

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA - CAUNESP

Programa de Pós-Graduação em Aquicultura

ONTOGENIA DO SISTEMA SENSORIAL DE PACU
***Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887)**
(CHARACIDAE: SERRASALMIDAE)



por

JOHN ALEJANDRO CLAVIJO-AYALA

Jaboticabal – SP
2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA CAUNESP

Programa de Pós-Graduação em Aquicultura

ONTOGENIA DO SISTEMA SENSORIAL DE PACU
***Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887)**
(CHARACIDAE: SERRASALMIDAE)



por

JOHN ALEJANDRO CLAVIJO-AYALA

*Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Aquicultura do Centro
de Aquicultura da Universidade Estadual
Paulista, como requisito parcial à
obtenção do título de:*

Mestre em Aquicultura

Orientadora: Profa. Dra. Maria Célia
Portella

Jaboticabal – SP
2008

Clavijo-Ayala, John Alejandro
C617 Ontogenia do Sistema Sensorial de Pacu *Piaractus*
o *mesopotamicus* (Holmberg, 1887) (Characidae: Serrasalminidae) /
John Alejandro Clavijo-Ayala. – – Jaboticabal, 2008
xiii, 53 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Centro de Aquicultura, 2008
Orientadora: Maria Célia Portella
Banca examinadora: Irene Bastos Franceschini Vicentini,
Marcos Antonio Cestarolli
Bibliografia

1. *Piaractus mesopotamicus*. 2. Ontogenia. 3. Sistema
sensorial. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.31

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

e-mail: johnalejandroclavijoayala@yahoo.com

Solo se comprende algo cuando se conoce su génesis

L. C.

Dedicatória

A mi Madre Amparo

A mi Abuelita Rosa Maria

***A mi Familia Nestor Gerardo, Jose Manuel, Rosa Alcira,
Juan Sebastián, y Nicolás Alejandro***

A mis Amigos Juan Alberto, Camilo, Farith, Leon Felipe, Lina Maria

A mi Amada Janaina

***...Así, sea por tu imagen o por mi amor, tú, aunque ausente,
estás siempre presente conmigo, pues no puedes alejarte más allá
de mis pensamientos, y yo quedo siempre con ellos y ellos conmigo...***

W.S.

Agradecimentos

Ao Programa de Pós-graduação em Aqüicultura do Centro de Aqüicultura da Universidade Estadual Paulista - Caunesp, pela oportunidade de adiantar os meus estudos de Mestrado.

À minha orientadora Professora Doutora Maria Célia Portella, por toda a sua paciência, apoio, e confiança oferecida durante a realização dos meus estudos e minha vida no Brasil.

Aos embriões e larvas de pacu que foram utilizados neste estudo. O fato de tirar suas vidas só se justificará se as informações derivadas deste estudo realmente contribuirão ao maior conhecimento e preservação da sua espécie.

Ao Programa de Estudante Convênio de Pós-graduação - PEC-PG e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela bolsa que possibilitou o desenvolvimento de meus estudos e a minha permanência no Brasil.

Ao Caunesp, a todos os funcionários, técnicos, companheiros, professores, pelo auxílio, colaboração, aprendizado e exemplo oferecidos.

Ao Programa de Pós-graduação em Aqüicultura do Centro de Aqüicultura da Universidade Estadual Paulista – Caunesp, pelo auxílio financeiro e de materiais fornecidos para o desenvolvimento deste estudo.

Aos meus colegas, companheiros e amigos do Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos, em especial: Rodrigo Takata, Luís Otávio Martini Del-Guerra, Natália de Jesus Leitão, Olívia Cristina Camilo Menossi e Luis Fernando Bellam Fedrizi, pela paciência, colaboração, apoio e amizade oferecidos. Ao Camilo Guerrero, por suas orientações desde a minha chegada ao Brasil, e ao Camilo Prieto pela amizade oferecida durante minha estadia aqui.

Agradecimentos especiais ao Professor Doutor Wagner Cotroni Valenti, e em seu nome, ao Setor de Carcinicultura do Caunesp, pelo auxílio, apoio e facilidades oferecidos durante o desenvolvimento deste estudo.

Agradecimentos especiais à Professora Doutora Irene Bastos Franceschini Vicentini, pela orientação, colaboração e compreensão oferecidas durante o desenvolvimento deste estudo e de meus trabalhos no Caunesp.

Ao Professor Doutor Eliot W. Kitajima, coordenador do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica aplicada à Pesquisa – NAP / MEPA, da escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” / USP, Piracicaba, pelos ensinamentos e facilidades oferecidos durante o desenvolvimento deste estudo.

À Magali Gazzolla Kimpara e Isaque Kimpara, e à Doracy Lorandi Portella e Cícero Portella Filho, pelas orientações, apoio e confiança oferecidos durante várias de minhas estadias nas cidades de Campinas e Piracicaba, respectivamente.

À Claudia Aparecida Rodrigues e Carlos Antônio Homem, técnicos do Laboratório de Microscopia Eletrônica da FCAV / UNESP – Jaboticabal, pela atenção e auxílio oferecidos durante o desenvolvimento deste estudo.

Às Professoras Doutoras Eliane Gonçalves de Freitas e Irene Bastos Franceschini Vicentini, membros da Banca Examinadora da Aula Geral de Qualificação, e à Professora Doutora Irene Bastos Franceschini Vicentini e ao Doutor Marcos Antonio Cestarolli, membros da Banca Examinadora da Defesa, pelas excelentes correções e pertinentes sugestões feitas ao trabalho.

A todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste estudo, a todos aqueles que com seu bom exemplo me influenciaram para tentar fazer as coisas cada vez melhor, e a aqueles que com a sua mediocridade me influenciaram, ainda mais, para fazer muito mais do mínimo esperado.

Ao Hans Vodka Morichalito Smirnoff, Carmela, Lucca, Nick, Roseli, Danilo, Mônica, sr. Mauro, pelo carinho e auxílio recebido.

Agradecimentos especiais a Janaina Mitsue Kimpara, pelo amor, paciência, companheirismo e convívio durante a minha permanência no Brasil.

Agradecimientos especiales a mi Familia y a mis Amigos, especialmente a mi querida madre Amparo y mi Abuelita y Amiga Rosa Maria, por la comprensión, apoyo y constante estímulo durante mi estancia en el Brasil.

A todos ellos, muchas gracias !!!

Sumário

página

Resumo	viii
Abstract	x
Resumen	xii

Capítulo I

Introdução	1
Desenvolvimento, estrutura e função do Sistema Sensorial em peixes	
<i>Origem embrionária dos placodes sensoriais</i>	5
<i>Organismos aquáticos e meio aquático</i>	6
Do pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i>	11
Objetivo	11
Referências	12

Capítulo II

Ontogenia do Sistema Sensorial do pacu *Piaractus mesopotamicus*
(Holmberg, 1887) (CHARACIDAE: SERRASALMIDAE)

Resumo / Abstract / Resumen	20
Introdução	26
Material e Métodos	27
Resultados	30
Discussão	37
Conclusões	46
Referências	48

CLAVIJO-AYALA, J. A. 2008. Ontogenia do sistema sensorial de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) (Characidae: Serrasalminidae). Dissertação (Mestrado em Aqüicultura). Centro de Aqüicultura da Universidade Estadual Paulista - Caunesp. Jaboticabal, SP, Brasil. 53 p.

RESUMO O pacu *Piaractus mesopotamicus* é uma das espécies de maior relevância na piscicultura de águas quentes no Brasil, destacando-se pela qualidade de sua carne e desempenho em sistemas de cultivo. Apesar do avanço no estudo da biologia, anatomia e morfologia da espécie, os aspectos relacionados com o desenvolvimento inicial do sistema sensorial são praticamente desconhecidos. Este estudo teve por objetivo descrever o desenvolvimento inicial de pacu *Piaractus mesopotamicus*, com ênfase na ontogenia das estruturas sensoriais. Para isto, amostras seriadas de embriões e larvas em desenvolvimento foram coletadas desde as 9 horas pós fertilização (hpf) até os 25 dias pós eclosão (dpe), e destinadas para análises morfológicas, histológicas e de microscopia eletrônica de varredura. O desenvolvimento embrionário da espécie é rápido, e cerca das 19 hpf (a $26,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$), as larvas eclodem num estado altricial ($3,19 \pm 0,04$ mm comprimento notocordal - CN; $0,477 \pm 0,061$ mm³ volume do saco vitelino - VSV). Na eclosão, o desenvolvimento do sistema sensorial é limitado: no epitélio olfatório observam-se neurônios sensoriais ciliados e neurônios sensoriais com microvilosidades; a presença de mecanorreceptores é restrita ao neuromasto ótico imaturo; o desenvolvimento do ouvido interno é incipiente, observa-se a presença de dois otólitos em cada cápsula ótica, mas a larva ainda não apresenta estabilidade na coluna de água nem coordenação nos seus movimentos; e os olhos apresentam-se com pouco ou nenhum pigmento, lente diferenciada e separada da córnea, e retina não estratificada. No entanto, o desenvolvimento pós-embrionário do sistema sensorial é acelerado: a partir de 1 dpe o epitélio olfativo se encontra coberto por uma densa camada de cílios não sensoriais que se distribuem tanto na vesícula olfatória quanto na região epitelial próxima; aos 2,5-3 dpe, os olhos apresentam-se totalmente pigmentados; aos 4 dpe, é possível identificar células quimiossensoriais isoladas na região pós-ótica; o sistema da linha lateral se apresenta claramente definido com a linha lateral principal, linha lateral secundária e linhas de neuromastos livres na região cranial; e as larvas

exibem estabilidade horizontal na coluna de água, assim como habilidades natatórias desenvolvidas, e é possível identificar as máculas e cristas no ouvido interno; aos 10 dpe já se observa a retina estratificada e a presença do nervo óptico; e observa-se a presença de botões gustativos tanto na superfície interna do lábio inferior quanto na cavidade oral. O pacu “alinha” o desenvolvimento das estruturas sensoriais, craniais e locomotoras e, no momento de esgotar suas reservas vitelinas (4-5 dpe), se converte em um organismo com capacidade de perceber, identificar, perseguir e capturar presas, o que possibilita seu crescimento e, ao mesmo tempo, perceber, identificar e fugir de potenciais predadores e/ou situações de desconforto, o que permite a sua sobrevivência. No momento em que esgota suas reservas vitelinas, o pacu inicia uma nova forma de interação organismo-ambiente, convertendo se num organismo exclusivamente exotrófico. O rápido desenvolvimento das estruturas sensoriais na espécie possibilita esse tipo de interação.

Palavras-chave: Pacu; *Piaractus mesopotamicus*, Quimiorrecepção; Mecanorrecepção; Ouvido interno; Fotorrecepção.

CLAVIJO-AYALA, J. A. 2008. Ontogeny of the sensorial system in pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) (Characidae: Serrasalminidae). Dissertation (Master Degree in Aquaculture). Aquaculture Research Center, São Paulo State University - Caunesp. Jaboticabal, SP, Brazil. 53 p.

ABSTRACT Pacu, *Piaractus mesopotamicus*, is one of the species of major importance for warmwater fish farming in Brazil due to its meat quality and performance in culture systems. Despite the advances in the study of biology, anatomy and morphology of the species, the aspects related to the early development of the sensorial system are unknown. The aim of this study was to describe the initial development of pacu *Piaractus mesopotamicus*, with emphasis on the ontogeny of the sensorial structures. Embryos and larvae were serially sampled during development, from the 9 hours after fertilization (haf) to the 25 days after hatching (dah), and subjected to the morphology, histology and scanning electron microscopy analysis. The embryonic development of the species is fast: about 19 haf (at $26,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$), larvae hatch in an altricial state (3.19 ± 0.04 mm notochordal length - NL; 0.477 ± 0.061 mm³ yolk-sac volume - YSV). At hatching, the sensorial system development is limited: in the olfactory epithelium, there are ciliated sensorial neurons and microvillous sensorial neurons; the mechanoreceptors are restricted to the immature otic neuromast; the development of the inner ear is incipient, with two otoliths in each otic capsule, but larvae do not show neither stability in the water column or coordination of their movements; the eyes have no or few pigment, with lens differentiated and separated from the cornea, and non-stratified retina. However, the post-embryonic development of the sensorial system is accelerated: from the 1st dah the olfactory epithelium is covered by a dense layer of non sensorial cilia, which are distributed in the olfactory vesicle and in the epithelium region around it; at 2,5-3 dah, the eyes are totally pigmented; from the 4th dah it is possible to identify solitary chemosensorial cells in the post-otical region; the lateral line system is clearly defined with the main lateral line, secondary lateral line and lines of free neuromasts in the cranial region; and the larvae exhibit horizontal stability in the water column and swimming abilities developed, it is also possible to verify maculas and cristas in the inner ear; at 10 dph, it is already observed the stratified

retina and the presence of the optical nerve, and taste buds are observed in the inner surface of the inferior lip and in the oral cavity. Pacu “alines” the development of the sensorial, cranial and locomotion structures and, at exhausting its yolk stock (4-5 dah), becomes an organism capable of sensing, identify, chase and capture preys, which makes it possible for it to grow. Moreover, it is able to sense, identify, and run away from potential predators and/or uncomfortable situations, ensuring its survival. As soon as pacu has no yolk stock, it begins a new kind of interaction organism-environment, becoming an exclusive exotrophic organism. The rapid development of the sensorial structures in this species enables this interaction.

Key words: Pacu, *Piaractus mesopotamicus*, Chemoreception; Mechanoreception; Inner ear; Photoreception.

CLAVIJO-AYALA, J. A. 2008. Ontogenia del sistema sensorial de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) (Characidae: Serrasalminae). Disertación (Maestría en Acuicultura). Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista - Caunesp. Jaboticabal, SP, Brasil. 53 p.

RESUMEN El pacu *Piaractus mesopotamicus* es una de las especies de mayor relevancia dentro de la piscicultura de aguas cálidas en Brasil, destacándose por la cualidad de su carne y desempeño en sistemas de cultivo. A pesar del avance en el estudio de la biología, anatomía y morfología de la especie, son prácticamente desconocidos los aspectos relacionados con el desarrollo inicial del sistema sensorial. Este estudio tubo por objetivo describir el desarrollo inicial de pacu *Piaractus mesopotamicus* haciendo énfasis en la ontogenia de las estructuras sensoriales. Para esto, muestras seriadas de embriones y larvas en desarrollo fueron colectadas desde las 9 horas pos fertilización (hpf) hasta los 25 días pos eclosión (dpe), y destinadas para análisis morfológicos, histológicos y de microscopia electrónica de barrido. El desarrollo embrionario de la especie es rápido, y cerca de las 19 hpf (a $26,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) las larvas eclosionan en un estado altricial ($3,19 \pm 0,04$ mm longitud notocordal - LN; $0,477 \pm 0,061$ mm³ volumen del saco vitelino - VSV). Al momento de la eclosión el desarrollo del sistema sensorial es limitado: en el epitelio olfativo se observan neuronas sensoriales ciliadas y neuronas sensoriales con micro vellosidades; la presencia de mecano receptores esta restringida al neuromasto ótico inmaduro; el desarrollo del oído interno es incipiente, se observa la presencia de dos otolitos en cada cápsula ótica, pero la larva no presenta estabilidad en la columna de agua ni coordinación en sus movimientos; y los ojos se presentan con poco o ningún pigmento, lente diferenciada y separada de la córnea, y retina no estratificada. Sin embargo, el desarrollo pos embrionario del sistema sensorial es rápido: a partir de 1 dpe el epitelio olfativo se encuentra cubierto por una densa capa de cilios no sensoriales que se distribuyen en la vesícula olfativa como en la región epitelial próxima a ella; a los 2,5-3 dpe, los ojos se observan totalmente pigmentados; a los 4 dpe, es posible identificar células quimio sensoriales aisladas en la región pos ótica; el sistema de la línea lateral se encuentra claramente definido con la línea lateral principal, línea lateral secundaria y líneas de

neuromastos libres en la región craneal; las larvas exhiben estabilidad horizontal en la columna de agua, así como habilidades natatorias, y es posible identificar máculas y cristas en el oído interno; a los 10 dpe ya se observa la retina estratificada y la presencia del nervio óptico; y se observa la presencia de botones gustativos en la superficie interna del labio inferior así como en la cavidad oral. El pacu “alinea” el desarrollo de las estructuras sensoriales, craneales y locomotoras, y al momento de agotar sus reservas vitelinas (4-5 dpe), se convierte en un organismo con capacidad de percibir, identificar, perseguir e capturar presas, lo que posibilita su crecimiento y, al mismo tiempo, percibir, identificar y huir de potenciales predadores y/o situaciones de incómodas, lo que permite su supervivencia. Al momento de agotar sus reservas vitelinas, el pacu inicia una nueva forma de interacción organismo-ambiente, convirtiéndose en un organismo exclusivamente exotrófico. El rápido desarrollo de las estructuras sensoriales en la especie posibilita ese tipo de interacción.

Palabras-clave: Pacu; *Piaractus mesopotamicus*; Químico recepción; Mecano recepción; Oído interno; Foto recepción

CAPITULO I

INTRODUÇÃO

A ontogenia inicial em peixes caracteriza-se por uma série de importantes mudanças em estrutura e função, reflexo da rápida evolução morfológica, fisiológica e de hábitos e comportamentos pelos quais passam embriões, larvas e juvenis durante o início de seu desenvolvimento (Blaxter, 1986; Noakes & Godin, 1988; Balon, 1990). Neste contexto, o estudo da organogênese inicial ajuda a compreender a biologia do desenvolvimento das espécies e apóia os estudos de morfologia e fisiologia descritiva, comparativa e experimental, além de auxiliar nos estudos sistemáticos e taxonômicos, ao apresentar elementos de juízo na tarefa de identificação de amostras obtidas em ambientes naturais (Kendall *et al.*, 1984; Nakatani *et al.*, 2001).

O estudo do desenvolvimento inicial em peixes é também uma ferramenta fundamental nos sistemas de produção, tanto de espécies de corte quanto ornamentais, pois fornece informações definitivas sobre o tipo de manejo que pode ou deve ser aplicado, ajudando a responder questões críticas como, por exemplo: quais as variáveis físicas, químicas, ou biológicas que afetam ou podem afetar os processos de desenvolvimento embrionário e larval; qual é o momento (horas após fertilização - hpf) mais adequado para se determinar as taxas de fertilização e sobrevivência durante a incubação e larvicultura controladas; quando e de que forma a larva esgota suas reservas vitelínicas, tornando-se um organismo exclusivamente exotrófico; quando a larva tem a capacidade de identificar, perseguir e capturar suas presas e, ao mesmo tempo, fugir de seus possíveis ou potenciais predadores ou situações de desconforto; quando a larva em desenvolvimento atinge seu nível máximo de diferenciação morfofisiológica, transformando-se num juvenil?

