrópila, comum aos Characiformes (Honji et al., 2009; Romagosa, 2010).

Contudo, neste estudo as taxas de fertilização foram baixas quando comparadas a mesma espécie mantida em viveiros escavados (Romagosa et al., 1990). Todavia, em cativeiro, no caso do gênero *Piaractus*, observações a campo, nos leva a constatar que é comum o sucesso/insucesso reprodutivo alternarem, ou seja, um ano respondem positivamente com um grande número de ovócitos liberados e no próximo, insucesso com quedas abruptas, presos - “em grumos”, sanguinolentos (Romagosa, informações pessoais). Porque?! Não se sabe até o momento.

As fêmeas de *P. mesopotamicus* que receberam a dieta de maior nível protéico mostraram indícios do processo de regressão ovariana confirmada pela distribuição porcentual dos diâmetros dos ovócitos (Figura 2B) e, com respostas negativas à indução hormonal, ovários altamente vascularizados com presença de inúmeros ovócitos brancos e marrom-esverdeados, constatada pela presença de folículos atrésicos e reabsorção (Figura 1G). Romagosa et al. (1990) sustentam que *P. mesopotamicus*, mantidos em cativeiro, apresentam fenômenos degenerativos (invólucão ou atresia folicular dos ovócitos) frequentes no final de maturação.

Leonardo (2006) ressalta esse mesmo acontecimento em *Pseudoplatystoma fasciatum* mantido em viveiros escavados.

Porém, Romagosa (2010) ressalta que, em *P. fasciatum* criado em tanques-rede, é comum a existência destes fatores nos ovários que não completaram à maturação e, também, em fêmeas aparentemente desovadas, nas quais os ovócitos sofrem reabsorção dos folículos pós-ovulatórios (PO), indicando um outro processo, o de reorganização ovariana pós-desova. Neste estudo também foi observada a presença de folículos PO's (Figura 1H).

Em relação as taxas de fertilização, a dieta contendo 30% de PB proporcionou o menor porcentual diferindo significativamente ($p < 0,05$) das demais rações ofertadas (Figura 3A). Igualmente, as matrizes que receberam dietas contendo 30% de PB, demonstraram ínfimas taxas de eclosão (2,65%) ($p < 0,05$) (Figura 3B). Para o mesmo parâmetro, os animais alimentados com rações possuindo teores de 24 e 36% de PB, apresentaram valores intermediários (9,01 e 9,86%; respectivamente) ($p < 0,05$) e, por final, a dieta contendo o menor nível protéico refletiu em eclosão superior (13,17%), contrastando ($p < 0,05$) com os demais tratamentos.

Segundo Afzal Khan et al. (2005), a nutrição influencia a fertilização porém, esse mecanismo permanece obscuro. Tal interferência protéica talvez esteja nas ações do "pool" de aminoácidos livres existentes nos ovócitos (Gunasekera et al., 1996). Esse fator ficou evidente para a tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* alimentada com dieta contendo diferentes níveis de PB. Quando fornecida uma ração com 10% de PB ela continua a produzir ovócitos, porém inférteis. Ao passo em que se eleva o teor desse nutriente, há um incremento nos valores da taxa de fertilização (Gunasekera et al., 1996). Corroborando, Afzal Khan et al. (2005) concluíram que para o *Labeo rohita*, dietas contendo 20% de PB proporcionaram menores taxas de fertilização. Embora as citações anteriores referindo-se a peixes com estratégias reprodutivas diferenciadas aliado a falta de estudos relacionados a nutrição de

reprodutores reofílicos brasileiros, no presente estudo, valores ínfimos para *P. mesopotamicus* foram encontrados nos exemplares que receberam 30% de PB quando mantidos em tanque rede, sugerindo a interferência dos tratamentos na reprodução desses peixes.

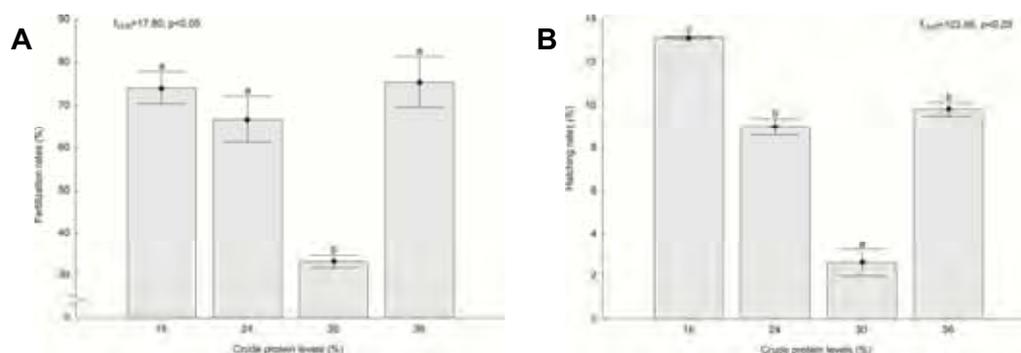


Figura 3. Taxas de fertilização (A) e de eclosão (B) de *P. mesopotamicus*, alimentado com dietas contendo níveis crescentes de proteína bruta, em tanques-rede (n=4).

Os parâmetros reprodutivos de *P. mesopotamicus*, alimentados com dietas contendo níveis distintos de PB mantidos em tanques-rede encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros reprodutivos de *P. mesopotamicus* alimentado com dietas contendo diferentes níveis protéicos, em tanques-rede (n=4).

Parâmetros*	Proteína Bruta (%)			
	18	24	30	36
Ovócitos liberados (10^3)	178,28±99,9	266,15±177,19	136,98±76,91	256,49±143,17
Número total de ovócitos (10^3)**	388,41±134,41	375,18±288,27	446,78±236,24	580,02±200,12
Peso total dos Ovários (g)***	252,87±87,51	298,54±160,62	290,87±153,80	377,62±130,28
IGS (%)****	8,65±2,54	9,36±3,64	9,18±3,15	12,39±4,11

(p>0,05); **Número total de ovócitos (liberados mais os remanescentes dos ovários); ***Peso total dos ovários (ovócitos liberados mais ovários remanescentes); ****IGS = Índice Gonadossomático.

O número de ovócitos liberados e o número de ovócitos totais de *P. mesopotamicus* apresentaram comportamento similar (p>0,05) para os peixes alimentados com as dietas experimentais, mantidos em tanque rede (Tabela 3).

As fêmeas que foram induzidas à reprodução liberaram quantidades de ovócitos semelhantes (p>0,05) entre os tratamentos a que foram submetidas. De acordo com Urbinati et al. (2010) a quantidade de ovócitos liberados de *P.*

mesopotamicus varia de 40 a 180g kg⁻¹ de peixe quando mantidos em viveiros escavados. Cada grama de óvulos contém 1.200 (Ceccarelli et al., 2000) a 1.536 unidades, sugerindo que 40 a 180g kg⁻¹ gere de 61.440 a 276.480 ovócitos.kg⁻¹ de peixe. Assim, as fêmeas utilizadas no presente estudo, com peso médio de 3kg, produziram ovócitos em quantidades correspondentes ao descrito na literatura, ou seja, os peixes mantidos em tanques-rede desovaram quantidades semelhantes àqueles criados em viveiro escavado.

Sampaio e Sato (2009) estudando aspectos reprodutivos de *Leporinus piau* submetidos à desova induzida encontraram valores de 2.261 ovócitos.g⁻¹ de ova. Esse resultado é superior ao verificado para *P. mesopotamicus* em tanques-rede, tanto em número, quanto em tamanho dos ovócitos. Para o *Brycon cephalus* para cada grama de ova existem 1.200 ovócitos (Ceccarelli et al., 2000), assim, Romagosa et al. (2001) pesquisando seleção e caracterização da mesma espécie, induzidas artificialmente a desova, verificaram que a partir do diâmetro médio dos ovócitos os animais responderam distintamente em três grupos, liberando 160g (19.200 ovócitos), 70g (84.000 ovócitos) e praticamente 1g, com 5% de larvas defeituosas. Infelizmente a escassez de estudos relacionados a nutrição de reprodutores de peixes migradores nativos brasileiros impede inferir sobre a ação das dietas na liberação ou não dos ovócitos de *P. mesopotamicus*.

Os pesos totais dos ovários dos peixes (ovócitos liberados + ovários remanescentes) submetidos a reprodução não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$) entre as matrizes que receberam dietas com níveis protéicos crescentes (Tabela 3). Porém, foi possível visualizar que praticamente metade dos ovócitos permaneceu retida nos ovários remanescentes dos peixes submetidos a reprodução (Figura 4). Após a ovulação, os ovócitos sofrem mudanças bioquímicas e morfológicas até atingirem o período de máxima viabilidade equivalente a 2^a metáfase meiótica (Leonardo et al., 2005), entretanto, caso não sejam expelidos e fertilizados, ocorre o

processo conhecido como *overripening* (supermaturação) caracterizado por perda extrema da qualidade do ovo (Babin et al., 2007).