As respostas a essas perguntas somente podem ser obtidas com êxito por meio do estudo sistemático do desenvolvimento inicial dos peixes. Além disso, o conhecimento da dinâmica da biologia do desenvolvimento de uma espécie é fundamental para

entender as relações que seus embriões, larvas e juvenis têm em ambientes naturais (Balon, 1990; Araújo-Lima & Goulding, 1997; Nakatani *et al.*, 2001).

Balon (1959, 1984 a, b, 1990) descreve o desenvolvimento inicial em peixes num modelo saltatório, onde importantes alterações em estrutura e função são precedidas por períodos de menor desenvolvimento (Figura 1). O autor exemplifica como várias estruturas associadas a um sistema ou órgão coordenam ou alinham suas taxas de desenvolvimento e diferenciação, tornando-se simultaneamente funcionais e iniciando uma nova função vital para o organismo (*...this “switch” is that I call a threshold, a rapid transition from one quality (steady state) of the organ-organ or organism-environment interaction, to another... Balon, 1984 b*).

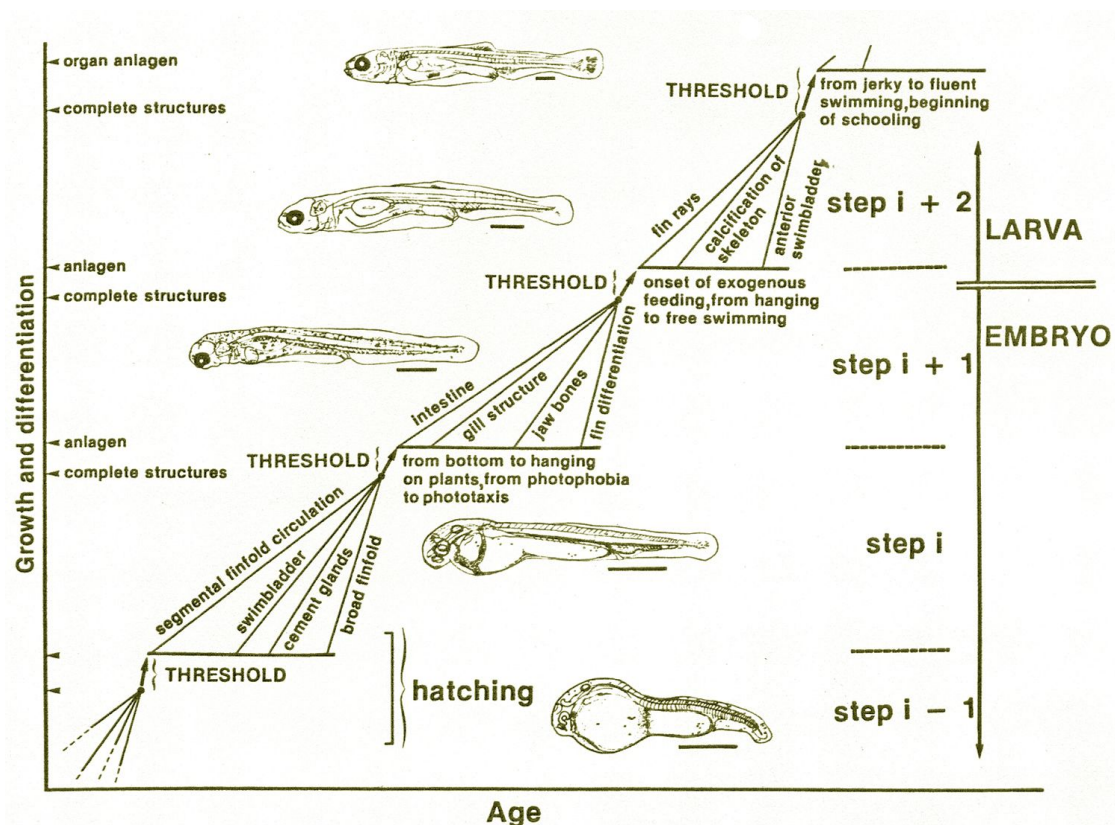


Figura 1. Esquema apresentado originalmente por E. K. Balon em 1959 para ilustrar a ontogenia inicial de *Abramis ballerus*, e, com ele, a teoria da ontogenia saltatória em peixes. O autor delimita os períodos embrionário e larval a partir do início da alimentação exógena.

Na Figura 1 pode-se observar como Balon (1959) identifica períodos em que o desenvolvimento de órgãos é gradual; e outros em que se atinge o máximo nível de diferenciação e desenvolvimento desses órgãos, modificando dramaticamente sua estrutura e função e, portanto, as relações do embrião ou larva com seu entorno (mudanças na foto-resposta, na utilização / seleção de substrato e fontes nutricionais, desenvolvimento de habilidades natatórias).

O momento da eclosão delimita os períodos embrionário e larval (*sensu* Kendall *et al.*, 1984^{*}), mas não representa, do ponto de vista do avanço do desenvolvimento morfológico, um evento decisivo na ontogenia inicial em peixes. A eclosão não está intimamente ligada a um estágio de desenvolvimento determinado, e pode ser afetada por fatores tais como a temperatura de incubação, a concentração de oxigênio dissolvido, a salinidade, o pH, entre outros (Czerkies *et al.*, 2001). Apesar disto, é fundamental compreender como a eclosão gera, instantaneamente, novas formas de interação organismo-ambiente (Balon *op. cit.*). Após a eclosão, as larvas têm de se adaptar a uma nova vida em águas abertas, e sua sobrevivência dependerá de sua capacidade de captar informações relativas ao meio e de gerar as respostas apropriadas a elas.

Muitas espécies de peixes Neotropicais de Characiformes e Siluriformes de interesse comercial (gêneros *Piaractus*, *Colossoma*, *Mylossoma*, *Brycon*, *Salminus*, *Prochilodus*, *Leporinus*, *Pseudoplatystoma*, *Pimelodus*, entre outros), realizam migrações reprodutivas ao início da temporada de cheias, e liberam seus gametas em águas abertas, o que indica a ausência de cuidado parental (Araújo-Lima & Goulding, 1997; Machado-Allison, 1987, 1990; Vazzoler, 1996; Zaniboni-Filho & Weingartner, 2007). A liberação dos gametas nos corpos principais dos rios tem importantes implicações no desenvolvimento embrionário e larval e na sobrevivência dessas espécies. Os grandes volumes de água oferecem uma estabilidade térmica única e uma alta provisão de oxigênio, necessários para um desenvolvimento embrionário normal (Clavijo-Ayala & Arias 2003). Além disso, a liberação dos gametas em águas abertas facilita a sua distribuição ao longo do leito dos rios e em zonas recentemente inundadas, locais ricos

^{*} Ver figuras 5 e 6 em Kendall *et al.*, (1984). Outras informações relevantes sobre a terminologia do desenvolvimento inicial em peixes encontram-se em Youson (1988).

em alimento e refúgio, mas que também podem albergar potenciais predadores (Mago-Leccia, 1970; Machado-Allison, 1990; Fregadolli, 2003).

Balon (1975) observa que o reduzido conteúdo de vitelo em ovos de peixes com desenvolvimento altricial traz como consequência embriões e larvas de pequeno tamanho, o que facilita a difusão de oxigênio por todo o corpo. Observa também como larvas pelágicas com desenvolvimento indireto não desenvolvem órgãos respiratórios especializados e como geralmente é tardia a aparição de eritrócitos no plasma sanguíneo. Igualmente, ovos pequenos originam larvas com pouca reserva vitelínica, que é esgotada pouco tempo após a eclosão (Osse *et al.* 1997).

Espécies Neotropicais de desova total têm um desenvolvimento indireto, com larvas que ao momento da eclosão apresentam características altriciais, como pequeno tamanho, natação vertical errática, ausência dos primórdios das nadadeiras peitorais, trato digestório rudimentar sem aberturas oral nem anal, e rápida absorção do vitelo (Machado-Allison, 1990; Nakatani *et al.*, 2001). Apesar dos múltiplos padrões de desenvolvimento embrionário e larval dessas espécies, pode-se afirmar que larvas altriciais Neotropicais eclodem num estado incipiente de desenvolvimento do sistema sensorial. Ao examinar larvas recém-eclodidas de várias espécies Characiformes (*Piaractus mesopotamicus*, *Brycon amazonicus* e *Prochilodus linneatus*), pode-se observar a presença de olhos não funcionais, com pouco ou nenhum pigmento; a presença de mecanorreceptores é limitada ao neuromasto ótico; o desenvolvimento do ouvido interno é incipiente, as larvas não exibem movimentos natatórios coordenados nem estabilidade horizontal na coluna de água; e não é possível identificar botões gustativos. Somente no epitélio olfativo pode observar-se algum grau de diferenciação celular (Clavijo-Ayala & Portella *em preparação*). Diversos autores descrevem um padrão similar de desenvolvimento inicial do sistema sensorial em larvas pelágicas originárias de outras latitudes (Iwai, 1980; Blaxter, 1986; Noakes & Godin, 1988). No entanto, a descrição do desenvolvimento do sistema sensorial em espécies Neotropicais permanece ainda em um estado inicial, em muitos casos a informação é fragmentada e especulativa (Nakatani *et al.*, 2001).

DESENVOLVIMENTO, ESTRUTURA E FUNÇÃO DO SISTEMA SENSORIAL EM PEIXES

Origem embrionária dos placodes sensoriais

O sistema nervoso central dos vertebrados se desenvolve a partir do esboço primário, o tubo neural. A cordamesoderme diferencia-se e induz a formação do tubo neural, o qual posteriormente diferencia-se (cefalização) em uma porção anterior (prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo) e uma posterior (medula espinal). A cefalização avança por meio do desenvolvimento das cristas neurais e placodes. Os placodes derivam da ectoderme adjacente ao tubo neural, e dão origem a distintos elementos do sistema sensorial (Balinsky, 1975).

Em peixes, muitos dos órgãos derivados da epiderme aparecem em forma de placas do epitélio germinativo. Os placodes originam-se como engrossamentos pareados do epitélio ectodérmico colunar cefálico, que posteriormente se aprofundam para originar distintos tipos de estruturas, especialmente componentes do sistema nervoso periférico e sensorial cranial. Desta forma, os placodes sensoriais da linha lateral originam derivados mecano e eletrorreceptores, o placode ótico origina o aparelho vestibular e o ouvido interno, o placode óptico origina o cristalino, e o placode olfativo origina os epitélios nasais e olfativos (Duque-Osorio, 2003) (Figura 2.).

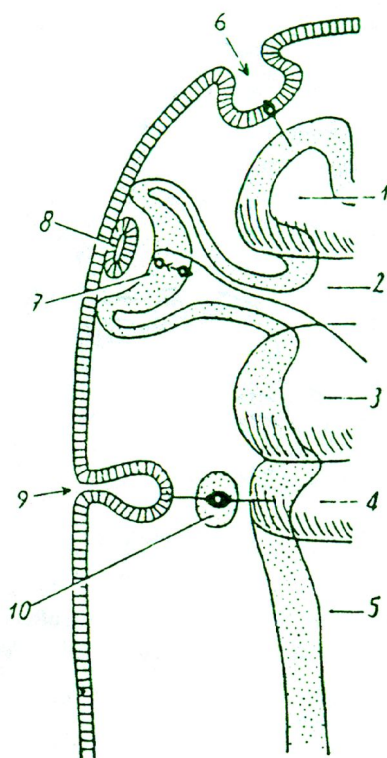


Figura 2. Relação entre os placodes sensitivos e o cérebro no embrião de vertebrados.

1. Telencéfalo; 2. Diencefalo; 3. Mesencéfalo; 4. Metencéfalo; 5. Mielencéfalo;
6. Placode olfatório; 7. Cálice óptico; 8. Placode óptico. 9. Placode auditivo;
10. Gânglio do *nervus octavus*. (Modificada de Kunz, 2004)

Organismos aquáticos e meio aquático

Os organismos aquáticos possuem sistemas sensoriais especializados que lhes permitem perceber informações do meio onde se encontram. A difusão de informações químicas, mecânicas, elétricas e visuais na água é essencialmente distinta da que acontece no ar. A água apresenta diferentes graus de refração e reflexão da luz solar, de acordo com a sua densidade, temperatura, salinidade etc. Da mesma forma, a dispersão de ondas sonoras e mecânicas varia de acordo com a densidade e concentração de partículas dissolvidas ou em suspensão na água (Pitcher 1993).

Os peixes possuem mecanismos sensoriais que lhes permitem distinguir sons do ruído gerado por águas turbulentas ou por outras fontes, tanto próximas quanto distantes, já que têm capacidade de detectar estímulos infra-sônicos (menos de 1 Hz). (Hawkins, 1993). Além disso, em algumas espécies, a comunicação sonora é importante, e em outras, tanto a vesícula natatória quando os ossículos de Weber são utilizados como amplificadores acústicos (Liem *et al.*, 2001). Hawkins (1993) apresenta uma excelente revisão sobre o papel do som no comportamento em peixes, e detalhes sobre a estrutura e desenvolvimento do ouvido interno em peixes podem ser encontrados nos trabalhos de Haddon & Lewis (1996), Whitfield *et al.* (2002) e Nicolson (2005).

O comportamento dos organismos aquáticos é fortemente influenciado pela sua capacidade quimiorreceptora, já que no meio aquático encontram-se diluídas uma infinidade de moléculas. O universo químico em águas abertas é *infinito*, e os peixes têm vários receptores especializados para explorar tal universo. Podem detectar aminoácidos em concentrações muito pequenas ($< 0,1 \text{ nmol l}^{-1}$) (Hara & Zielinsky, 1989), e essa capacidade modula comportamentos associados com alimentação, migrações reprodutivas, reconhecimento de casais, detecção da aproximação de presas ou predadores, entre outros. De acordo com Kotrschal (2000), os peixes possuem três sistemas quimiorreceptores: olfativo; gustativo (com dois subsistemas distintos: botões gustativos, e células quimiossensoriais isoladas); e o chamado sistema químico comum. A estrutura e o desenvolvimento dos sistemas associados à quimiorrecepção em peixes são apresentados em Hara & Zielinsky (1989), Hara (1993), Kotrschal (1996), Hansen *et al.*, (2002), Northcutt (2005) e Hansen & Zielinski (2005).

Nos peixes, o sistema olfativo participa em múltiplas tarefas como na detecção de alimento, identificação de co-específicos e / ou predadores, migrações reprodutivas e na seleção de habitat (Elston *et al.*, 1981; Blaxter, 1986; Hara, 1993); sendo, portanto, sensível a uma diversidade de moléculas tais como aminoácidos, ácidos e sais biliares, peptídeos, ácidos nucléicos e compostos esteróides (Kotrschal, 2000; Hansen *et al.*, 2003; Hansen & Zielinski 2005).

Os receptores celulares do epitélio olfativo de teleósteos podem ser classificados em três tipos: neurônios sensoriais ciliados, neurônios sensoriais com microvilosidades e

neurônios sensoriais crípticos (Belanger *et al.*, 2003; Hansen *et al.*, 2003; Hansen *et al.*, 2004; Hansen & Zielinski, 2005). Adicionalmente, outros tipos celulares podem ser identificados no epitélio olfativo, como as células de sustentação, células basais, “rodlet cells” (possivelmente organismos parasitas, *sensu* Hansen & Zielinski, 2005), e células ciliadas não-sensoriais (Hara, 1971; Noakes & Godin, 1988; Hara & Zielinski 1989; Matsuoka, 2001; Hansen & Zielinski, 2005).

Por sua parte, a visão tem um papel definitivo no comportamento de muitas espécies de peixes, pois lhes permite receber informações sobre objetos próximos da superfície e/ou dentro da água (Guthrie & Muntz, 1993). Assim, os indivíduos podem tomar decisões a respeito da detecção e discriminação de presas, presença ou aproximação de possíveis e/ou potenciais predadores, identificação de co-específicos, identificação de lugares de desova ou ninhos, territorialismo (Easter & Nicola, 1996). Kunz (2007) faz uma revisão sobre o desenvolvimento ocular em teleósteos. Outras informações sobre a estrutura e função do receptor ocular encontram-se em Guthrie & Muntz (1993), Easter & Nicola (1996), e Soules & Link (2005).

Talvez o sistema sensorial presente em organismos aquáticos que mais se afasta do observado em organismos terrestres é o chamado sistema da linha lateral (LL). Em peixes, assim como em formas iniciais de anfíbios (Duellman & Trueb, 1994), encontram-se uma série de estruturas especializadas na detecção de movimentos e variações de pressão da água circundante (Bleckmann, 1993). Tais estruturas são conhecidas como neuromastos, e podem se distribuir tanto na LL (aproximadamente na metade dorso-ventral do indivíduo, em cada um dos flancos) quanto em canais e linhas sensoriais assessoriais na cabeça (Liem *et al.*, 2001; Webb & Shirey, 2003; Ghysen & Dambly-Chaudière, 2007). A mecanorrecepção é definitiva para a sobrevivência de peixes em águas abertas, as quais nem sempre são claras. Bleckmann (1993) apresenta estudo específico sobre o sistema da LL em peixes, e várias de suas modificações e especializações. Outros detalhes sobre o desenvolvimento da LL e da estrutura deste sistema encontram-se em Webb & Shirey (2003).

Outros tipos de receptores sensoriais presentes em peixes, mas que não serão contemplados neste estudo, relacionam-se com sua capacidade de visão ultravioleta (Losey *et al.*, 1999), com a fotorrecepção extra-ocular (Mano *et al.*, 1999; Takashima &

Hibiya, 1995), com a termorrecepção (Murray, 1971), com a nocicepção (Sneddon, 2003; Rose, 2007), com a eletorrecepção (Bullock & Heiligenberg, 1986), e com a recepção de ondas magnéticas (Hanson & Westerberg, 1987).

O pequeno tamanho das estruturas associadas ao sistema sensorial ultrapassa o poder de resolução do olho humano. Assim, para a observação em detalhe dessas estruturas, é preciso a utilização de técnicas de estéreo-microscopia (EM), microscopia de luz (ML), e microscopia eletrônica, tanto de varredura (MEV) quanto de transmissão (MET). Entende-se por *resolução* ou *poder de resolução* de um instrumento de óptica a menor distância nitidamente distinguível entre dois pontos do material em exame. A resolução do olho humano é da ordem de 0,1 mm, a de um microscópio de luz, cerca de 200 nm (0,2 μ m), a de um microscópio eletrônico de varredura, cerca de 10-50 Å (1-5 nm), e a de um microscópio eletrônico de transmissão, cerca de 1-2 Å (0,1-0,2 nm) (Kitajima & Leite, 1999) **.

A EM permite observar e documentar detalhes do avanço do desenvolvimento, além de facilitar as tarefas de manipulação do material (e.g. remoção de embriões do córion, análises de material anestesiado ou fixado etc.) e permite a tomada de microfotografias, mas o poder de aumento da EM é baixo (entre 40x e 60x).

Da mesma forma, as técnicas histológicas permitem obter secções seriadas do material de estudo, as quais podem ser coradas, e posteriormente examinadas com o uso da ML. Assim, é possível detalhar a anatomia, topografia e estrutura interna do material. As imagens obtidas auxiliam o estudo das relações entre tecidos e órgãos, mas o poder de aumento na ML é limitado (cerca de 1.000X).

Por sua parte, a MEV proporciona uma excelente imagem superficial, caracterizada pela qualidade tridimensional, profundidade de campo, e imagens tipo “tela de televisão”. A topografia superficial do espécime é revelada com grande detalhe. Em muitos casos, a MEV é a ferramenta de primeira opção no estudo e descrição de estruturas delicadas da superfície de embriões e larvas em desenvolvimento (e.g.

** 1 mm = 1.000 μ m (micrômetro); 1 μ m = 1.000 nm (nanômetro); 1 nm = 10 Å (Ångstrom)

receptores do epitélio olfativo, botões gustativos, neuromastos) (Boehlert, 1984). Na MEV, as imagens são formadas pelos elétrons secundários desprendidos da superfície da amostra, previamente coberta por uma camada muito fina (100-200 Å) de ouro, ouro-paládio, ou paládio-platino, e bombardeada pelo feixe de elétrons emitidos pelo canhão do microscópio.

Apesar da importância que tem o estudo do desenvolvimento do SS, tanto na compreensão da biologia do desenvolvimento das espécies, quanto no estabelecimento de sistemas de produção, são poucos os trabalhos que abordam esta matéria em espécies Neotropicais. Bernal-Sánchez (2006) descreveu a influência do desenvolvimento da visão e do tamanho do alimento na larvicultura do dourado *Salminus brasiliensis* (Teleostei: Characidae). Cestarolli (2005) apresentou alguns aspectos do desenvolvimento dos receptores químicos, mecânicos e elétricos em *Pseudoplatystoma coruscans* (Teleostei: Siluriformes). Tesser & Portella (2006) estudaram o efeito da estimulação química e visual sobre a taxa de ingestão de ração em larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Teleostei: Characidae). Vicensotto (2003) estudou o efeito da estimulação química no apetite e crescimento em *Pseudoplatystoma coruscans* (Teleostei: Siluriformes). No entanto, vários destes estudos têm um enfoque causa-efeito, e não do tipo descritivo, necessário para a compreensão da ontogenia das estruturas associadas ao SS.

Talvez o grupo de peixes Neotropicais que tem despertado maior interesse neste campo é o formado por espécies do gênero *Astyanax* (*A. fasciatus*, *A. mexicanus*, *A. jordani*, *A. hubbsi*) (Teleostei: Characidae), pois apresentam populações que habitam tanto cavernas quanto habitat superficiais, exibindo diversos mecanismos na modulação da expressão do SS (Franz-Odegaard & Hall, 2006; Jeffery, 2001).

DO PACU *Piaractus mesopotamicus* *

O pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) (Teleostei: Characidae), é uma das espécies de maior relevância dentro do panorama piscícola de águas quentes no Brasil, não só pela qualidade e excelente sabor de sua carne, mas também pelo seu bom crescimento e desempenho em sistemas de cultivo, seu hábito alimentar onívoro, rápido crescimento, e fácil adaptação à alimentação artificial. A espécie ocorre em águas da Bacia do rio da Prata, e seu período reprodutivo abrange a temporada de cheias, quando realiza migrações reprodutivas, liberando seus gametas em águas abertas (Romagosa *et al.*, 1988). Araujo-Lima & Goulding (1997) e Leite & Araujo-Lima (2000) reportam como as larvas de espécies próximas, da subfamília Myleinae, viajam à deriva nos canais principais de rios, e posteriormente invadem as planícies de inundação, onde iniciam seu desenvolvimento e alimentação.

Apesar do avanço no estudo e compreensão da biologia e desenvolvimento inicial da espécie (Pinto & Castagnolli, 1984; Yamanaka, 1988; Ribeiro *et al.*, 1995; Nakatani *et al.*, 2001; Jomori *et al.* 2003; Tesser & Portella, 2003; Jomori *et al.* 2005; Tesser *et al.* 2005; Clavijo-Ayala *et al.*, 2006; Tesser *et al.* 2006; Jomori *et al.* 2008), são praticamente desconhecidos os aspectos relacionados com o desenvolvimento inicial das estruturas sensoriais.

OBJETIVO

De acordo com as anteriores considerações, o presente estudo tem por objetivo descrever o desenvolvimento inicial do sistema sensorial de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) (Characidae: Serrasalminae), apresentando detalhes dos aspectos estruturais e ultra-estruturais dos quimiorreceptores (epitélio olfativo, botões gustativos e células quimiossensoriais isoladas), dos mecanorreceptores (neuromastos livres e associados à linha lateral), do ouvido interno e dos elementos associados ao receptor visual.

* Esta espécie era classificada anteriormente como *Colossoma mitrei* (Berg 1895) (Machado-Allison, 1982)

REFERÊNCIAS

- Araujo-Lima, C.A.R.M. & Goulding, M. 1997. So Fruitful a Fish: Ecology, Conservation and Aquaculture of the Amazon's Tambaqui. Columbia University Press. New York. 184p.
- Balinsky, B.I. 1975. Introducción a la embriología. Ediciones Omega, S.A. Barcelona. p: 286-324.
- Balon, E.K. 1959. Die embryonale und larvale Entwicklung der Donauzope (*Abramis ballerus* subsp.). *Biologické práce (Bratislava)* 5:1-87.
- Balon, E.K. 1975. Reproductive guilds of fishes: A proposal and definition. *Journal of the fisheries research board of Canada* 32 (6): 821-864.
- Balon, E.K. 1984 a. Patterns in the evolution of Reproductive Styles in Fishes. *Pages* 35-53 *in*: Potts, G.W. & Wootton, R.J. (eds) *Fish Reproduction: Strategies and Tactics*. Academic Press, Inc. London.
- Balon, E.K. 1984 b. Reflections on Some Decisive Events in the Early Life of Fishes. *Transactions of American Fisheries Society* 113 (2): 178-185.
- Balon, E.K. 1990. Epigenesis of an epigeneticist: the development of some alternative concepts on the early ontogeny and evolution of fishes. *Guelph Ichthyology Reviews* 1: 1-48.
- Belanger, R. M., Smith, C. M., Corkum, L. D., Zielinsky. 2003. Morphology and Histochemistry of the Peripheral Olfactory Organ in the Round Goby, *Neogobius melanostomus* (Teleostei: Gobiidae). *Journal of Morphology* 257: 62-71.
- Bernal-Sánchez, G.L. 2006. A influência do desenvolvimento da visão e do tamanho do alimento na larvicultura do dourado *Salminus brasiliensis* (PISCES, CHARACIDAE). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina. 55p.

- Blaxter, J.H.S. 1986. Development of Sense Organs and Behaviour of Teleost Larvae with Special Reference to Feeding and Predator Avoidance. *Transactions of American Fisheries Society* 115: 98-114.
- Bleckmann, H. 1993. Role of the lateral line in fish behaviour. *Pages* 201-246 *in*: Pitcher, T.J. (ed) Behaviour of Teleost Fishes. 2^a edi. Chapman & Hall. London.
- Boehlert, G.W. 1984. Scanning Electron Microscopy. *Pages* 43-48 *in*: Moser, H.G., Richards, W.J., Cohen, D.M., Fahay, M.P., Kendall, A.W.Jr., Richardson, S.L. (eds) Ontogeny and systematics of fishes. *American Society of Ichthyologists and Herpetologists*. Special Publication Number 1. Allen Press, Lawrence, Kansas.
- Bullock T.H. & Heiligenberg W. (eds). 1986. Electoreception. Wiley-Interscience. London. 722p.
- Cestarolli, M.A. 2005. Larvicultura do pintado *Pseudoplatystoma coruscans* (Agassiz,1829): Aspectos da alimentação inicial e do desenvolvimento de estruturas sensoriais. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura CAUNESP. 110p.
- Clavijo-Ayala, J.A. & Arias, J.A.C. 2003. Apuntes acerca de la embriología en peces reofilicos. En: Memorias IX Jornada de Acuicultura IALL / Universidad de los Llanos: 39-48
- Clavijo-Ayala, J.A., Vetorelli, M.P., Portella, M.C. 2006. Desenvolvimento inicial e caracteres de identificação de larvas vitelinas de Pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). CIVA 2006: 819-828. (<http://www.civa2006.org>).
- Czerkies, P., Brzuzan, P., Kordalski, K., Luczynski, M. 2001. Critical partial pressures of oxygen causing precocious hatching in *Coregonus lavaretus* and *C. albula* embryos. *Aquaculture* 196: 151-158.
- Duellman, W.E. & Trueb, L. 1994. Biology of Amphibians. The Johns Hopkins University Press, Baltimore. 367-414 p.

- Duque-Osorio, J.F. 2003. Crestas neurales, placodas y arcos branquiales: Una revisión evolutiva y embriológica de datos básicos y recientes. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias* 27(103): 291-307.
- Easter, S.S.Jr. & Nicola, G.N. 1996. The Development of Vision in the Zebrafish (*Danio rerio*). *Developmental Biology* 180: 646-663.
- Elston, R., Corazza, L., Nickum, J.G. 1981. Morphology and Development of the Olfactory Organ in Larval Walleye, *Stizostedion vitreum*. *Copeia* 4:890-893.
- Franz-Odendall, T.A. & Hall, B.K. 2006. Modularity and sense organs in the blind cavefish, *Astyanax mexicanus*. *Evolution & Development* 8 (1): 94-100.
- Fregadolli, C.H. 2003. Laboratory analysis of predation by cyclopoid copepods on first-feeding larvae culture of Brazilian fishes. *Aquaculture* 228: 123-140.
- Ghysen, A. & Dambly-Chaudière, C. 2007. The lateral line microcosmos. *Genes & Development* 21: 2118-2130.
- Guthrie, D.M. & Muntz, W.R.A. 1993. Role of vision in fish behaviour. *Pages* 89-128 in: Pitcher, T.J. (ed) Behaviour of Teleost Fishes. 2^a edi. Chapman & Hall. London.
- Haddon, C. & Lewis, J. 1996. Early Ear Development in the Embryo of the Zebrafish, *Danio rerio*. *The Journal of Comparative Neurology* 365: 113-128.
- Hansen, A. & Zielinski, B.S. 2005. Diversity in the olfactory epithelium of bony fishes: Development, lamellar arrangement, sensory neuron cell types and transduction components. *Journal of Neurocytology* 34: 183-208.
- Hansen, A., Reutter, K., Zeiske, E. 2002. Taste Bud Development in the Zebrafish, *Danio rerio*. *Developmental Dynamics* 223: 483-496.
- Hansen, A., Rolen, S. H., Anderson, K., Morita, Y., Caprio, John., Finger, T. E. 2003. Correlation between Olfactory Receptor Cell Type and Function in the Channel Catfish. *The Journal of Neuroscience* 23(28): 9328-9339.

- Hansen, A., Anderson, K. T., Finger, T. E. 2004. Differential distribution of olfactory receptor neurons in Goldfish: Structural and Molecular Correlates. *The Journal of Comparative Neurology* 477: 347-359.
- Hanson, M. & Westerberg, H. 1987. Occurrence of magnetic material in teleosts. *Comparative Biochemistry and Physiology* 86A: 169-172.
- Hara, T. 1917. Chemoreception. *Pages* 79-120 *in*: Hoar, W.S. & Randall, D.J. (eds) *Fish physiology* Vol V. Academic Press, Inc. London.
- Hara, T.J. 1993. Role of olfaction in fish behaviour. *Pages* 171-199 *in*: Pitcher, T.J. (ed) *Behaviour of Teleost Fishes*. 2^a edi. Chapman & Hall. London.
- Hara, T.J. & Zielinsky, B. 1989. Structural and Functional Development of the Olfactory Organ in Teleosts. *Transactions of the American Fisheries Society* 118: 183-194.
- Hawkins, A.D. 1993. Underwater sound and fish behaviour. *Pages* 129-169 *in*: Pitcher, T.J. (ed) *Behaviour of Teleost Fishes*. 2^a edi. Chapman & Hall. London.
- Iwai, T. 1980. Sensory anatomy and feeding of fish larvae. *Pages* 124-145 *in*: J.E. Bardach *et al*, (eds) *Fish behaviour and its use in the capture and culture of fishes*. *International Center for Living Aquatic Resources Management*, Manila.
- Jeffery, W.R. 2001. Cavefish as a model system in evolutionary developmental biology. *Developmental Biology* 231: 1-12.
- Jomori, R.K., Carneiro, D.J., Malheiros, E.B., Portella, M.C. 2003. Growth and survival of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) juveniles reared in ponds or at different initial larviculture periods indoors. *Aquaculture* 221: 277-287.
- Jomori, R.K., Carneiro, D.J., Martins, M.I.E.G., Portella, M.C. 2005. Economic evaluation of *Piaractus mesopotamicus* juvenile production in different rearing systems. *Aquaculture* 243: 175-183.

- Jomori, R.K., Ducatti, C., Carneiro, D.J., Portella, M.C. 2008. Stable carbon (d13C) and nitrogen (d15N) isotopes as natural indicators of live and dry food in *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) larval tissue. *Aquaculture Research* 39: 370-381.
- Kendall, A.W.Jr, Ahlstrom, E.H., Moser, H.G. 1984. Early Life History Stages of Fishes and Their Characters. *Pages* 11-22 *in*: Moser, H.G., Richards, W.J., Cohen, D.M., Fahay, M.P., Kendall, A.W.Jr., Richardson, S.L. (editors) *Ontogeny and systematics of fishes. American Society of Ichthyologists and Herpetologists*. Special Publication Number 1. Allen Press, Inc. Lawrence.
- Kitajima, E.W. & Leite, B. 1999. Curso introdutório de Microscopia Eletrônica de Varredura. NAP/MEPA. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. 46p.
- Kotrschal, K. 1996. Solitary chemosensory cells: why do primary aquatic vertebrates need another taste system? *Trends Ecology Evolut* 11: 110-114.
- Kotrschal, K. 2000. Taste(s) and olfaction(s) in fish: a review of spezialized sub-systems and central integration. *European Journal of Physiology* 439 (Suppl): R178-R180.
- Kunz, Y.W. 2004. *Developmental Biology of Teleost Fishes*. Springer. Dordrecht. 636p.
- Kunz, Y.W. 2007. Review of Development and Aging in the Eye of Teleost fish. *Neuroembryology and Aging* 4: 31-60.
- Leite, R.G. & Araujo-Lima, C.A.R.M. 2000. A Dieta das Larvas de *Mylosossoma aureum* e *Mylosossoma duriventre* na Amazônia Central. *Acta Amazônica* 30 (1): 129-147.
- Liem, K.F., Bemis, W.E., Walker, Jr. W.F., Grande, L. 2001. *Functional Anamoty of the Vertebrates. An Evolutionary Perspective*. 3 edi. Thomson. Belmont .703p.
- Losey, G.S., Cronin, T.W., Goldsmith, T.H., Hyde, D., Meshall, N.J., McFarland, W.N. 1999. The UV visual world of fishes: a review. *Journal of Fish Biology* 54: 921-943.

- Machado-Allison, A. 1982. Estudios sobre la subfamilia Serrasalminidae (Teleostei, Characidae). Parte 1. Estudio comparado de los juveniles de las cachamas de Venezuela (Géneros *Colossoma* e *Piaractus*). *Acta Biológica Venezuelica*, 11 (3): 1-101.
- Machado-Allison, A. 1987. Los peces de los llanos de Venezuela. Un ensayo sobre su Historia Natural. Editora de la Universidad Central de Venezuela. Caracas. 141p.
- Machado-Allison, A. 1990. Ecología de los peces de las áreas inundables de los Llanos de Venezuela. *Interciencia* 15(6): 411-423.
- Mago-Leccia, F. 1970. Estudios preliminares sobre la ecología de los peces de los Llanos de Venezuela. *Acta Biológica Venezuelica* 7(1): 71-102.
- Mano, H., Kojima, D., Fukada, Y. 1999. Exo-rhodopsin: a novel rodopsin expressed in the zebrafish pineal gland. *Molecular Brain Research* 73: 110-118.
- Matsuoka, M. 2001. Development of the sense organs in the Japanese sardine *Sardinops melanostictus*. *Fisheries science* 67: 1036-1045.
- Murray, R.W. 1971. Temperature receptors. *Pages* 121-133 *in*: Hoar, W.S. & Randall, D.J. (eds) *Fish Physiology* Vol V. Academic Press, Inc. San Diego.
- Nakatani, K., Agostinho, A.A., Baumgartner, G., Bialecki, A., Sanches, P.V., Makrakis, M.C. 2001. Ovos e larvas de peixes de água doce. Desenvolvimento e manual de identificação. Editora da Universidade Estadual de Maringá. Maringa 365p.
- Nicolson, T. 2005. The genetics of hearing and balance in Zebrafish. *Annual Review of Genetics* 39: 9-22.
- Noakes, D.L.G. & Godin, J.J. 1988. Ontogeny of behaviour and concurrent developmental changes in sensory systems in teleost fishes. *Pages* 345-394 *in*: Hoar, W.S. & Randall, D.J. (eds) *Fish physiology* Vol XI B. Academic Press, Inc. London.