Os valores médios do IGS foram equivalentes ($p>0,05$) entre as rações testadas (Tabela 3). Resposta semelhante foi observada por Reidel et al. (2010) em avaliação ao fornecimento de dietas com teores distintos de proteína e energia para *R. quelen* mantido em tanque rede, onde o IGS apresentou maiores valores nas estações de primavera-verão, indicando a sazonalidade do período reprodutivo. Andrade et al. (2010), em estudo com o *Pseudoplatystoma corruscans* mantido em tanque rede e alimentado com dietas contendo distintos teores protéicos e suplementadas com óleo de milho, encontraram IGS elevados nos meses de maiores temperaturas concluindo que, seu período reprodutivo encontra-se de novembro a janeiro. O mesmo aconteceu com o *P. mesopotamicus* estocado em tanque rede.

Os pesos médios dos ovários remanescentes variaram significativamente ($p<0,05$) e apresentaram maiores valores para as fêmeas que receberam dietas contendo 30 e 36% de proteína bruta. As demais dietas, contendo níveis inferiores de PB, apresentaram ovários com pesos inferiores (Figura 4).

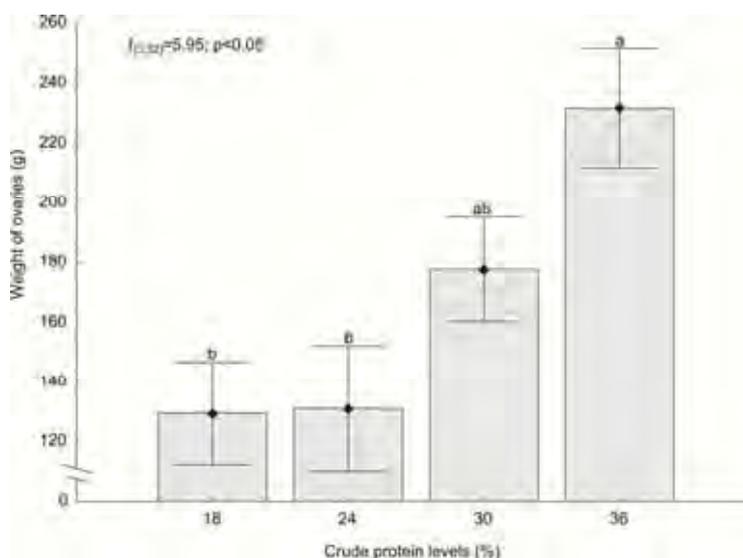


Figura 4. Peso dos ovários remanescentes de *P. mesopotamicus*, alimentado com dietas contendo níveis crescentes de proteína bruta, mantido em tanque-rede (n=4).

Estudos recentes realizados por Ceccarelli et al. (2010) mostraram que quando ofertada ração de 30% PB e 2.800 kcal.kg⁻¹ de energia digestível a matrizes-fêmeas de piracanjuba, *Brycon orbignyanus* ocorre o desenvolvimento adequado dos ovários, sem estimular o sobrepeso e acúmulo de gordura na cavidade celomática.

Contrariamente, o jundiá, *Rhamdia quelen* demonstrou que a interação entre dietas distintas (25; 30; 35 % PB, 3250 kcal.kg ED⁻¹ e 25; 30; 35% PB, 3500 kcal.kg ED⁻¹) e o ciclo reprodutivo foi significativa somente na de 35% PB e 3.250 kcal kg⁻¹, antecipando o ciclo, com a produção de uma quarta parcela de ovos (4 ° lote de ovos) e valores médios máximos do IGS ≥ 1% (Reidel et al., 2010). Com a mesma espécie, Coldebella et al. (2011) constataram que níveis de 28% de PB foram suficientes para manter os índices reprodutivos (fator de condição, índices hepatossomático e visceral). Ambos os experimentos foram realizados em tanques-rede.

Logo, Andrade et al. (2010) investigaram o efeito da adição de 18:2n-6 (28% PB; 28% PB mais 5% óleo milho por quilo de ração; 40% PB) na dieta de fêmeas do surubim-pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* inferindo que, essas dietas (rações comercial e experimental) afetaram negativamente o processo de maturação ovariana (histomorfologia), entretanto, 28%+óleo foi mais satisfatória para os reprodutores mostrando índices de bem-estar e valores do IGS ligeiramente superiores.

A variação dos valores médios do K de fêmeas de *P. mesopotamicus* pode ser entendido como uma medida indireta de crescimento em peso para indivíduos de mesmo comprimento (Vazzoler, 1996). Os maiores valores de K foram constatados para fêmeas alimentadas com as dietas contendo 18, 24 e 30% de PB, refletindo condição desfavorável aquelas que receberam 36% de PB (p<0,05) (Figura 5).

Para o *R. quelen* efeito similar foi constatado quando alimentado com dietas variando os teores protéicos e energéticos em tanque-rede. O maior índice foi alcançado por fêmeas alimentadas com 30% de PB e 3500 kcal.kg⁻¹ de energia bruta (Reidel et al., 2010).

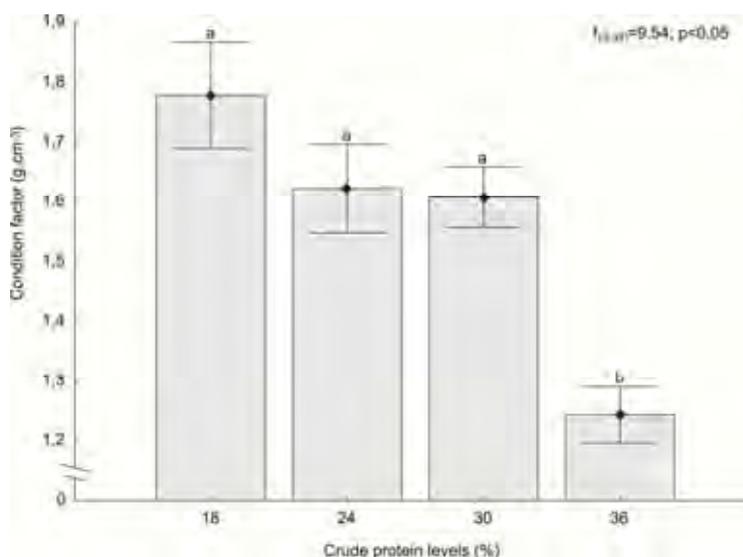


Figura 5. Fator de condição (K) de fêmeas de *P. mesopotamicus* alimentadas com dietas contendo níveis crescentes de proteína bruta, em tanques rede (n=4).

Os autores demonstraram também, que o melhor desempenho reprodutivo, antecipando o período de desova e à maturação dos ovócitos, foi verificado nos peixes que receberam a dieta contendo $3.250 \text{ kcal.kg}^{-1}$ de ração e 35% PB.

Em concordância, Andrade et al. (2010) afirmam que o processo de maturação ovariana do *Pseudoplatystoma corruscans* alimentadas com dois níveis protéicos e suplementados com óleo de milho, atingiram à maturação ovariana em sistema de produção intensivo, ou seja, tanque rede. Entretanto, essas respostas são conflitantes quando comparadas as de Hainfellner (2011) para *Prochilodus lineatus* pois, o mesmo, verificou efeitos negativos do sistema de tanque-rede no desenvolvimento ovariano como, número de ovócitos reduzidos e retardo na maturação ovariana, entretanto, esses animais receberam dieta comercial (28%PB). Por outro lado, Washburn et al. (1990) inferiram que os peixes (região temperada) devem receber, durante a época reprodutiva, uma quantidade mínima diária de proteínas que atenda as suas necessidades (estrutural, funcional e energética), para recuperação dos tecidos, produção dos gametas, fertilização dos ovócitos e desenvolvimento embrionário.

O desafio é manejar adequadamente as matrizes principalmente, em busca por indicador (es) da qualidade do gameta (s) e suas características, bem como, o benefício de se conhecer o estado dos reprodutores de peixes (Mañanos et al., 2008; Viveiros e Godinho, 2009; Sanches et al. 2009; Sanches et al., 2010; Bobe e Labbé, 2010; Romagosa, 2010; Romagosa et al., 2010). Geralmente, atribui-se o insucesso na reprodução aos ovócitos ou ovos, entretanto, em machos hoje são evidentes as dificuldades na espermição ou a pobre qualidade do sêmen quando mantidos em cativeiro (Sanches et al., 2010; Cabrita et al., 2011).

Sumarizando, fêmeas de *P. mesopotamicus*, quando mantidas em tanque rede, responderam positivamente à indução hormonal, fato comprovado pela quebra da vesícula germinativa, ovulação e desova, processos conhecidos em reprodutores da mesma espécie mantidos em viveiros escavados (Castagnolli e Donaldson, 1981; e Romagosa et al., 1990). O sucesso da desova depende de uma seleção cuidadosa das matrizes-fêmeas pois, além das classificações subjetivas, como a aparência externa pode-se acompanhar as internas (invasivas) baseadas na morfologia dos ovócitos (posição do núcleo, tamanho, estrutura) e taxas ou índices reprodutivos. De acordo com Phelps et al. (2011) nessa seleção deve-se considerar o número de matrizes utilizadas, qual o destino desses reprodutores, o custo do hormônio e os equipamentos laboratoriais. Para tal, há necessidade de alta produtividade objetivando gametas e larvas de boa qualidade (Bobe e Labbé, 2010; Romagosa et al., 2010; Sanches et al., 2011; Phelps et al., 2011). Portanto, embora as taxas de eclosão tenham sido insatisfatórias, conclui-se que a dieta contendo 18% de PB satisfaz a exigência de fêmeas-reprodutoras da espécie mantida em tanque-rede.