- Northcutt, G. 2005. Taste Bud Development in the Channel Catfish. *The Journal of Comparative Neurology* 482: 1-16.
- Osse, J.W.M., van den Boogaart, J.G.M., van Snik, G.M.J., van der Sluys, L. 1997. Priorities during early growth of fish larvae. *Aquaculture* 155: 249-258.
- Pinto, M.M.G. & Castagnolli, N. 1984. Desenvolvimento inicial do pacu *Colossoma mitrei* (BERG, 1895). *Páginas 523-535 em: Anais III Simposio Brasileiro de Aqüicultura*. São Carlos –SP.
- Pitcher, T.J. (ed). 1993. Behaviour of Teleost Fishes. 2^a edi. Chapman & Hall. London. 480p.
- Ribeiro, C.R., Leme dos Santos, H.S., Bolzan, A.A. 1995. Estudo comparativo da embriogênese de peixes ósseos (Pacu, *Piaractus mesopotamicus*; Tambaqui, *Colossoma macropomum*, e híbrido Tambacu). *Revista Brasileira de Biologia* 55(Supl. 1): 65-78.
- Romagosa, E., Paiva, P.de., Godinho, H.M., Storfer, E.B. 1988. Desenvolvimento dos ovócitos de *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg,1887) (= *Colossoma mitrei* Berg,1895) em condições de cultivo intensivo. *Ciência e Cultura* 40 (1): 60-64.
- Rose, J.D. 2007. Anthropomorphism and “mental welfare” of fishes. *Diseases of Aquatic Organism* 75: 139-154.
- Sneddon, L.U. 2003. The evidence for pain in fish: the use of morphine as an analgesic. *Appl Anim Behav Sci* 83: 153–162.
- Soules, K.A. & Link, B.A. 2005. Morphogenesis of the anterior segment in the zebrafish eye. *BMC Developmental Biology* 5 (12): 1-16.
- Takashima, F. & Hibiya, T. 1995. An Atlas of Fish Histology. Normal and Pathological Features. Kondansha Ltd. 2^a. edi. p: 164-166.
- Tesser, M.B. & Portella, M.C. 2003. Degradation analysis of microencapsulated diet in pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holberg 1887) larvae intestine through scanning electron microscopy. *Acta Scientiarum Animal Scienses* 25 (1): 49-52.

- Tesser, M.B. & Portella, M.C. 2006. Ingestão de ração e comportamento de larvas de pacu em resposta a estímulos químicos e visuais. *Revista Brasileira de Zootecnia* 35 (5): 1887-1892.
- Tesser, M.B., Carneiro, D.J., Portella, M.C. 2005. Co-Feeding of pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (1887), Larvae with *Artemia* nauplii and Microencapsulated Diet. *Journal of Applied Aquaculture* 17 (2): 47-59.
- Tesser, M.B., Flores-Quintana, C.I., Carneiro, D.J., Pizauro Junior, J.M., Portella, M.C. 2006. Suplementação de enzimas exógenas em dieta microparticulada para larvicultura de pacu. *Revista Brasileira de Zootecnia* 35 (6):2211-2218.
- Vazzoler, A.E.A de M. 1996. Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática. Editora da Universidade Estadual de Maringá. Maringá-PR. 169p.
- Vicensotto, M.Jr. 2003. Estimulação química do apetite e crescimento no pintado. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura CAUNESP. 31p.
- Whitfield, T.T., Riley, B.B., Chiang, M.Y., Phillips, B. 2002. Development of the zebrafish inner ear. *Developmental Dynamics* 223: 427–458.
- Webb. J.F. & Shirey, J.E. 2003. Postembryonic Development of the Cranial Lateral Line Canals and Neuromasts in Zebrafish. *Developmental Dynamics* 228: 370-385.
- Yamanaka, N. 1988. Descrição, desenvolvimento e alimentação de larvas de pré-juvenis do pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) (Teleostei, Characidae), mantidos em confinamento. (Tese de Doutorado –Inst. Bioc. USP). 125p.
- Youson. J.H. 1988. Firs Metamorphosis. *Pages* 135-196 *in*: Hoar, W.S. & Randall, D.J. (eds) *Fish physiology* Vol XI B. Academic Press, Inc. London.
- Zaniboni-Filho, E. & Weingartner, M. 2007. Técnicas de indução dareprodução de peixes migradores. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 31 (3):366-373.

CAPITULO II

ONTOGENIA DO SISTEMA SENSORIAL DE PACU *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887) (CHARACIDAE: SERRASALMIDAE)

RESUMO O pacu *Piaractus mesopotamicus* é uma das espécies de maior relevância na piscicultura de águas quentes no Brasil, destacando-se pela qualidade de sua carne e desempenho em sistemas de cultivo. Apesar do avanço no estudo da biologia, anatomia e morfologia da espécie, os aspectos relacionados com o desenvolvimento inicial do sistema sensorial são praticamente desconhecidos. Este estudo teve por objetivo descrever o desenvolvimento inicial de pacu *Piaractus mesopotamicus*, com ênfase na ontogenia das estruturas sensoriais. Para isto, amostras seriadas de embriões e larvas em desenvolvimento foram coletadas desde as 9 horas pós fertilização (hpf) até os 25 dias pós eclosão (dpe), e destinadas para análises morfológicas, histológicas e de microscopia eletrônica de varredura. O desenvolvimento embrionário da espécie é rápido, e cerca das 19 hpf (a $26,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$), as larvas eclodem num estado altricial ($3,19 \pm 0,04$ mm comprimento notocordal - CN; $0,477 \pm 0,061$ mm³ volume do saco vitelino - VSV). Na eclosão, o desenvolvimento do sistema sensorial é limitado: no epitélio olfatório observam-se neurônios sensoriais ciliados e neurônios sensoriais com microvilosidades; a presença de mecanorreceptores é restrita ao neuromasto ótico imaturo; o desenvolvimento do ouvido interno é incipiente, observa-se a presença de dois otólitos em cada cápsula ótica, mas a larva ainda não apresenta estabilidade na coluna de água nem coordenação nos seus movimentos; e os olhos apresentam-se com pouco ou nenhum pigmento, lente diferenciada e separada da córnea, e retina não estratificada. No entanto, o desenvolvimento pós-embrionário do sistema sensorial é acelerado: a partir de 1 dpe o epitélio olfativo se encontra coberto por uma densa camada de cílios não sensoriais que se distribuem tanto na vesícula olfatória quanto na região epitelial próxima; aos 2,5-3 dpe, os olhos apresentam-se totalmente pigmentados; aos 4 dpe, é possível identificar células quimiossensoriais isoladas na região pós-ótica; o sistema da linha lateral se apresenta claramente definido com a linha lateral principal, linha lateral secundária e linhas de neuromastos livres na região cranial; e as larvas exibem estabilidade horizontal na coluna de água, assim como habilidades natatórias

desenvolvidas, e é possível identificar as máculas e cristas no ouvido interno; aos 10 dpe já se observa a retina estratificada e a presença do nervo óptico; e observa-se a presença de botões gustativos tanto na superfície interna do lábio inferior quanto na cavidade oral. O pacu “alinha” o desenvolvimento das estruturas sensoriais, craniais e locomotoras e, no momento de esgotar suas reservas vitelinas (4-5 dpe), se converte em um organismo com capacidade de perceber, identificar, perseguir e capturar presas, o que possibilita seu crescimento e, ao mesmo tempo, perceber, identificar e fugir de potenciais predadores e/ou situações de desconforto, o que permite a sua sobrevivência. No momento em que esgota suas reservas vitelinas, o pacu inicia uma nova forma de interação organismo-ambiente, convertendo se num organismo exclusivamente exotrófico. O rápido desenvolvimento das estruturas sensoriais na espécie possibilita esse tipo de interação.

Palavras-chave: Pacu; *Piaractus mesopotamicus*, Quimiorrecepção; Mecanorrecepção; Ouvido interno; Fotorrecepção.

ONTOGENY OF THE SENSORIAL SYSTEM IN PACU *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887) (CHARACIDAE: SERRASALMIDAE)

ABSTRACT Pacu, *Piaractus mesopotamicus*, is one of the species of major importance for warmwater fish farming in Brazil due to its meat quality and performance in culture systems. Despite the advances in the study of biology, anatomy and morphology of the species, the aspects related to the early development of the sensorial system are unknown. The aim of this study was to describe the initial development of pacu *Piaractus mesopotamicus*, with emphasis on the ontogeny of the sensorial structures. Embryos and larvae were serially sampled during development, from the 9 hours after fertilization (haf) to the 25 days after hatching (dah), and subjected to the morphology, histology and scanning electron microscopy analysis. The embryonic development of the species is fast: about 19 haf (at $26,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$), larvae hatch in an altricial state (3.19 ± 0.04 mm notochordal length - NL; 0.477 ± 0.061 mm³ yolk-sac volume - YSV). At hatching, the sensorial system development is limited: in the olfactory epithelium, there are ciliated sensorial neurons and microvillous sensorial neurons; the mechanoreceptors are restricted to the immature otic neuromast; the development of the inner ear is incipient, with two otoliths in each otic capsule, but larvae do not show neither stability in the water column or coordination of their movements; the eyes have no or few pigment, with lens differentiated and separated from the cornea, and non-stratified retina. However, the post-embryonic development of the sensorial system is accelerated: from the 1st dah the olfactory epithelium is covered by a dense layer of non sensorial cilia, which are distributed in the olfactory vesicle and in the epithelium region around it; at 2,5-3 dah, the eyes are totally pigmented; from the 4th dah it is possible to identify solitary chemosensorial cells in the post-otical region; the lateral line system is clearly defined with the main lateral line, secondary lateral line and lines of free neuromasts in the cranial region; and the larvae exhibit horizontal stability in the water column and swimming abilities developed, it is also possible to verify maculas and cristas in the inner ear; at 10 dph, it is already observed the stratified retina and the presence of the optical nerve, and taste buds are observed in the inner surface of the inferior lip and in the oral cavity. Pacu “alines” the development of the

sensorial, cranial and locomotion structures and, at exhausting its yolk stock (4-5 dah), becomes an organism capable of sensing, identify, chase and capture preys, which makes it possible for it to grow. Moreover, it is able to sense, identify, and run away from potential predators and/or uncomfortable situations, ensuring its survival. As soon as pacu has no yolk stock, it begins a new kind of interaction organism-environment, becoming an exclusive exotrophic organism. The rapid development of the sensorial structures in this species enables this interaction.

Key words: Pacu, *Piaractus mesopotamicus*, Chemoreception; Mechanoreception; Inner ear; Photoreception.

ONTOGENIA DEL SISTEMA SENSORIAL DE PACU *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887) (CHARACIDAE: SERRASALMIDAE)

RESUMEN El pacu *Piaractus mesopotamicus* es una de las especies de mayor relevancia dentro de la piscicultura de aguas cálidas en Brasil, destacándose por la cualidad de su carne y desempeño en sistemas de cultivo. A pesar del avance en el estudio de la biología, anatomía y morfología de la especie, son prácticamente desconocidos los aspectos relacionados con el desarrollo inicial del sistema sensorial. Este estudio tubo por objetivo describir el desarrollo inicial de pacu *Piaractus mesopotamicus* haciendo énfasis en la ontogenia de las estructuras sensoriales. Para esto, muestras seriadas de embriones y larvas en desarrollo fueron colectadas desde las 9 horas pos fertilización (hpf) hasta los 25 días pos eclosión (dpe), y destinadas para análisis morfológicos, histológicos y de microscopia electrónica de barrido. El desarrollo embrionario de la especie es rápido, y cerca de las 19 hpf (a $26,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) las larvas eclosionan en un estado altricial ($3,19 \pm 0,04$ mm longitud notocordal - LN; $0,477 \pm 0,061$ mm³ volumen del saco vitelino - VSV). Al momento de la eclosión el desarrollo del sistema sensorial es limitado: en el epitelio olfativo se observan neuronas sensoriales ciliadas y neuronas sensoriales con micro vellosidades; la presencia de mecanoreceptores esta restringida al neuromasto ótico inmaduro; el desarrollo del oído interno es incipiente, se observa la presencia de dos otolitos en cada cápsula ótica, pero la larva no presenta estabilidad en la columna de agua ni coordinación en sus movimientos; y los ojos se presentan con poco o ningún pigmento, lente diferenciada y separada de la córnea, y retina no estratificada. Sin embargo, el desarrollo pos embrionario del sistema sensorial es rápido: a partir de 1 dpe el epitelio olfativo se encuentra cubierto por una densa capa de cilios no sensoriales que se distribuyen en la vesícula olfativa como en la región epitelial próxima a ella; a los 2,5-3 dpe, los ojos se observan totalmente pigmentados; a los 4 dpe, es posible identificar células quimio sensoriales aisladas en la región pos ótica; el sistema de la línea lateral se encuentra claramente definido con la línea lateral principal, línea lateral secundaria y líneas de neuromastos libres en la región craneal; las larvas exhiben estabilidad horizontal en la columna de agua, así como habilidades natatorias, y es posible identificar máculas y

cristas en el oído interno; a los 10 dpe ya se observa la retina estratificada y la presencia del nervio óptico; y se observa la presencia de botones gustativos en la superficie interna del labio inferior así como en la cavidad oral. El pacu “alinea” el desarrollo de las estructuras sensoriales, craneales y locomotoras, y al momento de agotar sus reservas vitelinas (4-5 dpe), se convierte en un organismo con capacidad de percibir, identificar, perseguir e capturar presas, lo que posibilita su crecimiento y, al mismo tiempo, percibir, identificar y huir de potenciales predadores y/o situaciones de inconfortables, lo que permite su supervivencia. Al momento de agotar sus reservas vitelinas, el pacu inicia una nueva forma de interacción organismo-ambiente, convirtiéndose en un organismo exclusivamente exotrófico. El rápido desarrollo de las estructuras sensoriales en la especie posibilita ese tipo de interacción.

Palabras-clave: Pacu; *Piaractus mesopotamicus*; Químico recepción; Mecánico recepción; Oído interno; Foto recepción

Introdução

O rápido desenvolvimento do sistema nervoso e das estruturas associadas ao sistema sensorial é fundamental para a sobrevivência de larvas de peixes (Blaxter, 1986; Noakes & Godin, 1988). O sistema nervoso controla a atividade de todos os outros sistemas orgânicos. O sistema sensorial participa na recepção e tradução dos estímulos ambientais ao sistema nervoso central. As informações sensoriais são percebidas pelo sistema nervoso periférico e conduzidas pelos nervos aferentes ao sistema nervoso central, onde são geradas respostas adequadas aos estímulos, modulando o comportamento (Pitcher, 1993). Como a transmissão de ondas mecânicas e sonoras e de estímulos visuais e químicos na água é essencialmente distinta da que acontece no ambiente terrestre, a evolução do sistema sensorial levou ao desenvolvimento e especialização das estruturas sensíveis a tais informações em peixes e outros organismos aquáticos (Liem *et al.*, 2001).

O pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) (Characidae: Serrasalminidae), é uma das espécies de maior relevância dentro do panorama piscícola de águas quentes no Brasil, não só pela qualidade e excelente sabor de sua carne, mas também pelo seu bom crescimento e desempenho em sistemas de cultivo, seu hábito alimentar onívoro, rápido crescimento, e fácil adaptação à alimentação artificial. Assim como outras espécies Characiformes de grande porte, faz migrações reprodutivas no início da temporada de cheias e libera seus gametas em águas abertas (Romagosa *et al.*, 1988), o que facilita a dispersão de suas formas iniciais em áreas recentemente inundadas. Esses locais são ricos em alimento, com grandes quantidades de fito e zooplâncton, e grande quantidade de material vegetal submerso e em suspensão, os quais proporcionam áreas de descanso, mas que também podem albergar possíveis ou potenciais predadores (Mago-Leccia, 1970; Machado-Allison, 1990).

De acordo com os critérios estabelecidos por Balon (1984), o pacu apresenta desenvolvimento indireto. No momento da eclosão as larvas exibem características altriciais e um sistema sensorial pouco desenvolvido. O rápido desenvolvimento de habilidades sensoriais que permitam receber informações a respeito da alimentação,

refúgio, formação de cardumes e retorno aos canais principais dos rios é fundamental para a sobrevivência das larvas e, como consequência, para a continuidade da espécie.

Apesar dos avanços no estudo e compreensão do desenvolvimento inicial do pacu (Pinto & Castagnolli, 1984; Yamanaka, 1988; Ribeiro *et al.*, 1995; Nakatani *et al.*, 2001; Clavijo-Ayala *et al.*, 2006), são praticamente desconhecidos os aspectos relacionados ao desenvolvimento inicial das estruturas sensoriais da espécie.

Assim, o presente estudo tem por objetivo descrever o desenvolvimento inicial do sistema sensorial de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) (Characidae: Serrasalminae), apresentando detalhes dos aspectos morfológicos, estruturais e ultra-estruturais dos quimiorreceptores (epitélio olfativo, botões gustativos e células quimiossensoriais isoladas), mecanorreceptores (neuromastos livres e associados à linha lateral), ouvido interno e elementos associados ao receptor visual.

As informações derivadas deste estudo poderão contribuir para o avanço do conhecimento da biologia do desenvolvimento do pacu e apresentarão novos caracteres úteis na identificação de exemplares obtidos em ambientes naturais. Além disso, essa investigação poderá fornecer explicações sobre alguns dos comportamentos observados em embriões e larvas, e auxiliar nas tarefas de incubação e larvicultura, por meio de apresentação de claras informações sobre as capacidades sensoriais da espécie durante seus estádios iniciais de desenvolvimento.

Material e métodos

Material de estudo

O material de estudo foram embriões e larvas de pacu obtidos mediante indução hormonal à reprodução de exemplares adultos mantidos em viveiros escavados no Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista (Jaboticabal, SP). Os embriões e larvas em desenvolvimento foram incubados e mantidos em condições controladas de laboratório, alimentados com náuplios de *Artemia*. Em todos os casos, os animais foram

anestesiados ($0,025 \text{ g.L}^{-1}$ de benzocaína) previamente a sua observação, manipulação ou fixação.

A coleta foi realizada na temporada de chuvas, nos meses de novembro a fevereiro, dos anos 2005-2006, 2006-2007, e 2007-2008. Para as análises morfológicas, merísticas, e morfométricas, o número amostral foi maior ou igual a 50 ($n \geq 50$), e para as análises histológicas e de microscopia eletrônica de varredura (MEV) o número amostral foi maior ou igual a 20 ($n \geq 20$).

Terminologia

Neste estudo, o termo “embrião” refere-se aos estágios de desenvolvimento dentro do córion, após a diferenciação do eixo crânio-caudal do embrião, após o fechamento do blastóporo, até o instante anterior à eclosão. O termo “larva” refere-se aos estágios de desenvolvimento após a eclosão até a transformação em juvenil (Kendall *et al.*, 1984).

O tempo de desenvolvimento é descrito em horas pós fertilização (hpf), e dias pós eclosão (dpe), para embriões e larvas, respectivamente. Assim, o material de estudo compreendeu formas embrionárias e larvais da espécie, desde 9 hpf até 25 dpe.

A terminologia utilizada na descrição das estruturas sensoriais segue, principalmente, as propostas por Hara (1993) e Hansen & Zielinski (2005) para o receptor olfativo; por Hawkins (1993), Haddon & Lewis (1996) e Whitfield *et al.*, (2002) para o ouvido interno; por Kunz (2007), Easter & Nicola (1996) e Soules & Link (2005) para o receptor ocular; por Hansen *et al.*, (2002) e Northcutt (2005) para botões gustativos; e por Bleckmann (1993) e Webb & Shirey (2003) para os mecanorreceptores.

Estereomicroscopia

Utilizou-se um estereomicroscópio Olympus® SZ2-ILST do Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos (Caunesp) e estereomicroscópio Leica® MZ60 do Setor de Carcinicultura (Caunesp) para a remoção do córion e para as medições de

comprimento notocordal e comprimento e altura do saco vitelino, além de observações sob pequeno aumento.

Microscopia de luz

Para análise histológica, amostras selecionadas foram fixadas em soluções de formaldeído a 4 e 10% em tampão fosfato (6,5 g fosfato de sódio bibásico anidro + 4 g fosfato de sódio monobásico anidro, por litro de solução), e em solução de Karnovsky modificada (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05 M, pH 7,2, CaCl_2 0,001 M). O material assim fixado foi mantido sob refrigeração até seu processamento histológico. Para isso, foi desidratado em série alcoólica, incluído em parafina e/ou historesina (Leica[®]), e posteriormente seccionado entre 3 e 7 μm . Finalmente, as secções histológicas foram coradas com hematoxilina-eosina (H-E) ou azul de toluidina (AT) a 1% (50 mL de água Milli-Q + 0,5 g de borato de sódio + 0,5 g azul de toluidina) e montadas com bálsamo de Canadá.

Outras amostras foram desidratadas em série de acetona sendo incluídas em resina EMBED 812 (Electron Microscopy Sciences[®]). A polimerização da resina foi completada em forno a 60 °C por 48 h. O material incluído foi seccionado com navalhas de vidro entre 150 e 450 nm, em equipamento Ultracut UCT (Leica[®]). As secções histológicas foram posteriormente coradas com AT a 1% e montadas com Entellan (Merck[®]).

Os preparados histológicos foram selecionados, observados e fotografados em microscópio óptico Olympus[®] BX51 e Olympus[®] CKX41 do Setor de Carcinicultura (Caunesp). As imagens foram capturadas com câmera digital Evolution MPCOLOR (Media Cybernetics[®]), no programa QCapture Pro 5.1.1.14 (Media Cybernetics[®]), e posteriormente foram analisadas e editadas utilizando o software Adobe Photoshop CS (Adobe Systems[®]).

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para as análises de MEV, embriões removidos do córion e larvas foram fixadas em solução de Karnovsky modificada. O material fixado foi mantido sob refrigeração até seu processamento. Para isso, as amostras foram desidratadas em série de acetona (30%, 50%, 70%, 90%, e três séries em acetona 100%; 20 minutos cada). À continuação, os espécimes foram processados em secador de ponto crítico EMS 850 (Electron Microscopy Sciences[®]), montados sobre suportes de bronze com fita adesiva de carbono e recobertos com uma fina camada de ouro (cerca de 35 nm), em equipamento metalizador Denton Vacuum Desk II.

O material foi examinado em microscópio eletrônico de varredura DSM 940 A (Zeiss[®]), no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Agricultura (NAP/MEPA) (Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, Piracicaba, SP); e em microscópio eletrônico de varredura JSM-5410 (Jeol[®]), no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal, SP.

As elétron-micrografias obtidas foram digitalizadas, e posteriormente analisadas e editadas utilizando o software Adobe Photoshop CS e Adobe Photoshop Elements 6.0 (Adobe Systems[®]).

Resultados

As observações do desenvolvimento inicial do pacu são apresentadas em duas etapas. Na primeira, as observações correspondem à fase embrionária, que compreende desde o início da organogênese embrionária até a eclosão. No segundo, ou período larval, as observações correspondem aos estádios larval inicial, nomeado de estágio larval vitelino; e ao estágio de larvas em pré-flexão.

Período Embrionário

A Figura 1 ilustra o padrão típico de desenvolvimento embrionário do pacu, a partir do momento do fechamento do blastoporo; a Tabela 1 resume as observações feitas durante este período.

No pacu, assim como em espécies próximas da subfamília Myleinae (Teleostei: Characidae), o córion é transparente, sem filamentos ou camadas gelatinosas na superfície, o que facilita a observação da evolução dos eventos ontogênicos e o acompanhamento cronológico do aparecimento dos placodes sensoriais.

Às 7 hpf, observa-se uma gástrula avançada, quando o anel germinativo se estende sobre a maior parte da superfície do vitelo. A organogênese inicia logo após o fechamento do blastóporo, com a diferenciação do eixo crânio-caudal do embrião, e continua com a diferenciação dos placodes sensoriais, liberação da cauda do vitelo, e início dos batimentos cardíacos. Às 18 hpf se observa o princípio da circulação periférica de sangue não pigmentado, e fortes contrações caudais, assim como o deterioramento avançado do córion.

Às 19 hpf se observa o início da eclosão larval. Neste momento as larvas apresentam características altriciais, e pequeno tamanho (CN $3,19 \pm 0,04$ mm; VSV $0,477 \pm 0,061$ mm³). O corpo se apresenta transparente, sem pigmentação ou, quando presente, é restrita à porção anterior das cápsulas ópticas e à porção posterior média do saco vitelino. O trato digestório é rudimentar, sem aberturas oral nem anal. Observa-se uma nadadeira primigênia diferenciada que circunda a cauda em toda sua extensão.

As larvas apresentam natação vertical errática, ainda não desenvolveram nadadeiras pares nem a vesícula gasosa, e não se observam reações a estímulos visuais (fototaxia / fotofobia).

Período larval

A Tabela 2 resume as observações feitas durante este período.

Tabela 1. Morfologia geral e desenvolvimento do sistema sensorial em embriões de pacu *Piaractus mesopotamicus* *

Período	Fase	Estádios	Hpf	Descrição
Embrionário	Embrião	Organogênese	9	Diferenciação do eixo crânio-caudal do embrião.
			10	Diferenciação das vesículas ópticas.
			11	Diferenciação da notocorda e início da segmentação mesodérmica.
			14	Diferenciação das vesículas óticas e da vesícula de Kupffer.
			15	Início da contração dos somitos mesodérmicos e da liberação da cauda do vitelo.
			16	Início da diferenciação do cristalino nas vesículas ópticas.
			17	Diferenciação das vesículas olfatórias e cavidades encefálicas; início da diferenciação dos otólitos nas vesículas óticas; formação do esboço do coração.
			18	Início da circulação periférica; fortes contrações caudais e deterioramento avançado do córion.
		Eclosão	19	Corpo sem pigmentação ou restrita à porção anterior dos olhos e posterior-média do saco vitelino, trato digestório rudimentar sem aberturas oral nem anal, nadadeira primordial diferenciada.

* A tabela apresenta as observações feitas a partir do início da organogênese. O período embrionário compreende desde o momento da ativação dos gametas, até o momento no qual 90% de uma amostra de embriões em incubação eclodiu (Johnston *et al.* 1995). Condições de incubação: $26,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, pH $6,5 \pm 0,3$, oxigênio dissolvido > 6 ppm, amônia $< 0,1$ ppm .

Tabela 2. Morfologia geral e desenvolvimento do sistema sensorial de larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus* *

Período	Estádios	Dpe	Descrição
Larval	Larva saco vitelina	0	Larvas altriciais, com narinas diferenciadas, vesículas ópticas com cristalino diferenciado e óticas com dois otólitos, circulação periférica de sangue não-pigmentado, pigmentação melanófora (em alguns dos exemplares) na porção anterior da cápsula óptica e posterior média do saco vitelino.
		0,5	Pigmentação da porção posterior do saco vitelino se estendendo pela região ventral da cauda.
		1	Presença de pigmentação vermelha no sangue, diferenciação da região anal, esboços dos arcos branquiais.
		1,5	Diferenciação da região pré-maxilar, concentração de material ao nível do tubo intestinal.
		2	Arcos branquiais diferenciados, início da formação da cartilagem opercular, início da movimentação da boca, vesícula óptica em avançado estado de pigmentação, ânus aberto.
		2,5	Abertura da boca, diferenciação dos rastros branquiais, forte pigmentação dos olhos, saco vitelino bastante reduzido.
		3	Formação dos primórdios das nadadeiras peitorais, início da insuflação da vesícula gasosa, início da abertura da luz intestinal, esboço da cartilagem opercular cobrindo os arcos branquiais.
		3,5	Nadadeiras peitorais diferenciadas, inicia a diferenciação da nadadeira anal, vesícula gasosa insuflada.
		4	Concentração de pigmentação melanófora na porção superior da vesícula gasosa e em toda a região ventral da larva. Ventilação opercular ativa e habilidades natatórias desenvolvidas (velocidade e estabilidade).
	Larva em Pré-flexão	5	Absorção do vitelo pela totalidade das larvas analisadas. Sensibilidade a sons e vibrações.
		10	Distribuição de pigmentos melanóforos na cabeça. Início da seleção alimentar.
		15	Distribuição de pigmentos melanóforos nos flancos. Início da formação de cardumes
		25	Rápida captura de alimento.

* Condições de incubação: $27 \pm 0,5$ °C, pH $7 \pm 0,5$, oxigênio dissolvido > 6 ppm, amônia $< 0,1$ ppm .

Desenvolvimento das estruturas sensoriais

Receptor olfativo (Figura 2)

O início do desenvolvimento do receptor olfativo começa com a diferenciação da vesícula olfativa (VOlf) no embrião às 17 hpf. Ao examinar larvas recém-eclodidas por meio de MEV é possível identificar, no epitélio das narinas, células receptoras ciliadas e células receptoras com microvilosidades (Figuras 2-A, 2-B, 2-C).

No primeiro dia após a eclosão, observa-se um desenvolvimento expressivo de cílios não sensoriais, chegando a cobrir o epitélio olfativo (Figura 2-D). Da mesma forma, a partir dos 3 dpe, cílios não sensoriais aparecem e se distribuem densamente na região epitelial próxima da VOlF, região pré-ocular e lábio superior. Posteriormente, se observa uma diminuição progressiva destes (Figuras 2-E, 2-F).

A partir dos 3-4 dpe se observa um aprofundamento progressivo do epitélio olfativo, formando uma depressão na narina (Figuras 2-E). Aos 25 dpe se observa um claro estreitamento das bordas lateral e medial, iniciando a diferenciação das futuras câmaras anterior e posterior da narina (Figuras 2-G, 2-H).

Botões Gustativos (BGs) (Figura 3)

Na superfície interna do lábio inferior, e na região próxima ao local onde emergem os dentes, se observam BGs a partir dos 10 dpe (Figuras 3-A, 3-B, 3-C). Neste momento é possível identificar, por meio de MEV, tanto células receptoras com múltiplas microvilosidades curtas, quando células receptoras com uma única microvilosidade alongada (Figura 3-D).

Em secções histológicas sagitais da cavidade oral, é possível observar BGs aos 10 dpe. (Figura 3-E) e BGs em pequenas papilas (Figura 3-F). Aos 25 dpe se observa uma alta densidade de BGs no epitélio labial externo (Figura 3-G).

Células quimiossensoriais isoladas (CQIs) (Figura 4)

A partir dos 4 dpe se observa a presença de CQIs como terminações neuronais livres (ápices) entre células epidérmicas na região pós-ótica (Figuras 4-A a 4-D).

Mecanorreceptores (Figuras 5 e 6)

O desenvolvimento dos neuromastos livres (NL) começa com a formação do neuromasto ótico (NOTic), ao final da organogênese embrionária. No momento da eclosão, o NOTic apresenta-se imaturo (sem cúpula) (Figuras 5-A, 5-B, 5-C), a qual se observa a partir de 2 dpe (Figura 5-D).

No momento da eclosão, por meio de MEV, é possível identificar a ultra-estrutura do NOTic, com grupos de estereocílios ao redor de um único quinocílio (Figura 5-B). O desenvolvimento dos NL da cabeça, assim como dos associados com a LL principal (LL1) e LL secundária (LL2), avança rapidamente após a eclosão. Os primeiros neuromastos da LL1 e LL2 se observam a partir de 1 dpe. As cúpulas destes neuromastos se observam a partir de 2 dpe (Figuras 5-E, 5-F, 5-G). Na região cranial é possível diferenciar vários NL a partir de 2 dpe (Figuras 6-A a 6-E), e séries de NL a partir de 4 dpe definindo um padrão de linhas (supra-orbitária, infra-orbitária, hyo-mandibular, pré-opercular) (Figuras 6-F, 6-G, 6-H).

Ouvido interno (Figura 7)

O ouvido interno se desenvolve a partir da metade da organogênese embrionária, com a diferenciação das vesículas óticas (VOTic) às 14 hpf. Às 17 hpf se observam dois otólitos em cada VOTic.

Secções histológicas sagitais e transversais de larvas com 1 dpe permitem observar células ciliadas e células de sustentação diferenciadas na porção ventral da VOTic (Figuras 7-A, 7-B, 7-C, 7-E, 7-F). Secções histológicas sagitais de larvas com 4 dpe permitem a identificação das cristas anterior, lateral e posterior (Figura 7-D). Outra

estrutura associada ao ouvido interno é a vesícula gasosa, que pode ser observada a partir de 3 dpe, e a partir de 4 dpe se mostra totalmente insuflada.

Receptor visual (Figura 8)

No embrião, a partir das 10 hpe é possível reconhecer a vesícula óptica na região cranial, e a partir das 16 hpf diferencia-se o cristalino. No momento da eclosão não se observam reações a estímulos luminosos (fotofobia / fototaxia) e nenhuma, ou muito pouca pigmentação (melanóforos) no olho, a qual se restringe na sua porção anterior. Na medida em que avança o desenvolvimento, aumenta a pigmentação ocular até os 2,5-3 dpe, quando se observam olhos totalmente pigmentados (Figuras 8-A, 8-B, 8-C).

No momento da eclosão, em cortes dorso-ventrais do olho, pode-se observar uma retina compacta, sem estratificação. A córnea já se encontra separada da lente, e ainda não se observa o nervo óptico (Figura 8-D).

Cortes seriados de larvas de 0 a 25 dpf inclusas em resina EMBED 812 e coradas com AT possibilitaram a identificação do nervo óptico somente nos animais a partir dos 10 dpf. Nessa fase, se observa, em cortes dorso-ventrais do olho, uma córnea multi-estratificada, onde se diferencia o epitélio pigmentado, camada nuclear externa, camada plexiforme externa, camada nuclear interna, camada plexiforme interna e a camada ganglionar; e o nervo óptico (Figuras 8-E, 8-F, 8-G). Aos 25 dpe é possível identificar o epitélio cuboidal na superfície lateral da lente, a qual apresenta sua estrutura típica de camadas concêntricas (Figura 8-H).

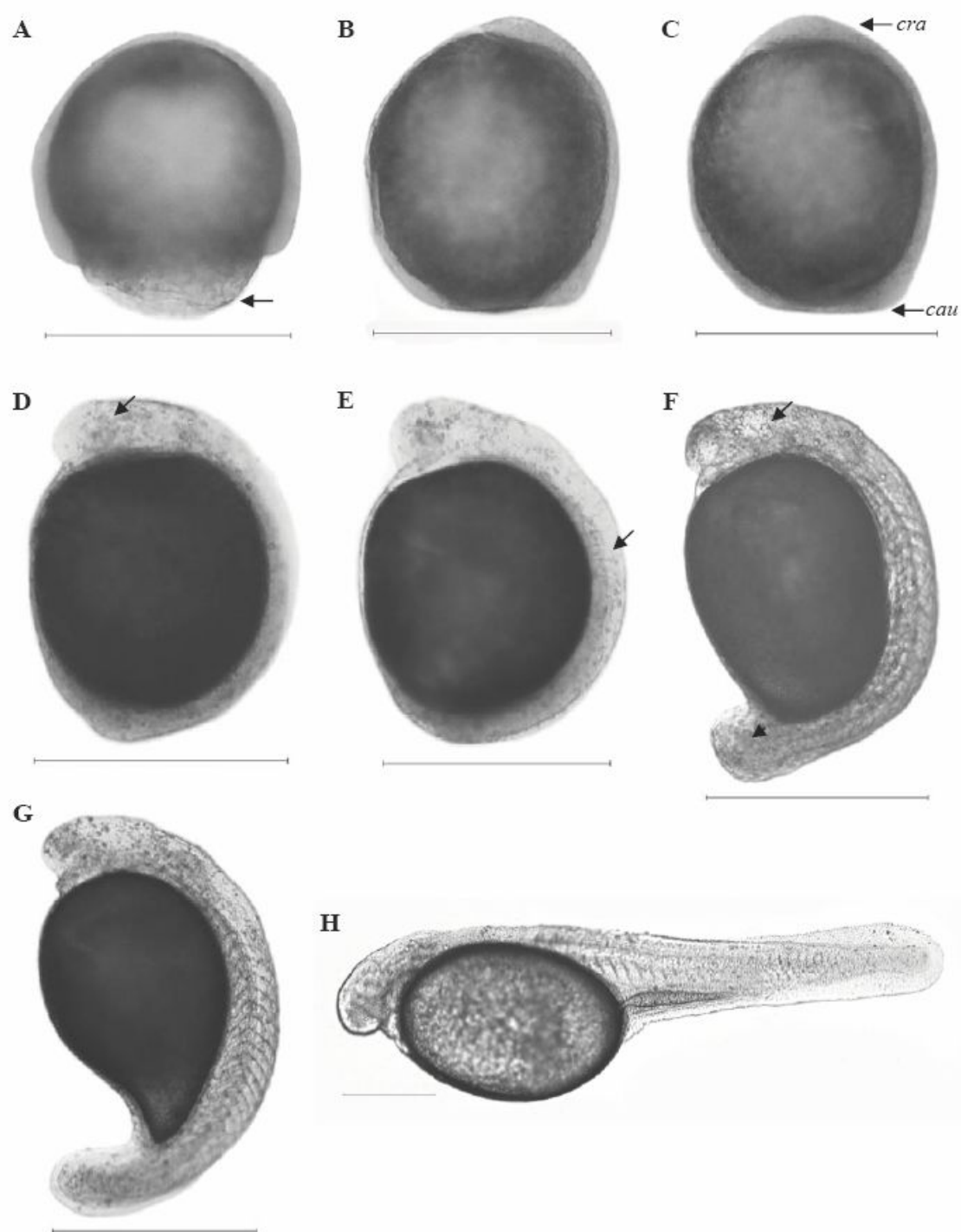


Figura 1. Estádios no desenvolvimento embrionário de pacu *Piaractus mesopotamicus*. A. Gástrula avançada (8 hpf) Vitelo (*seta*). B. Fechamento do blastoporo (8,5 hpf). C. Organogênese inicial (OI). Diferenciação do eixo crânio-caudal do embrião (*setas*) (9 hpf). D. OI. Diferenciação das vesículas ópticas (*seta*) (10hpf). E. Organogênese media (OM). Diferenciação da notocorda e primeiros somitos (*seta*) (11 hpf). F. OM. Diferenciação de vesículas ópticas (*seta*) e vesícula de Kupffer (*cabeça de seta*) (14 hpf). G. Organogênese avançada. Liberação da cauda do vitelo (17 hpf). H. Larva recém eclodida (19 hpf). Barras de escala = 1 mm em A-G, 500 μ m em H.