7.5. Referências Bibliográficas

Afzal Khan, M.; Jafri, A.K.; Chadha, N.K., 2005: Effects of varying dietary protein levels on growth, reproductive performance, body and egg composition of rohu, *Labeo rohita* (Hamilton). *Aquaculture Nutrition*. 11, 11–17.

Andrade, V.X.L.; Honji, R.M.; Romagosa, E., 2010: Processo de maturação das gônadas de *Pseudoplatystoma corruscans* alimentados com dietas contendo diferentes níveis protéicos e suplementada com óleo de milho. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 62, 1-7.

Arbeláez -Rojas, G.A.; Fracalossi, D.M.; FIM, J.D.I., 2002: Body composition of tambaqui, *Colossoma macropomum*, and matrinxã, *Brycon cephalus* when raised in intensive (Igarapé Channel) and semi-intensive (Pond) culture systems. *Rev. Bras. Zootec.* 31, 1059–1069.

Babin, P.; Cerdà, J.; Lubzens, E., 2007: The fish oocyte from basic studies to biotechnological applications. Springer, The Netherlands.

Bobé, J.; Labbé, C., 2010: Egg and sperm quality in fish. *Fish Reproduction*. 165, 535-548.

Boscolo, W. R.; Hayashi, C.; Meurer, F., 2002: Digestibilidade aparente da energia e nutrientes de alimentos convencionais e alternativos para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, L.). *R. Bras. Zootec.* 13, 539-545.

Boyd, C., 1990: Water quality in ponds for aquaculture. Alabama, Birmingham Publishing, pp. 482.

Bruzska, E., 1979: The *in vivo* method of estimating the stages of oocyte maturation in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Acta Hydrobiology*. 21, 423-433.

Cabrita, E.; Robles, V.; Sarasquete, C.; Herraiez, P., 2011: Sperm quality evaluation for broodstock improvement. In: *Cryopreservation in Aquatic Species*. Eds: T.R. Tiersch; C.C. Green, World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana, USA. pp. 146-155.

Castagnolli, N.; Donaldson, E.M., 1981: Induced ovulation and rearing of the pacu (*Colossoma mitrei*). *Aquaculture*. 25, 275-279.

Ceccarelli, P.S.; Senhorini, J.A.; Cantelmo, O.A.; Rego, R.F., 2010: Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) (Valenciennes, 1849). In: *Espécies Nativas para Piscicultura no Brasil*. Eds: B. Baldisserotto, L. C. Gomes, editora UFMS, Santa Maria, RS, Brasil. pp. 117-148.

Ceccarelli, P.S.; Senhorini, J.A.; Volpato, G., 2000: Dicas em piscicultura: perguntas e respostas. Santana Gráfica Editora, Botucatu, SP, Brasil. pp. 247.

Coldebella, I.J.; Radünz Neto, J.; Mallmann, C.A.; Veiverberg, C.A.; Bergamin, G.T.; Pedron, F.A.; Ferreira, D.; Barcellos, L.J.G., 2011: The effects of different protein levels in the diet on reproductive indexes of *Rhamdia quelen* females. *Aquaculture*. 312, 137–144.

Gunasekera, R.M.; Shim, K.F.; Lam, T.J., 1996: Influence of protein content of broodstock diets on larval quality and performance in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture*. 146, 245-259.

Hainfellner, P., 2011: Desenvolvimento ovariano do *Prochilodus lineatus* em dois sistemas de produção: tanques rede e viveiros escavados. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-Graduação em Aquicultura, Caunesp, Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, SP, Brasil. (<http://www.caunesp.unesp.br>).

Honji, R.M.; Narcizo, A.M.; Borella, M.I.; Moreira, R.G.; Romagosa, E., 2009: Patterns of oocyte development in natural habitat and captive *Salminus hilarii*. *Fish Phys. Bioch.* 35, 109-123.

Izquierdo, M.S.; Fernández-Palacios, H.; Tacon, A.G.J., 2001: Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture.* 197, 25-42.

Le Cren, E.D., 1951: The length-weight relationship and seasonal cycle in gonadal weight condition in the perch *Perca fluviatilis*. *J. Anim. Ecol.* 20, 201-219.

Leonardo, A.F.G., 2006: Occurrence and significance of ovarian and follicular regression in cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766): a histology approach. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 58, 831-840.

Leonardo, A.F.G.; Romagosa, E.; BORELLA, M.I., 2005: Characterization and hormonal efficiency in female cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766), kept in captivity. *Aquaculture.* 240: 451-461.

Mañanos, E.; Duncan, N.; Mylonas, C., 2008: Reproduction and control of ovulation, spermatation and spawning in cultured fish. In: *Methods in Reproductive Aquaculture. Marine and Freshwater Species*. Eds: E. Cabrita, V. Robles, P. Herráez. CRC Press Taylor and Francis Group, Boca Raton, Florida, EUA. pp. 3-80.

Nagahama, Y.; Yamashita, M., 2008: Endocrine control of sexual behavior in teleost fish. *Gen. Comp. Endoc.* 165, 456-468.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC., 1993: Nutrient requirements of warmwater, fishes and shellfishes: nutrient requirements of domestic animals. Washington. pp. 114.

Pezzato, L.E.; Miranda, E.C.; Barros, M.M.; Pinto, L.G.Q.; Furuya, W.M.; Pezzato, A.C., 2002: Digestibilidade aparente de ingredientes pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *R. Bras. Zootec.* 31, 1595-1604.

Phelps, R.P.; Hastey, R.; Broach, J.; Pendetar, A ; Linley, L.; Papanikos, N.; Dunham, R.A., 2011: Broodstock selection criteria for induced spawning of channel catfish for the production of channel X blue catfish hybrid fry and the influence of temperature. *N. Am. J. Aqua.* 73, 180-186.

Reidel, A.; Boscolo, W.R.; Feiden, A.; Romagosa, E., 2010: The effect of diets with different levels of protein and energy on the process of final maturation of the gametes of *Rhamdia quelen* stocked in cages. *Aquaculture.* 298, 354-359.

Romagosa, E., 2010: Reproductive status of Brazilian female's catfish, *Pseudoplatystoma fasciatum* reared in cages. *J. Ap. Ichth.* 26, 806-811.

Romagosa, E., 2008: Avanços na reprodução de peixes migradores. In: *Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aquicultura*. Eds: E.P. Cyrino; E.C. Urbinati.

Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática [AQUABIO], Jaboticabal, SP, Brasil. pp. 1-16.

Romagosa, E., 2006: Biologia reprodutiva e fisiologia de peixes em confinamento: o cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* como modelo. In: Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aquicultura. Eds: J.E.C. Cyrino, E.C. Urbinati. Jaboticabal, SP. pp. 108-116.

Romagosa, E., 1993: Mudanças morfológicas dos ovários de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), em condições de confinamento. B. Inst. Pesca. 20, 67-80.

Romagosa, E.; Souza, B.E.; Sanches, E.A.; Baggio, D.M.; Bombardelli, R.A., 2010: Sperm motility of *Prochilodus lineatus* in relation to dilution rate and temperature of the activating medium. J. Ap. Icth. 26, 678-681.

Romagosa, E.; Paiva, P.; Godinho, H.M., 1990: Pattern of oocyte diameter frequency distribution in females of the pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887) (= *Colossoma mitrei* Berg 1895), induced to spawn. Aquaculture. 86, 105-110.

Romagosa, E.; Narahara, M.Y.; Borella, M.I.; Fenerich-Verani, E N., 2001: Seleção e caracterização de fêmeas de matrinxã, *Brycon cephalus*, induzidas a reprodução. B. Inst. Pesca. 27, 139-147.

Sampaio, E.V.; Sato, Y., 2009: Aspectos reprodutivos de *Ieporinus piau* Fowler, 1941 (osteichthyes, anostomidae) da bacia do rio São Francisco, submetido à desova induzida. C. An. Bras. 10, 157-165.

Sanches, E.A.; Baggio, D.M.; Piana, P.A.; Souza, B.E., Bombardelli, R.A., 2011: Artificial fertilization of oocytes and sperm activation in pacu: effects of the spermatozoa: oocyte ratio, water volume, and *in natura* semen preservation. R. Bras. Zootec. 40, 1-6.

Sanches, E.A.; Bombardelli, R.A.; Baggio, D.M.; Souza, B.E., 2009: Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de dourado. R. Bras. Zootec. 38, 2091-2098.

Sanches, E.A.; Bombardelli, R.A.; Marcos, R.N.; Neumann, G.; Rebechi, C.P.; Romagosa, E., 2010: Sperm motility of *Rhamdia quelen* studied by means of computer-assisted analysis by free software. Aquaculture Research. 42: 153-156.

SIMPSON, A.C., 1951: The fecundity of the plaice. Fishery Investigation. 2, 27.

Sipaúba-Tavares, L.H.S., 1995: Limnologia aplicada a aquicultura. Jaboticabal: Funep. pp. 72.

Stasoft INC, 2005: Statistic (data analysis software system), Tusla: STATSOFT Version 7.1.

Urbinati E.C.; GONÇALVES F.D. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Eds: B. BALDISSEROTTO, L.C. GOMES. Santa Maria: Editora UFSM, 2010. 608p.