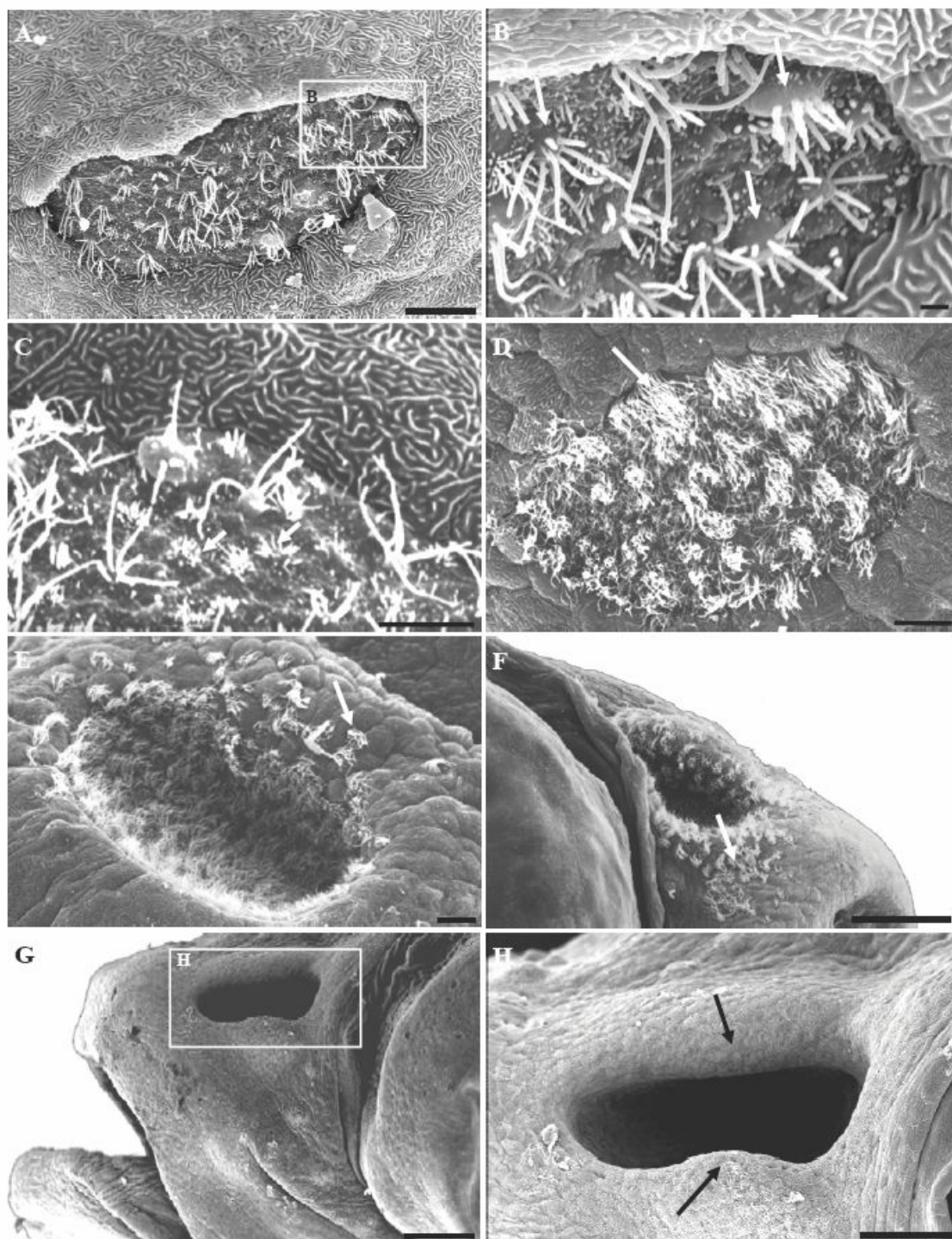


Figura 2. Desenvolvimento do epitélio olfativo. A. Vesícula olfatória (0 dpe). B. Células receptoras ciliadas (*setas brancas*) (0 dpe). C. Células receptoras com microvilosidades (*setas brancas*) (0 dpe). D. Células não sensoriais (*seta*) (1 dpe). E. Quinocílios não sensoriais (*seta*) (3 dpe). F. Quinocílios não sensoriais (*seta*) (10 dpe). G. Narina (25 dpe). H. Estreitamento das bordas lateral e medial da narina (*setas pretas*) (25 dpe). Barras de escala = 10 μ m em A, 1 μ m em B, 5 μ m em C, 10 μ m em D, 10 μ m em E, 50 μ m em F, 100 μ m em G, 50 μ m em H.

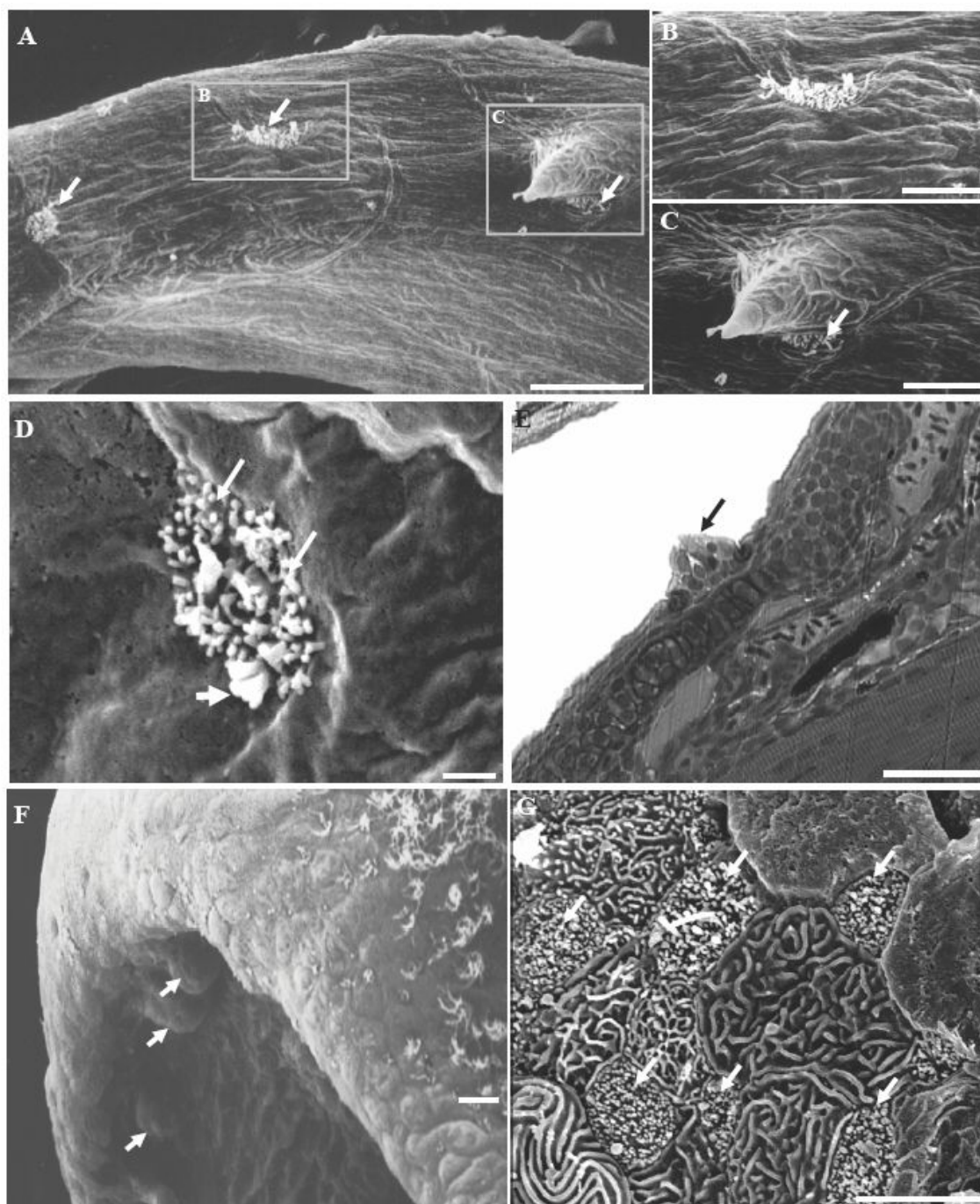


Figura 3. Desenvolvimento inicial dos Botões Gustativos (BGs). A. Epitélio interno do lábio inferior. BGs (*setas*) (10 dpe). B. BG (10 dpe). C. BG na base do dente (*seta*) (10 dpe). D. BG. Células receptoras com microvilosidades (*setas*). Células receptoras com uma única microvilosidade alongada (*cabeça de seta*). (10 dpe). E. Secção sagital da cavidade oral. BG (*seta*) AT 40x (10 dpe). F. BGs (*setas*) encontrados em pequenas papilas do lábio superior (10 dpe). G. Alta densidade de BGs no epitélio externo do lábio inferior. BGs (*setas*) (25 dpe). Barras de escala = 10μm em A, 5 μm em B, 5 μm em C, 1 μm em D, 50 μm em E, 10 μm em F, 5 μm em G.

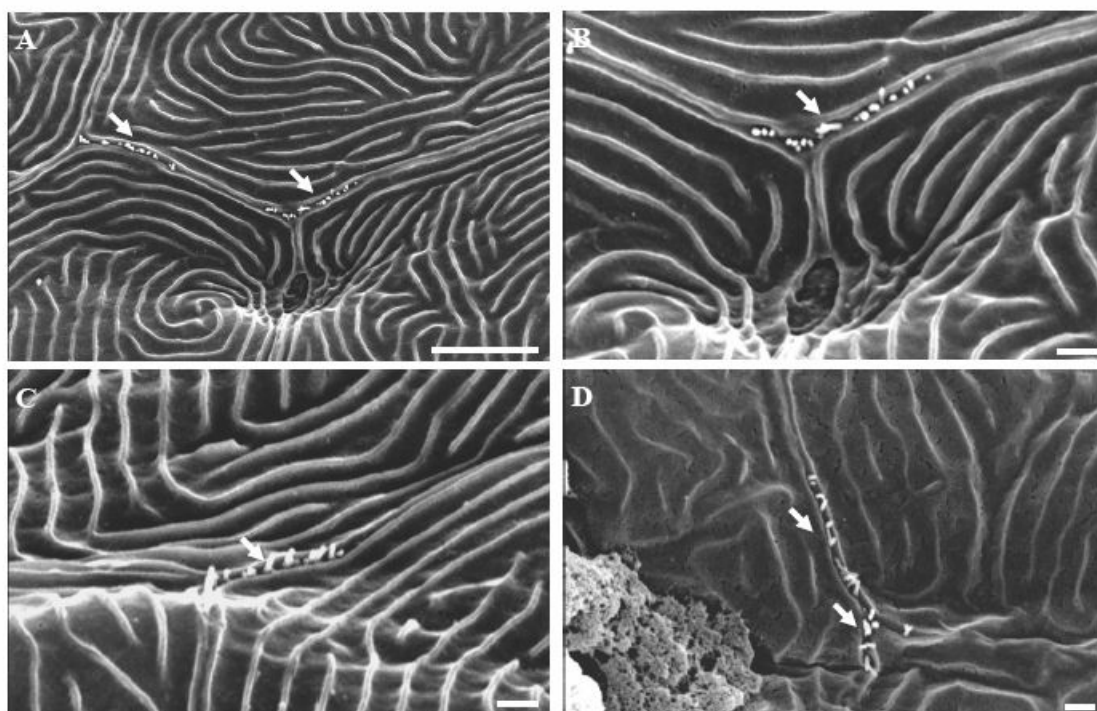


Figura 4. Células Quimiossensoriais Isoladas (CQIs) na região pós-ótica. A. CQIs (*setas*) (4 dpe). B. CQIs (*seta*) (4 dpe). C. CQIs (*seta*) (10 dpe). D. CQIs (*setas*) (25 dpe). Barras de escala = 5 μ m em A, 1 μ m em B, C e D.

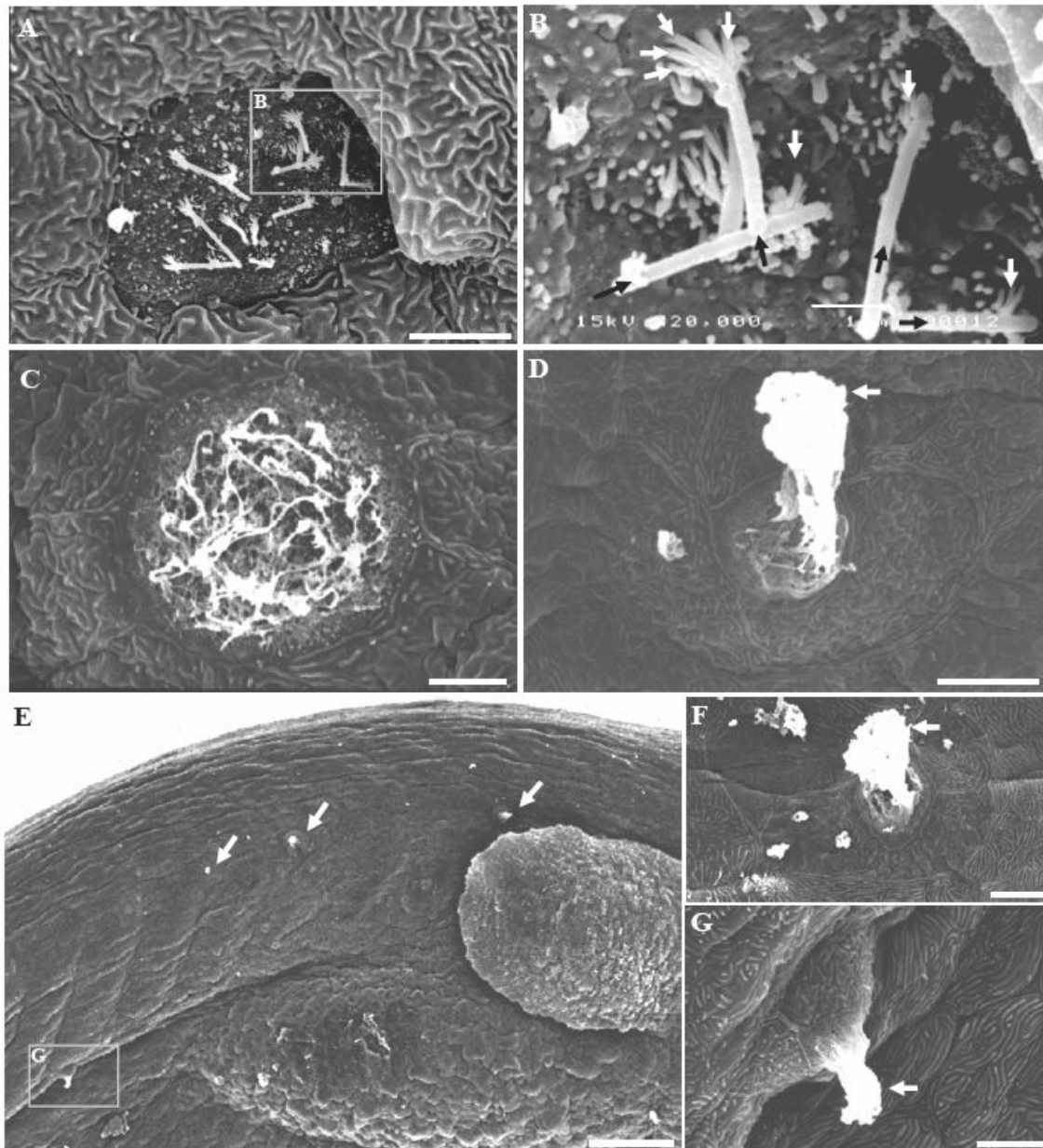


Figura 5. Desenvolvimento inicial de Mecanorreceptores. A. Neuromasto ótico (NOTic) imaturo (0 dpe). B. NOTic. Estereocílios na base dos quincílios (*setas brancas*). Quincílios (*setas pretas*) (0 dpe). C. NOTic imaturo (1 dpe). D. NOTic. Cúpula (*seta*) (2 dpe). E. Neuromastos da linha lateral principal (LL1) (*setas*) e linha lateral secundária (LL2) (*quadro*) (2 dpe). F. 1° Neuromasto da LL1. Cúpula (*seta*) (2 dpe). G. 1° Neuromasto da LL2. Cúpula (*seta*) (2 dpe). Barras de escala = 5 μ m em A, 1 μ m em B, 5 μ m em C, 10 μ m em D, 100 μ m em E, 10 μ m em F, 10 μ m em G.