Vazzoler A.E.A.M., 1996: Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática. Maringá, PR, Brasil. pp. 169.

Viveiros, A.T.M.; Godinho, H.P., 2009: Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. *Fish Phys. Bioch.* 35, 137-150.

Washburn, B.S.; Frye, D.J.; Hung, S.S.O.; Doroshov, S.I., 1990: Dietary effects on tissue composition, oogenesis and reproductive performance of female rainbow trout (*Onkorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 90, 179-195.

Zaniboni-Filho, E.; Weingartner, M., 2007: Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. *R. Bras. Rep. Animal.* 31, 367-373.

ANEXO I

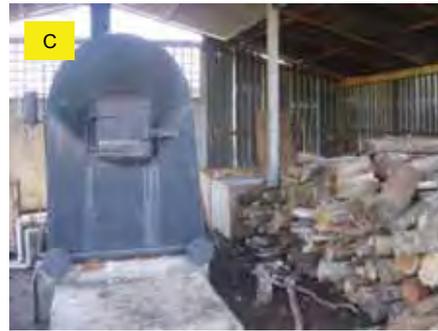


A) Tanques-rede instalados no reservatório de ITAIPU; B) Base de apoio do CENTRO DE DESENVOLVIMENTO DE TECNOLOGIAS PARA PISCICULTURA EM TANQUE-REDE localizado no município de Santa Helena – PR.



Sistemas de abastecimento das incubadoras experimentais: A) Filtro mecânico; B) Reservatório de água filtrada e reutilizada (R1); C) Reservatório direto das incubadoras (R2).





Equipamentos utilizados no processo de extrusão. A) Reservatório em formato afunilado; B) Conjunto completo: extrusora; C) Caldeira a lenha produtora de vapor.



Final do processo de extrusão com passagem da ração pelo secador, silo de armazenagem e posterior embalagem.



Fêmeas selecionados apresentando papila urogenital avermelhada e abdômen arredondado; B) Canulação intra-ovariana.





A) Canulação intra-ovariana para retirada de amostra de ovócitos; B) Amostras de ovócitos de mesmo tratamento em solução de Serra; C) Ovócitos para observação em microscópio; D) Ovócitos com a vesícula germinativa deslocada.



Distribuições de freqüência porcentual do diâmetro dos ovócitos de *P. mesopotamicus* dos diferentes tratamentos alimentares.





Seleção dos reprodutores e transporte a base de apoio; B) Seleção de fêmeas aptas à desova; C) e D) Pesagem e medida dos animais; E) Matriz de pacu com marca na nadadeira dorsal; F) Caixas de água de 1000L para manutenção de machos e fêmeas separadamente.



Aplicação de extrato hipofisário de carpa em reprodutores de pacu.



Coleta de sêmen em tubo de Falcon.



Extrusão dos ovócitos e estimativa das amostras de ovócitos para determinar a quantidade total liberada por fêmea.





Homogeneização dos ovócitos e espermatozoides, fertilização e distribuição nas incubadoras experimentais.



Ovários remanescentes

8.0 ARTIGO 2 – A ser enviado à Zygote

8.1 Biologia do desenvolvimento do pacu, *Piaractus mesopotamicus*, proveniente de matrizes mantidas em tanques-rede

RESUMO: O presente trabalho teve como objetivo descrever os eventos relacionados ao desenvolvimento embrionário do pacu, *Piaractus mesopotamicus*, ocorridos em quatro casais estocados em tanques-rede no reservatório da Usina Hidroelétrica de ITAIPU. O processo de desenvolvimento do ovo a larva é rápido (16 horas pós-fertilização a $25,27 \pm 0,67$ °C) passando por estágios de delimitação dos pólos vegetal e animal com sucessivas clivagens (30 a 120 minutos), mórula (120 a 180 minutos), blástula (180 a 300 minutos), gástrula (300 a 600 minutos), organogênese (600 a 780 minutos) com a diferenciação dos primeiros somitos, notocorda, vesículas óptica, ótica e de Kupffer, tubo neural, intestino primitivo, crescimento, alongamento e desenvolvimento caudal das larvas; e eclosão (960 minutos), onde os embriões apresentaram fortes contrações da cauda e corpo levando ao amolecimento e ruptura do córion.

Palavras-chave: embriologia, histologia, larvas, morfologia, ovos, sistema intensivo.

8.2 INTRODUÇÃO

Estudos sobre a biologia reprodutiva de peixes são de grande interesse por fornecerem subsídios para a compreensão da fisiologia das células germinativas (Faustino *et al.*, 2010; Faustino *et al.*, 2011), tendo em vista a preservação de gametas (Streit Júnior *et al.*, 2007; Isaú *et al.*, 2011), a conservação da ictiofauna e o aprimoramento de técnicas criatórias (Andrade-Talmelli *et al.*, 2001; Luz *et al.*, 2001; Nakatani *et al.*, 2001; Romagosa & Narahara, 2001a; Pereira *et al.*, 2006; Zaniboni-Filho & Weingartner, 2007; Marques *et al.*, 2008; Tomiita *et al.*, 2008; Buzollo *et al.*, 2011). Pesquisas com larvas de peixe enfocam a sistemática e a filogenia, porém nada se tem feito a respeito do desenvolvimento morfológico dos organismos durante essa etapa (Paes *et al.*, 2011). Reynalte-Tataje *et al.* (2004) salientaram a importância de identificar embriões nos ambientes naturais permitindo a avaliação precisa dos locais de desova dos peixes. Igualmente vem sendo utilizado em experimentos biotecnológicos como bioindicador ambiental para avaliar o efeito das substâncias tóxicas nos organismos aquáticos (Pereira *et al.*, 2006; Marques *et al.*, 2008; Stekoll *et al.*, 2009).

Na década de 90, verificou-se a necessidade de realizar estudos biológicos de peixes oriundos de seus habitats naturais diante da construção de barragens, uma vez que as espécies reofílicas não se reproduzem naturalmente em cativeiro. Em razão do desafio em desenvolver técnicas de reprodução induzida, Romagosa *et al.* (1990), Romagosa & Narahara (2001a) e Romagosa & Narahara (2001b) dedicaram-se ao estudo de matrizes de *Piaractus mesopotamicus* estocadas em viveiros escavados. Descreveram o desenvolvimento e diferenciação dos ovócitos da espécie confinada e acompanharam o processo de ovogênese tais como, formação e acúmulo de organelas, inclusões nucleares e/ou citoplasmáticas e a camada ou envelope folicular.

Todavia, existe atualmente uma demanda crescente pela criação do pacu em tanques-rede ou gaiolas por se tratar de uma excelente alternativa para o aproveitamento de corpos d'água inexplorados pela piscicultura convencional e de ambientes aquáticos existentes, dispensando o desmatamento de grandes áreas e evitando problemas de erosão e assoreamento (Diemer *et al.*, 2010).

Diante deste fato, Bittencourt *et al.* (prelo) avaliaram o efeito de dietas balanceadas, em matrizes de *P. mesopotamicus* alimentadas seis meses antes da maturação, e acompanharam o desempenho reprodutivo da espécie em tanques-rede. Constataram que as fêmeas aptas à indução hormonal apresentaram distribuição do diâmetro dos ovócitos unimodal, nos animais que receberam dietas contendo 18% de proteína bruta, apresentando os maiores valores das taxas de fertilização e eclosão ($p < 0,05$). Todavia, os resultados diferiram em relação aos outros tratamentos (24; 30 e 36% PB).

Partindo do conhecimento adquirido que a ontogenia dos peixes tem início com a fertilização, ou mais precisamente, com a ativação do ovócito – que a seguir, sofre alterações passando por períodos de clivagens, movimento celular e formação dos esboços dos órgãos, a implementação de experimentos relacionados ao sistema intensivo de criação é fundamental. Aliando-se a este propósito o presente trabalho objetivou acompanhar o desenvolvimento embrionário e larval do pacu, *P. mesopotamicus*, proveniente de matrizes mantidas em tanque-rede.

8.3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no “Centro de Desenvolvimento de Tecnologias para Piscicultura em Tanque-rede”, localizado na área de transição do reservatório da Usina Hidroelétrica de ITAIPU, situado no município de Santa Helena, Paraná. Para a realização do presente trabalho foram selecionados, respeitando as características morfológicas externas, quatro casais de peixes os quais foram mantidos em tanques-rede recebendo dietas contendo 18% de proteína bruta e 3300 kcal.kg⁻¹ de energia digestível Bittencourt *et al.* (prelo).

No período reprodutivo (novembro-fevereiro) os reprodutores de *P. mesopotamicus* foram pré-selecionados: machos - liberação de sêmen sob leve pressão da cavidade abdominal e fêmea - abdômen abaulado e papila urogenital intumescida e avermelhada (Romagosa *et al.*, 1990). Em seguida, transportados para o “Laboratório de Reprodução” localizado as margens do reservatório, onde foram individualmente, anestesiados (etil-aminobenzoato, nome comercial: benzocaína: 3,0g:150mL álcool 96,0°GL:40 L de água, por quatro minutos), pesados (g), medidos (cm), marcados e separados por sexo, em dois tanques circulares (1000L), com aeração e renovação de água constantes.