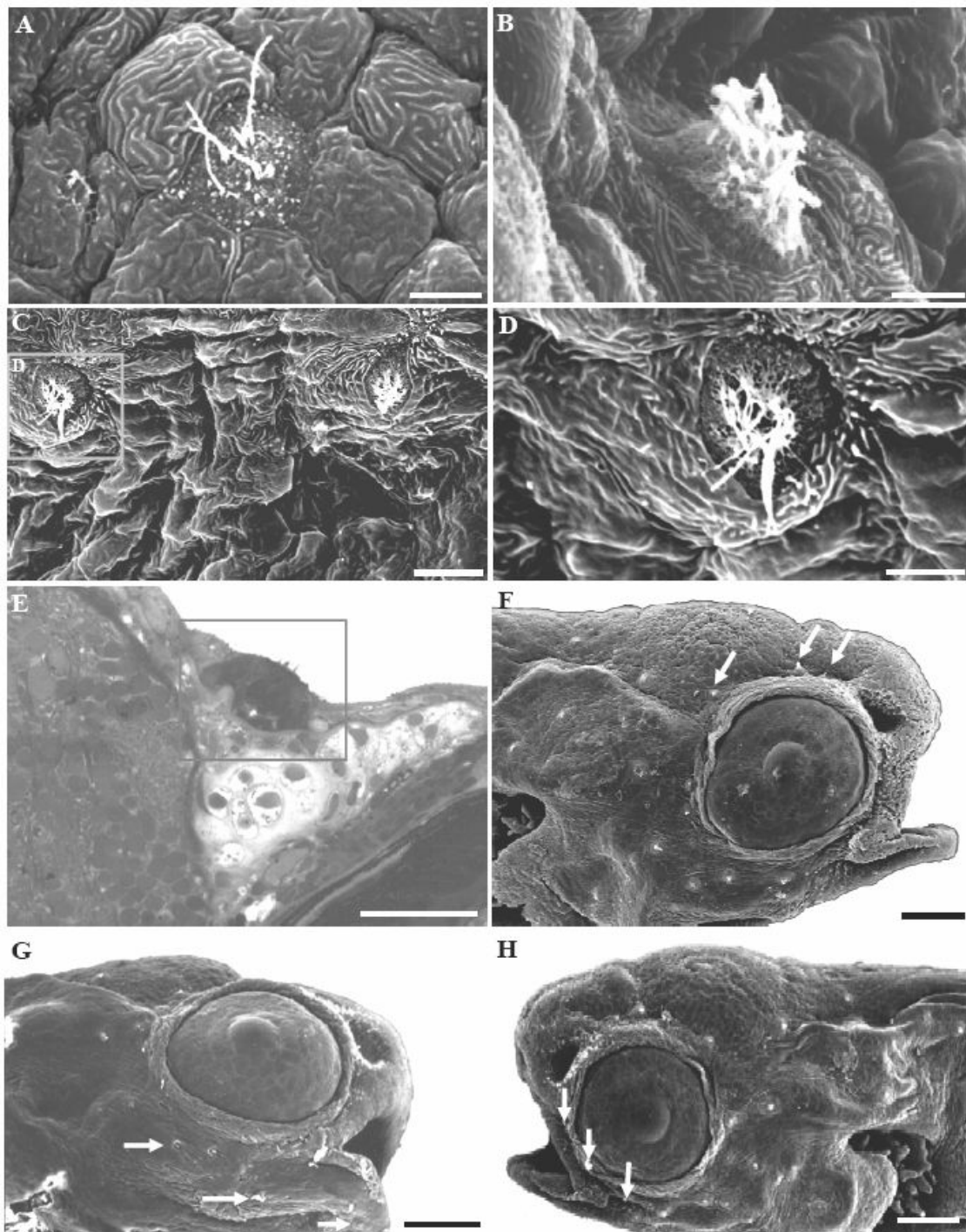


Figura 6. Desenvolvimento de Neuromastos livres (NL) craniais. A. NL supra-orbitario (2 dpe). B. NL infra-orbitario (2 dpe). C. Vista ventral NL hyo-mandibulares (2 dpe). D. NL hyo-mandibular (2 dpe). E. Secção transversal NL supra-orbitário (*quadro*) AT 40x (10 dpe). F. Serie de NL supra-orbitários (4 dpe). G. Serie de NL hyo-mandibulares (4 dpe). H. Serie de NL infra-orbitários (4 dpe). Barras de escala = 5 μ m em A, 5 μ m em B, 10 μ m em C, 5 μ m em D, 50 μ m em E, 100 μ m em F, 100 μ m em G, 100 μ m em H.

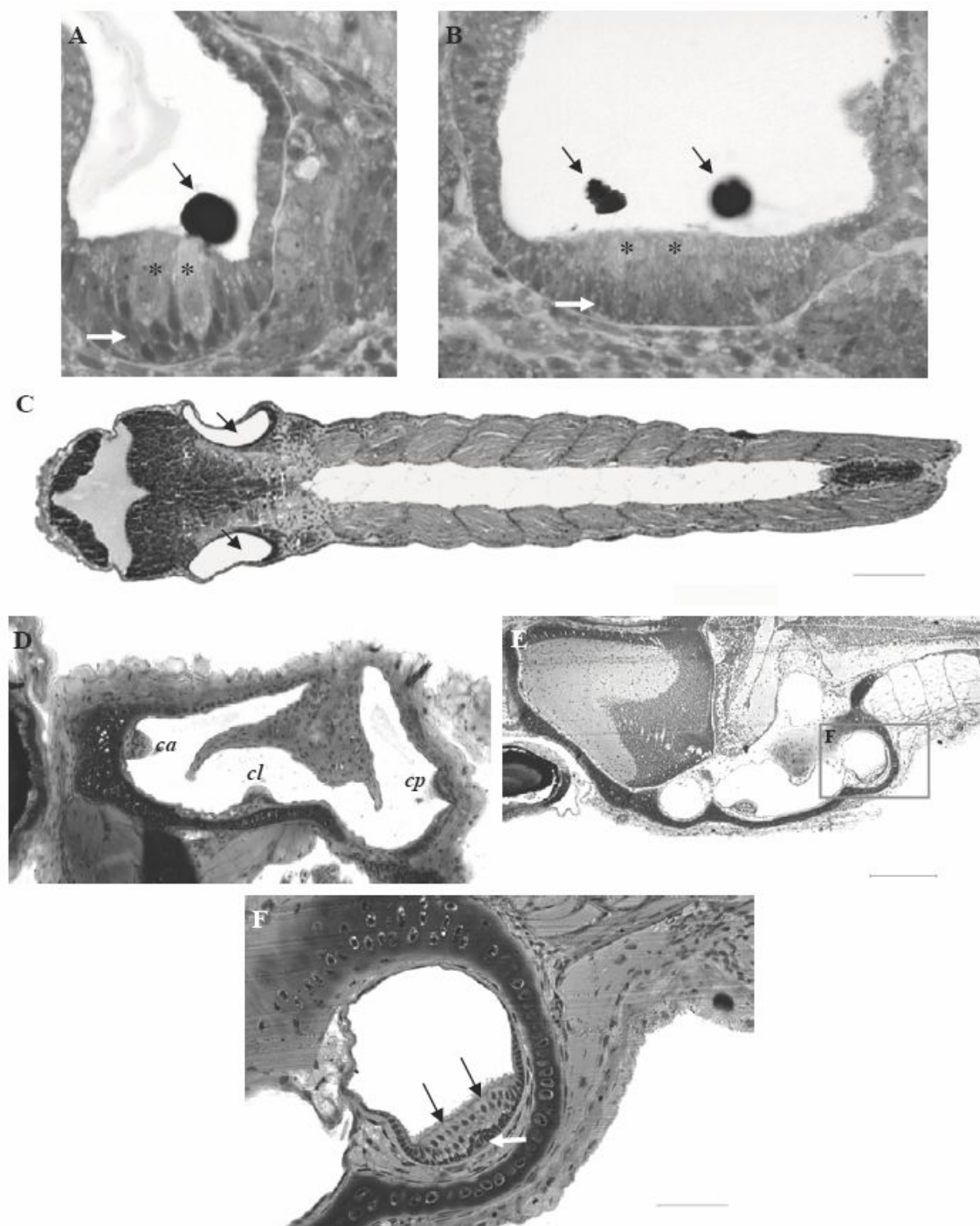


Figura 7. Desenvolvimento inicial do Ouvido interno. A. Secção transversal da Vesícula ótica (VOTic). Otólito (*seta preta*). Célula sensorial (*). Células de sustentação (*seta branca*) AT 100x (1dpe). B. Secção sagital da VOTic. Otólitos (*setas pretas*). Células sensoriais (*). Células de sustentação (*seta branca*) AT 100x (1 dpe). C. Secção horizontal VOTic (*setas*) H-E 10x (1 dpe). D. Secção sagital da VOTic . Crista anterior (*ca*). Crista lateral (*cl*). Crista posterior (*cp*) AT 20x (4 dpe). E. Secção horizontal VOTic AT 10x (25 dpe). F. Secção horizontal VOTic. Células sensoriais (*setas pretas*). Células de sustentação (*seta branca*) AT 40x (25 dpe). Barras de escala = 100 μ m em C, 200 μ m em E, 50 μ m em F.

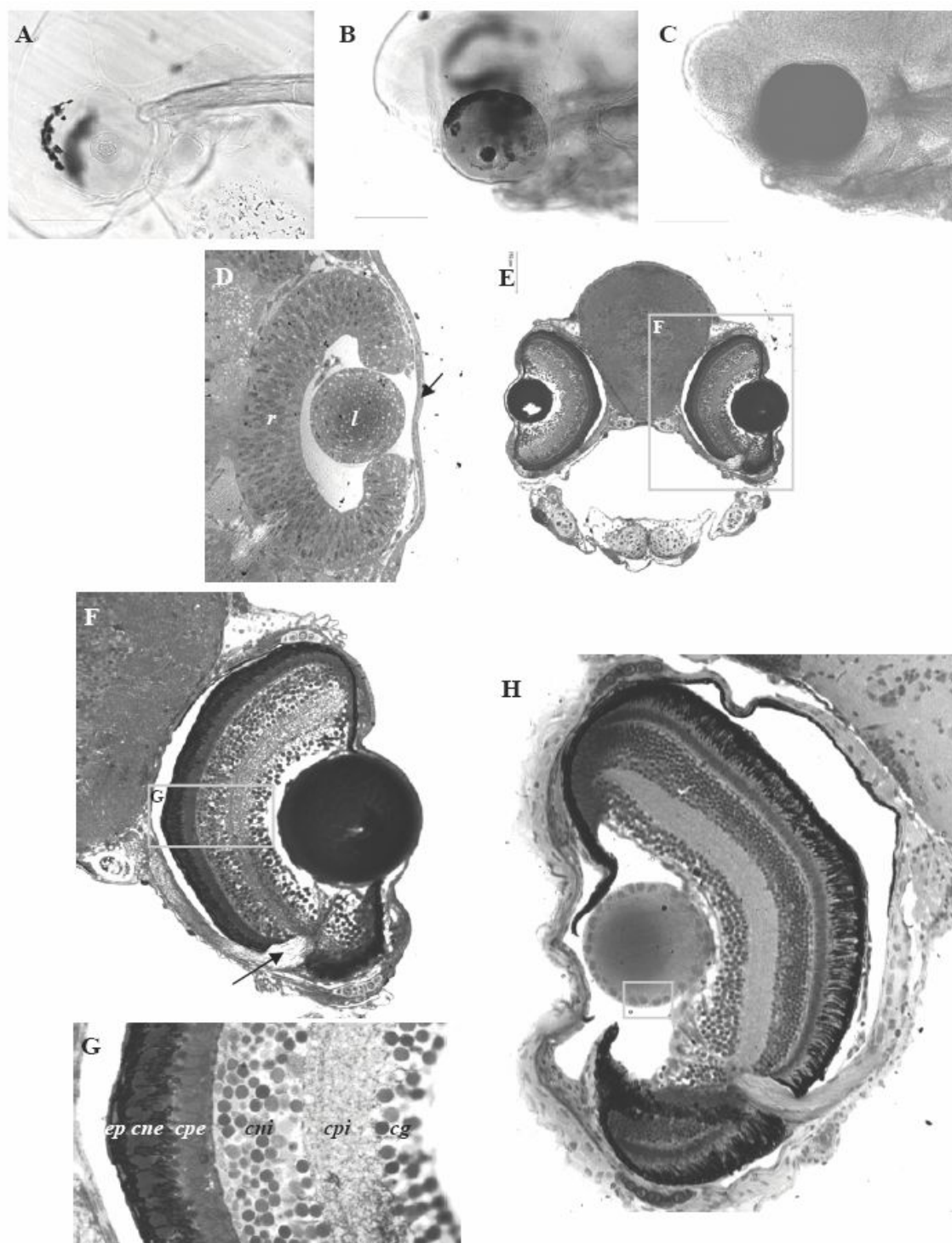


Figura 8. Desenvolvimento inicial do receptor visual. A, B e C. Pigmentação do olho ao 1°, 2° e 3° dpe, respectivamente (barras de escala = 200 μ m). D. Secção transversal do olho. Córnea (*seta*). Lente (*l*). Retina (*r*) AT 100x (0hpe). E. Secção transversal do olho AT 20x (10 dpe.). F. Secção transversal do olho. Nervo óptico (*seta*) AT 40x (10 dpe). G. Secção transversal do olho. *ep*: epitélio pigmentado. *cne*: camada nuclear externa. *cpe*: camada plexiforme externa. *cni*: camada nuclear interna. *cpi*: camada plexiforme interna. *cg*: camada ganglionar. AT 100x (10 dpe). H. Secção transversal do olho. Epitélio cuboidal (*quadro*) AT 20x (25 dpe).

Discussão

O pacu realiza migrações reprodutivas no início da temporada de cheias (Romagosa *et al.*, 1988), libera ovócitos de pequeno tamanho em águas abertas que, ao serem fertilizados, exibem um rápido desenvolvimento embrionário (Ribeiro *et al.* 1995), e que originam larvas altriciais que se convertem aos 4 ou 5 dias após a eclosão em organismos exclusivamente exotróficos (Clavijo-Ayala *et al.*, 2006). Ao esgotar rapidamente suas reservas vitelinas e se desenvolver em ambientes com potencial risco de predação, as larvas de pacu devem ter como prioridade o rápido desenvolvimento de estruturas alimentares, sensitivas e locomotoras que possibilitem sua sobrevivência.

A rápida diferenciação dos neurônios quimiorreceptores especializados no epitélio olfativo de pacu pode indicar a relevância deste mecanismo sensorial no desenvolvimento inicial e a precoce sensibilidade química da espécie. A diferenciação das vesículas olfatórias se inicia às 17 hpf, e no momento da eclosão (19 hpf), o epitélio olfatório se encontra exposto, e é possível identificar células receptoras ciliadas e células receptoras com microvilosidades.

Tanaka *et al.*, 1991 observaram como larvas recentemente eclodidas de *Pagrus major* apresentam células sensoriais ciliadas no epitélio olfatório e descrevem sensibilidade química com tendência a permanecer perto da fonte de estímulo. A rápida diferenciação das células sensoriais é também assinalada como evidência da funcionalidade do epitélio olfativo por Appelbaum & Riehl, 1997; Hara & Zielinski, 1989; Kawamura & Washiyama, 1989; Arvedlund *et al.*, 2000; e Matsuoka, 2001.

Um dia após a eclosão se observa a rápida proliferação de células ciliadas não-sensoriais no epitélio olfativo de pacu. De acordo com Hansen & Zielinski (2005), tais células estão envolvidas na movimentação de muco e / ou água no epitélio olfativo. Igualmente, a partir dos 3 dpe, se observa o aparecimento e distribuição de cílios não-sensoriais na região adjacente às narinas (região pré-ocular e lábio superior). Na medida em que avançou o desenvolvimento e a larvas ganharam maior mobilidade, os cílios não-sensoriais foram desaparecendo. Esse padrão de aparecimento, distribuição e

posterior retração de cílios não-sensoriais perto da cavidade olfativa em pacu coincide com o observado para *Micropterus salmoides* por Kawamura & Washiyama (1989). De acordo com Iwai (1980), Appelbaum & Riehl (1997), Kawamura & Washiyama (1989) e Matsuoka (2001) os cílios não-sensoriais são quinocílios que atuam criando correntes de água no epitélio olfativo, aumentando suas possibilidades receptoras durante os estádios nos quais as larvas têm baixa movimentação. Uma vez que as larvas de pacu desenvolveram habilidades natatórias, os quinocílios não-sensoriais foram desaparecendo gradativamente.

Ao contrário do reportado para outras espécies (Elston *et al.*, 1981; Appelbaum & Riehl, 1997; Matsuoka, 2001; Kawamura *et al.*, 2003; Belanger *et al.*, 2003) durante este estudo não se observou a formação das cavidades anterior e posterior nas narinas, mas ao final das observações (aos 25 dpe) evidenciou-se um ligeiro estreitamento das bordas medial e lateral da cavidade olfatória. A diferenciação das cavidades anterior e posterior nas narinas tem lugar em posteriores estádios de desenvolvimento, já que as duas cavidades são encontradas em exemplares juvenis e adultos da espécie.

A presença desse istmo ou “ponte” entre as bordas medial e lateral das cavidades nasais, formando as cavidades anteriores e posteriores das narinas (*salmo type of nostril formation*, *sensu* Hansen & Zielinski, 2005), é um caráter filogenético antigo em teleósteos (Hansen & Zielinski, 2005) e já foi descrito para outras espécies Neotropicais: *Pseudoplatystoma coruscans* (Teleostei: Siluriformes) (Cestarolli, 2005) e *Brycom amazonicus* (Teleostei: Characiformes) (Neumann, 2008).

Por sua vez, Mana & Kawamura (2002) reportaram que exemplares de *Pagrus major* e *Acanthopagrus schlegeli* capturados em ambientes naturais podem apresentar ou não essas cavidades anteriores e posteriores das narinas, observando-se, em algumas ocasiões, uma única abertura nasal. Porém, os autores observaram, no mesmo estudo, a freqüente incidência de uma única abertura nasal em larvas obtidas em operações de larvicultura, relacionando tal “anormalidade” com as condições de cultivo, tais como densidade larval, fatores nutricionais e metabólicos das larvas, ou com a pressão de aeração nos tanques de larvicultura. Os autores argumentam que os exemplares capturados no ambiente natural que apresentam uma única abertura nasal, poderiam ser provenientes de programas de repovoamento. No entanto, o fato de que *Pagrus major* e

Acanthopagrus schlegeli (Perciformes: Percoidei: Sparidae) pertençam à Superordem Acanthopterygii (Nelson, 2006) poderia explicar a presença de uma única abertura nas cavidades nasais, mesmo em indivíduos capturados na natureza. De acordo com Hansen & Zielinski (2005) a morfologia da cavidade nasal em Teleósteos pode ser variada, e no caso dos Acanthopterygii podem se encontrar diversos padrões de formação das cavidades nasais, entre elas a presença de uma única abertura.