Associada as características externas do mesmo exemplar, por meio da técnica de canulação intra-ovariana, foram selecionadas quatro fêmeas que apresentaram frequência porcentual dos valores da Vesícula Germinativa Periférica (VGP) acima de 50% e induzidas à reprodução por meio de duas doses de 0,5 e 5,0 mg de extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC).kg⁻¹ de reprodutor, com intervalo de 12h entre as doses, segundo Bittencourt *et al.* (prelo).

Quatro machos receberam, intraperitonealmente, uma dose única de 2,0 mg de extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC).kg⁻¹ de reprodutor concomitantemente a 2ª aplicação das fêmeas. A retirada do sêmen seguiu a metodologia descrita por Sanches *et al.* (2010) e Sanches *et al.* (2011), onde o volume de sêmen liberado foi mensurado e, homogeneizado dando origem a um “pool” por tratamento.

Após um período de 240 horas-grau (somatória da temperatura da água em função do tempo – Unidades Térmicas Acumuladas - UTAs) (Ceccarelli *et al.*, 2000), as fêmeas foram massageadas na região ventral no sentido encéfalo-caudal e os ovócitos liberados (não-hidratados) de cada matriz por tratamento foram coletados em beckers (250 mL). A seguir, foi realizada a homogeneização dos ovócitos e sêmen.

As fertilizações foram realizadas sequencialmente, em recipientes de 250 mL e amostras de ovócitos (2 mL) e sêmen (200 µL) ativados com 75 mL de água (proveniente das incubadoras), homogeneizados por um minuto. Cinco alíquotas (20,0 mL) de cada unidade experimental foram transferidas para cinco incubadoras experimentais (20 L). A taxa de fertilização (TF, %) por tratamento foi estimada após 8 horas do início da hidratação dos ovos (fechamento do blastóporo) (Romagosa *et al.*, 2001c), utilizando-se 380 ovos de cada unidade experimental. Foram descartados os ovos com clivagem irregular ou opacos.

Para o acompanhamento do desenvolvimento embrionário, amostras foram coletadas e fixadas em glutaraldeído a 3% e mantidas em refrigeração. Os procedimentos de coleta foram efetuados da seguinte forma: momento da extrusão (não fertilizado), fertilização (tempo 0), cinco, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos pós-fertilização e, a partir de então, os embriões de hora em hora até o momento da eclosão.

Parte das amostras foi processada no laboratório do Instituto de Pesca, APTA, SAA, SP, segundo as técnicas histológicas rotineiras para observar as modificações morfo-estruturais (microscopia de luz). Foram obtidas secções histológicas (5µm) coradas com azul de metileno. A análise e fotodocumentação foram realizadas em fotomicroscópio Zeiss Axioscop 2[®].

O restante do material foi fotografado *in natura* com a captação das imagens realizadas em microscópio trinocular NIKON EclipseE-501.

8.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A liberação dos ovócitos (extrusão) de *P. mesopotamicus* mantidas em tanques-rede, ocorreu nove horas após a 2^a aplicação hormonal, com médias de temperatura da água de 26°C. Em seguida, foi realizada a fertilização dos ovócitos e sua transferência para as incubadoras experimentais abastecidas de água proveniente da represa de Itaipu, cujos valores médios de temperatura, oxigênio dissolvido e pH foram de $25,27 \pm 0,67$ °C; $5,21 \pm 0,83$ mg.L⁻¹ e $7,12 \pm 0,29$, respectivamente.

Os ovócitos de *P. mesopotamicus* recém-liberados apresentaram-se semelhantes aos exemplares mantidos em viveiros escavados (Romagosa *et al.*, 2001a) ou oriundos da natureza (Pinto & Castagnolli, 1984), quanto a cor, estrutura e desenvolvimento embrionário. Mostraram-se, ainda, esféricos, verdes, demersais (isto é, possuem gravidade específica maior do que a da água), permaneceram livres, envolvidos por uma camada gelatinosa, com pequeno espaço perivitelínico e não-aderentes, com diâmetros médios variando entre 907,7 e 970,3 µm. No entanto, o tamanho dos ovócitos dos peixes mantidos em tanques-rede é inferior quando

comparados aos pacus criados em viveiros escavados (Romagosa *et al.*, 1990). Segundo Rizzo & Godinho (2003) e Romagosa & Narahara (2001a) os ovos do gênero *Piaractus*, apresentam-se livres, não-adesivos, com a zona radiata lisa apresentando poros-canais abertos mostrando um arranjo menos complexo sem especializações ou coberturas, padrão típico de peixes teleósteos de água doce.

O momento da fertilização (Figuras 1A e 2A) foi considerado o tempo zero para descrever os eventos ocorridos durante a embriogênese. A polarização foi observada após 30 minutos e caracterizada pela delimitação do blastodisco (pólo animal) com formato semiesférico (Figuras 1B e 2B). Entretanto, período inferior (20 minutos) para a segregação dos pólos foi encontrado para a mesma espécie, porém mantida em tanque escavado e submetida a temperatura de 27 °C (Tomiita *et al.*, 2008). No entanto, Luz *et al.* (2001) pesquisando o *Pimelodus maculatus*, Amorim *et al.* (2009) o *Rhamdia quelen* e Marques *et al.* (2008) o *Pseudoplatystoma coruscans* encontraram a formação do blastodisco em intervalo de tempo semelhante ao presente estudo.

Passados 45 minutos da fertilização, iniciou-se a segmentação do pólo animal (Figuras 2C e 2D) com sucessivas clivagens resultando, inicialmente, em dois (Figura 1C), quatro (60 minutos; Figura 1D), oito (Figuras 2E e 2F), 16, 32 e 64 blastômeros. Os ovos de peixes podem ser classificados como telolécitos, em detrimento ao fato do vitelo concentrar-se no pólo vegetal com o citoplasma e organelas localizadas no pólo animal e, suas clivagens apresentarem-se como meroblásticas ou parciais pois ocorrem apenas no pólo animal. Essas características estão de acordo às observadas nesse estudo.

Sequencialmente as sucessivas clivagens do blastodisco, com a presença de mais de 64 blastômeros, verificou-se o estágio de mórula (Figuras 1E e 2G) aos 120 minutos pós-fertilização. Seguidamente, o estágio de blástula (Figuras 1F e 2H), onde

os limites celulares não estão bem definidos, foi atingido aos 180 minutos com proliferação de células formando uma camada estratificada. Com a reorganização dos blastômeros resulta novamente no formato esférico do ovo (Amorim *et al.*, 2009). Marques *et al.* (2008) em trabalho com o *P. coruscans*, verificaram que o estágio de mórula, é seguido pelo de blástula, onde há a formação da blastoderme, corroborando com as características encontrados neste estudo. Em adição, segundo Kimmel *et al.* (1995), nessa fase ocorre um processo importante pois o embrião entra em transição midblástula (expressão gênica), onde ocorre a formação da camada sincicial vitelínica e inicia-se a epibolia (Figuras 1G e 2I).

O princípio da gástrula (=desdobramento) (Figuras 1H e 2J), distinguida pela migração das células do blastodisco sobre o pólo vegetal por meio de movimentos de epibolia para a formação do epiblasto e hipoblasto (Amorim *et al.*, 2009), foi atingida após 300 minutos da fertilização (Figura 2K). Com o final dos movimentos de epibolia há o fechamento do blastóporo (540 minutos), alongamento do corpo do embrião e suave modificação morfológica do vitelo (Figura 1I).

A organogênese foi observada aos 600 minutos e, conforme Gilbert (2003), durante essa etapa, as células hipoblásticas do escudo embrionário convergem e se estendem anteriormente, estreitando-se ao longo da linha dorsal média do hipoblasto, dando origem ao cordomesoderma (precursor da notocorda). As células adjacentes a essa estrutura, denominadas adaxiais, são responsáveis pela formação dos somitos (Figura 1J).

Ao tempo de 660 minutos, verificou-se a presença de vesículas (óticas e de Kupffer's – situada no final do ducto pós-anal existente apenas em teleósteos com função desconhecida), somitos, os quais são necessários na organização dos padrões de segmentação dos embriões de vertebrados (Faustino *et al.*, 2010), e início do

desenvolvimento das regiões cefálica e caudal (Figura 1K). Buzzolo *et al.* (2011), monitorando o processo de embriogênese de *P. maculatus*, registraram a fase inicial de segmentação equivalente ao presente estudo, quando os ovos foram mantidos em temperaturas médias de 29 °C e, destacaram a presença das vesículas óticas e de Kupffer, notocorda e somitos, além de ressaltarem a cauda pequena e aderida ao saco vitelínico. Isaú *et al.* (2011) verificaram a diferenciação da camada germinal e a alongação do eixo crânio-caudal do embrião no estágio de organogênese ao avaliarem a estrutura dos ovócitos, os eventos pós-fertilização e a ontogenia larval do *Brycon insignis*. Reynalte-Tataje *et al.* (2001) verificaram a diferenciação cefálica e caudal aos 365 minutos pós-fertilização do *Leporinus macrocephalus*, mantidos em temperatura variando entre 26,9 e 28,8 °C, ambas espécies supracitadas foram mantidas em viveiros escavados.

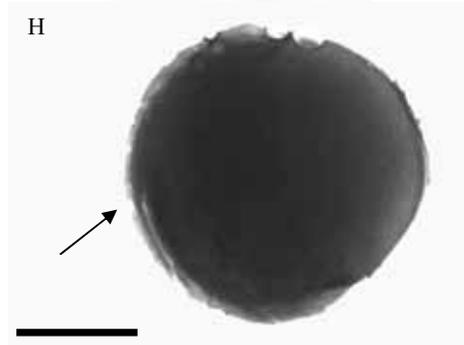
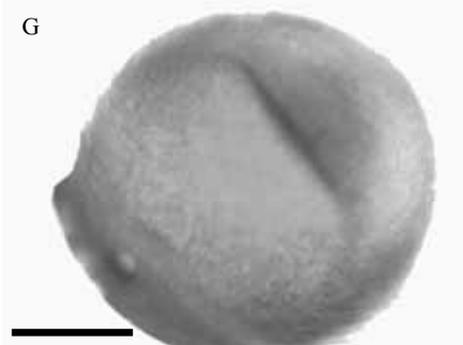
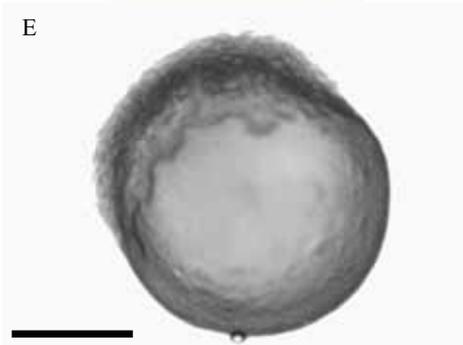
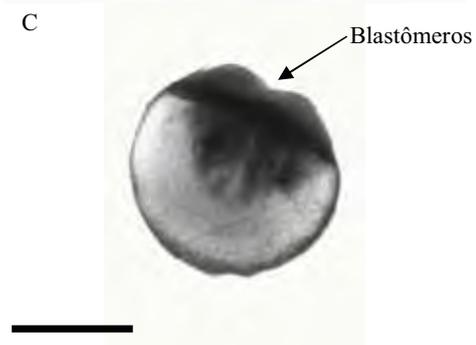
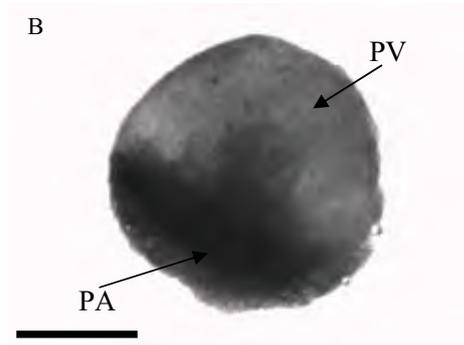
O estágio final da organogênese, aos 780 minutos (Figura 1L), definiu-se pela presença livre da cauda, formação de mais de 30 somitos e surgimento de contrações musculares. De acordo com Buzzolo *et al.* (2011), os somitos entram em miogênese para a formação dos músculos, desenvolvidos em blocos celulares (Gilbert, 2003). A visualização da notocorda, órgão provisório com função de formação do tubo neural e posterior sistema nervoso central (Gilbert, 2003), no presente estudo tornou-se clara e evidente durante esse período. Posteriormente, observaram-se os primeiros batimentos cardíacos, sendo a circulação visível. Progressivamente o córion sofre o amolecimento e ruptura do envelope. Segundo Kunz (2004) isto ocorre devido a secreção de glândulas de eclosão unicelulares que digerem o envelope e que se encontram distribuídas em diferentes áreas (regiões) do embrião, cuja função é restrita ao período de ontogenia. Essa enzima (chorionase) foi descrita em *Oncorhynchus keta*, *Oryzias latipes*, *Esox lucius*.

Neste estudo pode-se notar que a larva livre de *P. mesopotamicus* pode emergir tanto pela região da cabeça como da cauda, apresentando movimentos horizontais e verticais lentos, pois, ainda não é completo o enchimento da vesícula gasosa.

Segundo Reynalte-Tataje *et al.* (2001) as variações dos parâmetros físicos e químicos, principalmente a temperatura podem interferir diretamente no desenvolvimento do embrião, refletindo, posteriormente, nas larvas. Estudos com diferentes espécies de peixes sul-americanos comprovam que a variação no desenvolvimento do embrião está diretamente relacionada à temperatura da água de incubação (Andrade-Talmelli *et al.*, 2001; Alexandre *et al.*, 2010; Buzzolo *et al.*, 2011; Isaú *et al.*, 2011; Marques *et al.*, 2008; Tomiita *et al.*, 2008).

A eclosão das larvas de *P. mesopotamicus* ocorreu aos 960 minutos (Figuras 1M e 1N), tempo inferior ao encontrado para o *P. corruscans* quando incubados a 27 °C e superior quando submetido a 28 °C (Marques *et al.*, 2008). Todavia, para o *B. insignis* a variação de temperaturas entre 25 e 27 °C (Andrade-Talmelli *et al.*, 2001), proporcionou a eclosão das larvas no mesmo período encontrado na atual pesquisa. Corroborando com o mesmo intervalo de tempo a 28 °C, Ninhaus-Silveira *et al.* (2006) constataram a eclosão das larvas de *Prochilodus lineatus*.

Correia *et al.* (2010) relataram que as larvas recém-eclodidas de *P. mesopotamicus* são completamente despigmentadas, dando um aspecto transparente, sendo vulnerável a predadores. Entretanto, discordante das observações de Clavijo-Ayala *et al.* (2006) onde as larvas de pacu apresentaram pigmentos melanóforos na porção anterior da capsula óptica e posterior média do saco vitelínico. O mesmo foi observado neste estudo além da presença de cromatóforos dendríticos contornando a região caudal.



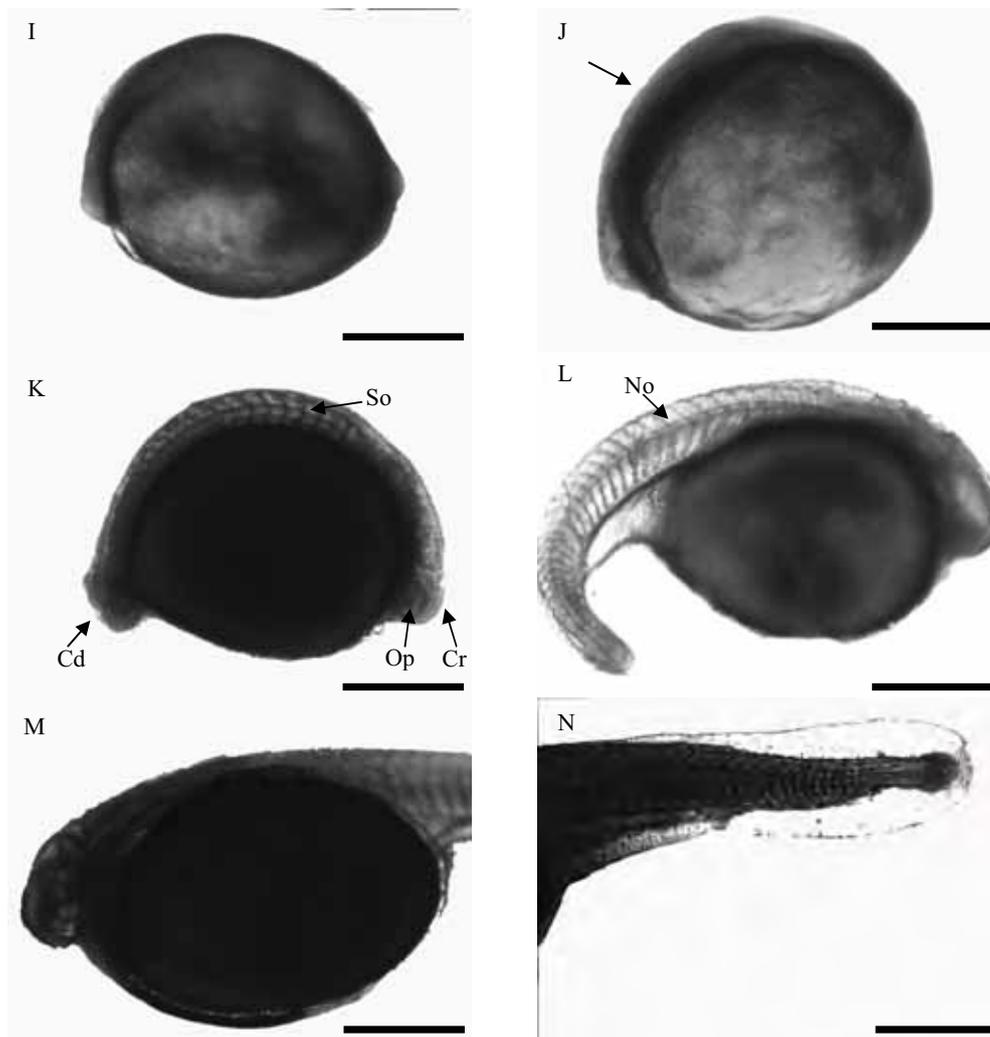
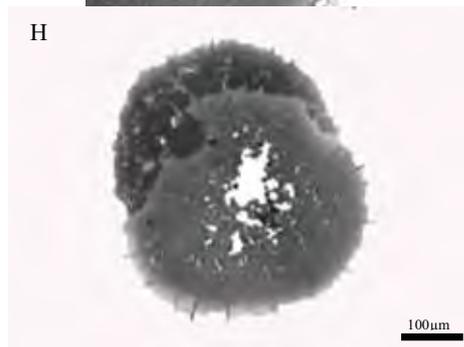
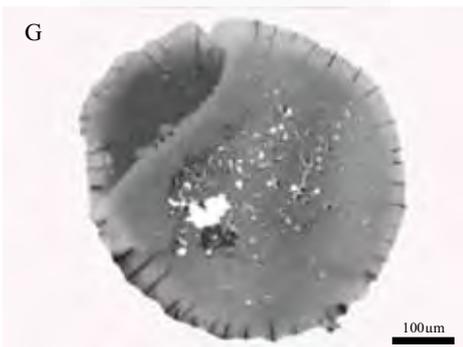
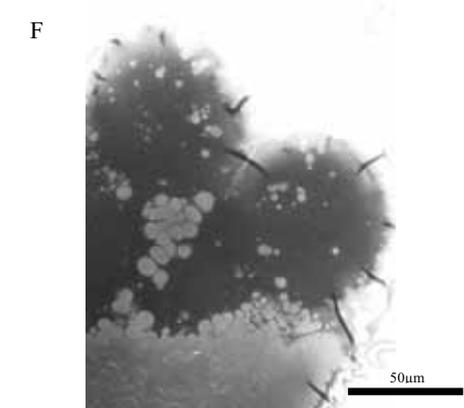
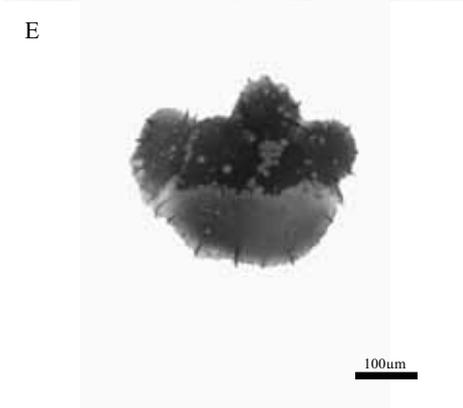
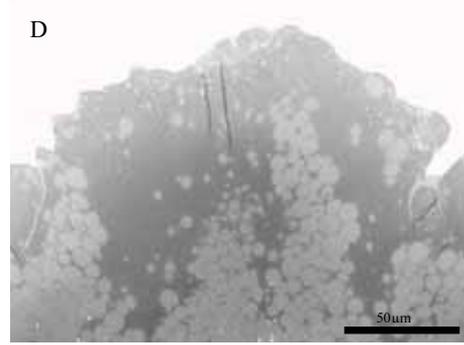
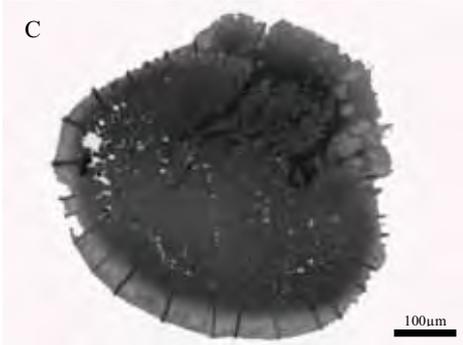
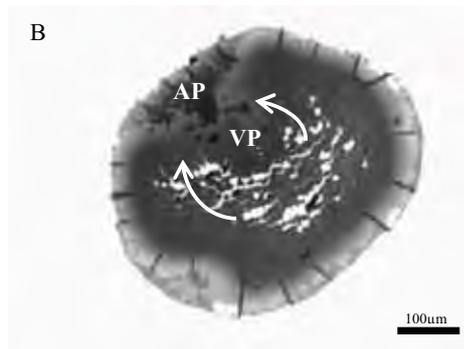
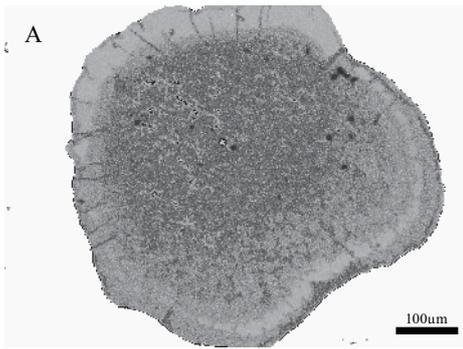


Figura 1. Fotomicrografias das fases do desenvolvimento embrionário e larval de *Piaractus mesopotamicus* proveniente de matrizes mantidas em tanque-rede. A) Ovo fertilizado e hidratado; B) Formação do blastodisco com diferenciação dos polos animal (PA) e vegetal (PV); C) Início da segmentação do polo animal e surgimento de dois blastômeros; D) Continuação das clivagens (quatro blastômeros); E) Mórula; F) Blástula; G) Início da epibolia; H) Início da gastrulação; I) Final da gastrulação; J) Organogênese; K) Desenvolvimento das regiões cefálica (crânio – Cr) com vesículas ópticas (Op) e caudal (Cd) e surgimento dos somitos (So); L) Fase final de segmentação com visualização da notocorda (No), cauda livre e início dos movimentos; M) e N) Larva recém-eclodida. Barra: 100 μ m.

Os estudos direcionados a ontogenia dos ovos e larvas das espécies piscícolas tornam-se fundamentais para aprimorar o conhecimento das características reprodutivas e elucidar questões relacionadas às criações durante a fase inicial do desenvolvimento.



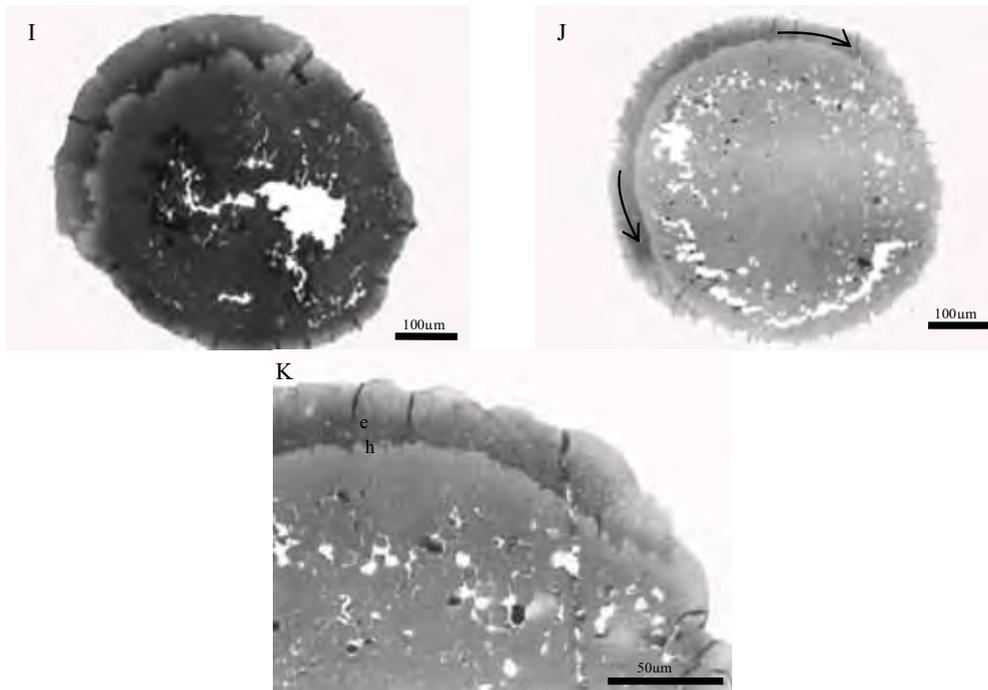


Figura 2. Fotomicrografias das fases do desenvolvimento embrionário e larval de *Piaractus mesopotamicus* proveniente de matrizes mantidas em tanque-rede. A) Ovo fertilizado e hidratado; B) Início da movimentação citoplasmática para definição dos pólos animal (AP) e vegetal (VP); C) e D) Completa formação dos pólos animal e vegetal e início da segmentação do pólo animal; E) e F) Continuação das clivagens (oito blastômeros); G) Mórula; H) Blástula; I) Início da epibolia; J) Gástrula (movimentos de epibolia); K) Formação das duas camadas: epiblasto (e) e hipoblasto (h).

8.5 CONCLUSÃO

O desenvolvimento embrionário do *Piaractus mesopotamicus* proveniente de matrizes mantidas em tanque-rede apresentou seis estágios de segmentação dos pólos vegetal e animal com sucessivas clivagens, mórula, blástula, gástrula, organogênese e eclosão.

8.6 REFERÊNCIAS

Alexandre, J.S., Ninhaus-Silveira, A., Veríssimo-Silveira, R., Buzzolo, H., Senhorini, J.A. & Chaguri, M.P. (2010). Structural analysis of the embryonic development in *Brycon cephalus* (Günther, 1869). *Zygote* **18**, 173-83.

Amorim, M.P., Gomes, B.V.C., Martins, Y.S., Sato, Y., Rizzo, E. & Bazzoli, N. (2009) Early development of the silver catfish *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) (Pisces:Heptapteridae) from the São Francisco River Basin, Brazil. *Aquac. Res.* **40**, 172-80.

Andrade-Talmeli, E.F., Kavamoto, E.T., Romagosa, E. & Fenerich-Verani, N. (2001). Embryonic and larval development of the "piabanha", *Brycon insignis*, Steindachner, 1876 (Pisces, Characidae). *Bol. Inst. Pesca* **27**, 21-8.

Bittencourt, F., Souza, B.E. de, Lui, T.A., Borella, M.I., Boscolo, W.R., Feiden, A. & Romagosa, E. (Prelo). Protein diets promote the maturation of oocytes and spawning of *Piaractus mesopotamicus* kept in cages. *J. Appl. Ichthyol.*

Buzollo, H., Veríssimo-Silveira, R., Oliveira-Almeida, I.R., Alexandre, J.S., Okuda, H.T. & Ninhaus-Silveira, A. (2011). Structural analysis of the *Pimelodus maculatus* (Lacépède, 1803) embryogenesis (Siluriformes:Pimelididae). *Neot. Ichthyol.* **9**, 601-16.

Ceccarelli, P.S., Senhorini, J.A. & Volpato, G. (2000). *Dicas em piscicultura: perguntas e respostas*. Santana Gráfica Editora: Botucatu, SP, Brasil.

Clavijo-Ayala, J.A., Vetorelli, M.P. & Portella, M.C. (2006). Desenvolvimento inicial e caracteres de identificação de larvas vitelina do pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). [online], *CIVA*, 2006. <http://www.civa2006.org/>, pp. 819-27.

Correia, M.A., Maciel, C.M.R.R., Nascimento, L.S., Maciel Júnior, A. (2010). ontogenia da pigmentação das larvas de três espécies de Characiformes, criadas em incubatório. *Enciclopédia Biosfera* **6**, 1-14.

Diemer, O., Neu, D.H., Feiden, A., Lorenz, E.K., Bittencourt, F. & Boscolo, W.R. (2010). Dinâmica Nictimeral e vertical das características limnológicas em ambiente de criação de peixes em tanques-rede. *Ci. Anim. Bras.* **11**, 24-31.

Faustino, F., Nakaghi, L.S.O. & Neumann, E. (2011). *Brycon gouldingi* (Teleostei, Characidae): aspects of the embryonic development in a new fish species with aquaculture potential. *Zygote*, **19**, 351-63.

Faustino, F., Nakaghi, L.S.O., Marques, C., Ganeco, L.N. & Makino, L.C. (2010). Structural and ultrastructural characterization of the embryonic development of *Pseudoplatystoma* spp. hybrids. *Int. J. Dev. Biol.* **54**, 723-30.

- Faustino, F., Nakaghi, L.S.O., Marques, C., Makino, L.C. & Senhorini, J.A. (2007). Fertilização e desenvolvimento embrionário: morfometria e análise estereomicroscópica dos ovos dos híbridos dos surubins (pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* x cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum*). *Acta Sci.* **29**, 49-55.
- Gilbert, S.F. (2003). *Biologia do Desenvolvimento*. Quinta edição. Ribeirão Preto:FUNPEC.
- Isaú, Z.A., Rizzo, E., Amaral, T.B., Mourad, N.M.N. & Viveiros, A.T.M. (2011). Structural analysis of oocytes, post-fertilization events and embryonic development of the Brazilian endangered teleost *Brycon incignis* (Characiformes). *Zygote* **15**, 1-10.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. & SCHILLING, T.F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* **203**, 253-310.
- Kunz, Y.W. (2004). *Developmental Biology of Teleost Fishes*. Springer, The Netherlands.
- Luz, R.K., Reynalte-Tataje, D.A., Ferreira, A.A. & Zaniboni-Filho, E. (2001). Desenvolvimento embrionário e estágios larvais do mandi-amarelo *Pimelodus maculatus*. *Bol. Inst. Pesca* **27**, 49-55.
- Marques, C., Nakaghi, L.S.O., Faustino, F., Ganeco, L.N. & Senhorini, J.A. (2008). Observation of the embryonic development in *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) under light and scanning electron microscopy. *Zygote* **16**, 333-42.
- Nakatani, K., Agostinho, A.A., Baumgartner, G., Bialetzki, A., Sanches, P.V., Makrakis, M.C. & Pavanelli, C.S. (2001). *Ovos e larvas de peixes de água doce, desenvolvimento e manual de identificação*. Maringá: EDUEM, Nupélia.
- Ninhaus-Silveira, A., Foresti, F. & Azevedo, A. (2006). Structural and ultrastructural analysis of embryonic development of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiforme; Prochilodontidae). *Zygote* **14**, 217-29.
- Paes, M.C.F., Makino, L.C., Vasquez, L.A., Fernandes, J.B.K. & Nakaghi, L.S.O. (2011). Early development of *Astronotus ocellatus* under stereomicroscopy and scanning electron microscopy. *Zygote*, **18**, 1-8.
- Pereira, C.R., Barcellos, L.J.G., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M., Ritter, F. & Silva, L.B. (2006). Embryonic and larval development of jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard, 1824, Pisces, Teleostei), a south american catfish. *Braz. J. Biol.* **66**, 1057-63.
- Pinto, M.M.G. & Castagnolli, N. (1984). Desenvolvimento inicial do pacu, *Colossoma mitrei* (BERG, 1895). In *Anais do III Simpósio Brasileiro de Aquicultura*, São Carlos, São Paulo, 523-35.

- Reynalte-Tataje, D., Zaniboni-Filho, E. & Esquivel, J.R. (2004). Embryonic and larvae development of piracanjuba, *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1849 (Pisces, Characidae). *Acta Sci.* **26**, 67-71.
- Reynalte-Tataje, D., Zaniboni-Filho, E. & Muelbert, B. (2001). Stages of the embryonic development of the piavuçu *Leporinus macrocephalus* (Garavello & Britski, 1988). *Acta Sci.* **23**, 823-27.
- Rizzo, E. & Godinho, H.P. (2003). *Superfície dos ovos de peixes Characiformes e Siluriformes*. In: Godinho, H.P. & Godinho, A.L. (Ed). Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas. <http://www.sfrancisco.bio.br/>, pp. 468.
- Romagosa, E. (2008). *Avanços na reprodução de peixes migradores*. In: Cyrino, J.E.C. & Urbinati, E.C. (Ed). Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aquicultura. Piracicaba: Copiadora Luiz de Queiróz, pp. 1-16.
- Romagosa, E. & Narahara, M.Y. (2001a). Crescimento e diferenciação dos ovócitos de pacu, *Piaractus mesopotamicus*. *Acta Sci.* **24**, 433-38.
- Romagosa, E. & Narahara, M.Y. (2001b). Células germinativas dos testículos de pacu, *Piaractus mesopotamicus*. *Bios* **9**, 15-26.
- Romagosa, E., Narahara, M.Y., Borella, M.I. & Fenerich-Verani, E.N. (2001c). Seleção e caracterização de fêmeas de matrinxã, *Brycon cephalus*, induzidas a reprodução. *B. Inst. Pesca* **27**, 139-47.
- Romagosa, E., Paiva, P. & Godinho, H.M. (1990). Pattern of oocyte diameter frequency distribution in females of the pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887) (= *Colossoma mitrei* Berg 1895), induced to spawn. *Aquaculture* **86**, 105-10.
- Sanches, E.A., Baggio, D.M., Piana, P.A., Souza, B.E. & Bombardelli, R.A. (2011). Artificial fertilization of oocytes and sperm activation in pacu: effects of the spermatozoa:oocyte ratio, water volume, and *in natura* semen preservation. *R. Bras. Zootec.* **40**, 1-6.
- Sanches, E.A., Bombardelli, R.A., Marcos, R.N., Neumann, G., Rebechi, C.P. & Romagosa, E. (2010). Sperm motility of *Rhamdia quelen* studied by means of computer-assisted analysis by free software. *Aquac. Res.* **42**, 153-56.
- Stekoll, M.S., Smoker, W.W., Failor-Rounds, B.J., Wang, I.A. & Joyce, V.J. (2009). Response of the early developmental stages of hatchery reared salmonids to major ions in a simulated mine effluent. *Aquaculture* **298**, 172-81.
- Streit Júnior, D.P., Digmayer, M., Ribeiro, R.P., Sirol, R.N., Moraes, G.V. & Galo, J.M. (2007). Embriões de pacu submetidos a diferentes protocolos de resfriamento. *Pesq. Agropec. Bras.* **42**, 1199-1202.
- Tomiita, F.I., Gonçalves, L.U., Araújo, A.H.F., Fomari, D.C. & Viegas, E.M.M. (2008). Desenvolvimento embrionário de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In *Anais do III Congresso da Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática*, Maringá, Paraná.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos relacionando nutrição com reprodução de espécies nativas tropicais são escassos. Os recursos financeiros exigidos são elevados tanto para a compra e manutenção das estruturas quanto para a aquisição de insumos e elaboração das dietas, configurando um gargalo para realização de pesquisas que abordem os assuntos supracitados.

Independentemente das dificuldades encontradas durante o período experimental, os resultados alcançados poderiam ser reforçados com a avaliação de outros parâmetros.

Enfim, a continuidade das pesquisas se faz necessária para dar suporte e embasar projetos futuros e viabilizar a difusão das técnicas nutricionais e reprodutivas aos piscicultores, os quais são os maiores interessados em aprimorar as práticas empregadas durante a criação.