Assim como em Mana & Kawamura (2002), não pode ser descartada a possível influência das condições de cultivo na formação de narinas com uma única cavidade; mas, no caso das larvas empregadas neste estudo, nenhuma evidência direta (causa-efeito) permite aceitar tal hipótese. Como notado anteriormente, a hipótese aqui aceita é a formação das cavidades anterior e posterior nas narinas de pacu em estádios ontogenéticos posteriores.

Neste estudo não se observaram lamelas na cavidade olfativa, e sua presença ou ausência na espécie deve ser corroborada ao analisar exemplares com um desenvolvimento ontogenético mais avançado. Neumann (2008) reportou a formação de lamelas em *Brycon amazonicus* (Teleostei: Characidae). De acordo com Matsuoka (2001) o desenvolvimento de lamelas no epitélio olfativo aumenta progressivamente durante a ontogenia até atingir o número espécie-específico. Hansen & Zielinski (2005) descrevem como o epitélio olfativo de peixes Teleósteos apresenta estruturas multilamelares (usualmente formando rosetas), mas descrevem que alguns Acanthopterygii apresentam epitélio olfativo plano ou com uma, duas ou três lamelas.

Outro elemento importante do sistema quimiorreceptor em peixes são os chamados botões gustativos (BGs). Diversos autores enfatizaram a dificuldade na discriminação dos estímulos que podem ser percebidos pelo epitélio olfativo daqueles percebidos pelos BGs, pois ambos os sistemas são sensíveis às substâncias químicas dissolvidas na água (Noakes & Godin, 1988; Hara & Zielinski, 1989). No entanto, a sequência de aparição e localização dos BGs indicam seu papel na identificação química e seleção de alimento, assim como sua capacidade mecanorreceptora (Appelbaum & Rielh, 1997; Kotrschal 2000).

Em pacu, foram identificados BGs a partir do 10 dpe, tanto no epitélio interno do lábio inferior quanto no interior da cavidade oral. Os BGs puderam ser observados perto da região onde emergem os dentes, na base dos mesmos ou em pequenas protuberâncias (papilas) próximas a eles. Aos 25 dpe observou-se uma alta densidade de BGs no epitélio externo dos lábios. Tais observações concordam com o reportado para outras espécies (Hansen *et al.*, 2002; Cestarolli, 2005; Uyan *et al.*, 2006, Neumann, 2008). De acordo com Hansen *et al.* (2002), Żuwala *et al.* (2002), Kasumyan & Døving (2003), Fishelson (2004), Reutter & Witt (2004), o epitélio sensorial dos BGs é formado tanto pelas células com uma única terminação apical, quanto pelas células com múltiplas microvilosidades apicais (células claras e escuras, respectivamente, de acordo com sua densidade eletrônica na microscopia eletrônica de transmissão).

Segundo Kotrschal (1996), em vários Ostariophysi (e.g. Cypriniformes e Siluriformes) os BGs podem se encontrar em toda a superfície corporal, e agregarem-se em áreas de freqüente contato e/ou localização de alimento, como lábios, barbilhões e nadadeiras. Por sua vez, Northcutt (2005) descreve a presença de BGs ao longo do corpo de *Ictalurus punctatus*. Tais BGs extra-orais teriam a função de detecção química e mecânica. Nos exemplares de pacu analisados neste estudo não foram encontrados BGs extraorais.

Por sua parte, os BGs intraorais (cavidades oral, branquial, faríngea, e esofágica) podem ter, além da sensibilidade química, propriedades mecanorreceptoras, tendo como função testar a palatabilidade (consistência, textura e sabor) dos alimentos, permitindo a seleção do alimento capturado antes da sua ingestão (Uyan *et al.* 2006).

Neste estudo, foi observado durante a segunda e a terceira semanas de alimentação exógena, que as larvas de pacu identificaram, perseguiram e capturaram alimento inerte, mas em algumas ocasiões, após alguns segundos, rejeitaram o alimento. Similares observações foram feitas para larvas de *Pseudoplatystoma coruscans* (Cestarolli, 2005). Essas observações foram claras quando oferecidas dietas formuladas, o que pode indicar a pouca palatabilidade das mesmas, gerando falta de interesse para sua ingestão por parte das larvas.

Uma vez em que as larvas de peixes esgotam as reservas vitelinas, seu crescimento dependerá de sua habilidade para capturar alimentos, vivos ou inertes. O bom desempenho de crescimento e sobrevivência de larvas de pacu depende do fornecimento de alimentos e dietas com adequado conteúdo energético e balanço nutricional apropriado (Jomori, 2005), mas também com uma alta palatabilidade, conforme verificado no presente estudo, tanto pelo comportamento alimentar das larvas como pela presença de estruturas receptivas do paladar. De forma contrária, a larva perderá interesse pelas dietas formuladas e deixará de se alimentar, podendo causar sérios prejuízos pelo baixo crescimento e alta mortalidade. Nesse sentido, o uso de aminoácidos com alta solubilidade pode fornecer claras alternativas no desenvolvimento de técnicas de transição alimentar e formulação de dietas inertes para larvas de peixes (Hara & Zielinsky 1989, Kawamura *et al.* 2003). No caso do pacu, Tesser (2005) demonstrou a eficácia no uso de glicina, lisina e betaína como estimuladores do comportamento alimentar de larvas da espécie.

Outra evidência que pode indicar a importância da quimiorrecepção no desenvolvimento inicial do pacu é a presença de células quimiorreceptoras isoladas (CQIs) na epiderme da região pós-ótica a partir dos 4 dpe. As CQIs são observadas como terminações neuronais livres (ápices) entre células epidérmicas, e de acordo com Kotrschal (1995); Kotrschal (1996), Kotrschal *et al.* (1997), Kotrschal *et al.* (1998), Kotrschal (2000), têm um papel importante na identificação intra e inter-específica (sendo sensíveis a feromônios e componentes de ácidos e sais biliares), mas também podem ter participação na detecção de alimentos.

Baseado nas informações proporcionadas no presente estudo, pode-se afirmar que o padrão de desenvolvimento do sistema quimiorreceptor em pacu é similar ao reportado para *Danio rerio* por Hansen *et al.* (2002), no qual os BGs aparecem depois do desenvolvimento de outros elementos do sistema quimiorreceptor: os neurônios quimiorreceptores do epitélio olfatório e as CQIs.

Da mesma forma que o sistema quimiorreceptor, elementos mecanossensoriais são observados precocemente rapidamente durante o desenvolvimento embrionário e larval de pacu. Ao analisar embriões tardios (ao final da organogênese embrionária) e larvas recém-eclodidas, constatou-se a presença do neuromasto ótico ainda imaturo (sem

cúpula). No entanto, a ausência dessa cúpula permitiu a observação, por meio da MEV, de quatro eixos de sensibilidade dos quinocílios (crânio-caudal e dorso-ventral).

De acordo com Tavalga (1971), Bleckmann (1993) e Ghysen & Dambly-Chaudière (2004), a posição do quinocílio em relação aos estereocílios agrupados na sua base, determina o eixo de sensibilidade do neuromasto, podendo observar-se dois (crânio-caudal) ou quatro (crânio-caudal e dorso-ventral) eixos de sensibilidade. Segundo Kawamura *et al.* (2003), os neuromastos que apresentarem quatro eixos de sensibilidade, seriam presumivelmente mais efetivos na detecção de objetos em movimento.

Da mesma forma ao observado em pacu, Shardo (1996) e Otsuka (2003) descreveram neuromastos óticos imaturos no momento da eclosão em larvas de *Alosa sapidissima* (Teleostei: Clupeiformes) e *Paralichthys olivaceus*, (Teleostei: Pleuronectiformes), respectivamente. No entanto, ambos os autores reportaram neuromastos óticos com polaridade (sensibilidade) de tipo radial.

Os neuromastos podem ser encontrados associados à linha lateral, distribuídos livremente no epitélio ou, em alguns casos, formando linhas de neuromastos livres na cabeça, inclusive constituindo parte de canais sensoriais craniais (Liem *et al.*, 2001; Webb & Shirey, 2003). Em pacu, foram observados neuromastos associados à linha lateral principal e à linha lateral secundária a partir do 1º dpe, tornando-se maduros (com a presença de cúpula) a partir do 2º dpe. Da mesma forma, foi possível identificar neuromastos livres na cabeça a partir do 2º dpe, os quais definem um padrão de linhas a partir dos 4 dpe (supra-orbitária, infra-orbitária, hyo-mandibular, e pré-opercular).

A rápida aparição e maturação dos neuromastos, e a sua distribuição tanto na cabeça quanto nas regiões dorsal e lateral do corpo, pode indicar a importância da mecanorrecepção no desenvolvimento inicial do pacu. De acordo com Iwai (1980), Blaxter (1986), Bleckmann (1993), Liem *et al.* (2001), Webb & Shirey (2003), e Ghysen & Dambly-Chaudière (2007), a mecanorrecepção tem um papel fundamental na adaptação das larvas a águas abertas após da eclosão, e participa na detecção de estímulos mecânicos, identificando a aproximação de partículas móveis ao seu redor. Isto é fundamental para larvas recém-eclodidas, as quais ainda não têm desenvolvido a

fotorrecepção e acuidade visual, ou para aquelas que se desenvolvem em ambientes com pouca ou nenhuma luminosidade. Por outro lado, Cestarolli (2005) concluiu que a mecanorrecepção não deve ocupar posição relevante para a alimentação de larvas de *Pseudoplatystoma coruscans*, uma vez que os canais da linha lateral cefálica e os neuromastos superficiais somente se encontram bem desenvolvidos na época da metamorfose, aos 16 dpe.

Appelbaum & Riehl (1997) destacam o papel da mecanorrecepção na detecção de partículas móveis e, portanto, na captura de alimento. Por sua vez, Moyle & Cech (2004) destacaram o papel da mecanorrecepção na orientação espacial dentro da água; e no trabalho de Pitcher *et al.* (1976), ficou demonstrada a importância dos receptores da linha lateral na orientação e natação de peixes nos cardumes.

Ao contrário do reportado para *Pseudoplatystoma coruscans* (Cestarolli, 2005), durante este estudo não se observou a formação de canais sensoriais na cabeça de pacu. Futuras observações são necessárias para confirmar ou descartar a presença destas estruturas na espécie.

Por outro lado, o desenvolvimento do ouvido interno em pacu é rápido. Às 14 hpf se observou a diferenciação das vesículas óticas no embrião e às 17 hpf foi possível identificar os otólitos. Ao 1º dpe, observou-se a diferenciação celular das máculas, constituídas por células sensoriais e células de sustentação. Aos 4 dpe já se observou a diferenciação das cristas anterior, média (ou lateral) e posterior, e o início da diferenciação dos canais semicirculares. Assim, o pacu apresenta, poucos dias após a eclosão, os cinco elementos sensoriais fundamentais do ouvido interno (i.e. duas máculas e três cristas em cada ouvido, segundo Whitfield *et al.*, 2002 e Nicolson, 2005). Os otólitos associados às células sensoriais das máculas permitem a captação de vibrações na água, além de participar da sensibilidade gravitacional, localização espacial e equilíbrio da larva (Hawkins, 1993; Whitfield *et al.*, 2002; Nicolson, 2005). Por sua vez, as células sensoriais das cristas participam na captação de sons (Haddon & Lewis, 1996; Bever & Fekete, 2002; Nicolson 2005)

A Superordem Ostariophysi (formada pelas Ordens Gonorynchiformes, Cypriniformes, Characiformes, Siluriformes e Gymnotiformes) caracteriza-se pela

distintiva modificação das quatro ou cinco primeiras vértebras, as quais apresentam uma série de ossículos (chamados ossículos de Weber em homenagem à E. Weber que os descreveu em 1820) que, junto com os ligamentos associados, conectam a vesícula gasosa ao ouvido interno, transmitindo vibrações e sons. Os ossículos (Tripus, Intercalarium, Scaphium e Claustum), seus ligamentos e as vértebras associadas conformam o Aparelho de Weber, que proporciona aos Ostariophysi uma alta sensibilidade auditiva (Liem et al, 2002; Nelson, 2006). Da mesma forma, ao transmitir vibrações aos otólitos, o aparelho de Weber pode ter um papel importante no desenvolvimento das habilidades natatórias em Ostariophysi.

Em pacu se observou a vesícula gasosa insuflada a partir dos 3,5-4 dpe (Clavijo-Ayala *et al.*, 2006) e, de acordo com Yamanaka (1988) as estruturas do aparelho de Weber já são visíveis, mas ainda incompletas, em larvas de 12 mm de comprimento padrão. No entanto, assim como no trabalho de Clavijo-Ayala *et al.*, (2006), neste estudo se observaram larvas com habilidades natatórias desenvolvidas (controle direcional, equilíbrio e estabilidade) com 4 dpe ($5,53 \pm 0,54$ mm CN, no trabalho de Clavijo-Ayala *et al.*, 2006; e $5,62 \pm 0,08$ mm CN, neste estudo). Posteriores estudos são necessários para determinar o momento em que o aparelho de Weber é funcional, assim como seu papel no comportamento natatório da espécie.

Por outro lado, e de acordo com as evidências morfológicas observadas pode se afirmar que o desenvolvimento do receptor ocular em pacu é rápido, mas ainda não fica claro qual é o momento (ou momentos) em que se inicia a funcionalidade do mesmo, ou de alguns de seus elementos. Às 10 hpf se observou a diferenciação das vesículas ópticas, e a partir das 16 hpf se constatou a diferenciação da lente. No momento da eclosão (19 hpe) não se verificaram respostas a estímulos luminosos (fotofobia/fototaxia), mas foi possível evidenciar a separação da córnea da lente e uma retina ainda sem estratificação.

De acordo com Blaxter (1986) e Noakes & Godin (1988), uma grande parte das larvas de peixes eclodem com o receptor ocular ainda imaturo (não funcional), o qual só atinge sua capacidade receptora a partir do momento da pigmentação da vesícula óptica. Neste estudo observou-se a pigmentação total dos olhos aos 2,5-3 dpe. No entanto a presença do nervo óptico foi constatada aos 10 dpe. Sem a presença do nervo óptico, é

impossível concluir sobre a funcionalidade do receptor ocular. De acordo com Junqueira & Carneiro (2004), a retina é a estrutura receptora-integradora do olho, pois apresenta camadas de células especializadas na fotorecepção, camadas de células bipolares que unem funcionalmente as células dos cones e dos bastonetes às células ganglionares, e camadas de células ganglionares que convergem os axônios formando o nervo óptico.

O rápido desenvolvimento dos elementos quimiorreceptores e mecanorreceptores do sistema sensorial pode indicar a sua prevalência frente à funcionalidade do receptor ocular durante os primeiros dias de vida livre do pacu. No entanto, Yamanaka (1988) descreveu que o comprimento do olho e o comprimento total da espécie se mantêm numa relação de 30 e 40% durante o desenvolvimento larval. De acordo com a autora, essa alta relação indicaria a importância da visão no desenvolvimento larval da espécie. No mesmo trabalho é descrito que essa relação diminui (20%) quando o pacu atinge o período juvenil. Assim, é clara a necessidade de estudos eletro-fisiológicos e comportamentais acurados que detalhem a ontogenia funcional do receptor ocular na espécie.

Apesar dos avanços no conhecimento do desenvolvimento inicial do sistema sensorial de pacu derivados deste estudo, diversos aspectos anatômicos, morfológicos, estruturais, ultra-estruturais e funcionais permanecem ainda sem o adequado detalhamento. Porém, a tarefa de descrever a ontogenia do sistema sensorial de qualquer espécie precisa de múltiplos esforços, e de equipes especialistas em distintas áreas.

No entanto, podemos afirmar com veemência, que muitos dos aspectos fundamentais da ontogenia inicial do sistema sensorial da espécie são apresentados, pela primeira vez, neste estudo, enquanto que outros permanecem, ainda, *in terra incognita*. Essa certeza estimula a continuidade dos estudos nesta área, não só com o pacu, mas também em outras espécies, imersos no espírito das palavras de Lucien Cuénot, quando afirmou que só se compreende algo quando se conhece sua gênese. Neste caso, a ontogênese.

Conclusões

De acordo com a análise dos resultados obtidos neste estudo e da discussão feita à luz da informação disponível relativa ao desenvolvimento do sistema sensorial em peixes, pode se concluir que:

- O rápido desenvolvimento e especialização das estruturas sensoriais em pacu é prioritário para a sobrevivência larval da espécie;
- No momento da eclosão se observa um epitélio olfatório diferenciado com células quimiorreceptoras especializadas (neurônios sensoriais ciliados e neurônios sensoriais com microvilosidades). Essa rápida diferenciação do epitélio olfatório pode indicar a precoce funcionalidade do mesmo;
- No momento do início da alimentação exógena não se evidencia a presença de BGs, os quais só se observam a partir dos 10 dpe, o que pode explicar a seleção alimentar observada em larvas dessa idade.
- A presença precoce de CQIs é indicativo da importância do desenvolvimento do sistema quimiorreceptor para larvas da espécie;
- O desenvolvimento do sistema mecanorreceptor é expressivo durante os primeiros dias após a eclosão, indicando a sua importância no desenvolvimento inicial das larvas da espécie;
- O desenvolvimento do ouvido interno é rápido. Aos poucos dias após da eclosão (4 dpe) se observam claramente os cinco elementos fundamentais do ouvido interno, o que pode indicar a rápida sensibilidade de larvas de pacu a sons e o papel do ouvido interno na localização espacial, controle direcional e equilíbrio, já que nesse momento do desenvolvimento se observam larvas com claras habilidades natatórias;

- Diversos elementos do receptor ocular se desenvolvem rapidamente. Aos 10 dpe é possível identificar uma retina estratificada e a presença do nervo óptico, mas são necessários estudos mais acurados que definam qual é o momento em que as larvas demonstram funcionalidade do receptor visual;
- O padrão de desenvolvimento inicial observado em pacu se ajusta claramente ao proposto por Balon (1959, 1984 a, b, 1990) na Teoria de Ontogenia Saltatória. O pacu “alinha” o desenvolvimento das estruturas sensoriais, craniais (desenvolvimento de mandíbula e maxila) e locomotoras (desenvolvimento das nadadeiras peitorais, insuflação da vesícula gasosa, diferenciação de elementos na nadadeira caudal) e, no momento de esgotar suas reservas vitelinas, se converte em um organismo com capacidade de perceber, identificar, perseguir e capturar presas, o que possibilita seu crescimento e, ao mesmo tempo, perceber, identificar e fugir de potenciais predadores e/ou situações de desconforto, o que permite a sua sobrevivência. No momento em que esgota suas reservas vitelinas, o pacu inicia uma nova forma de interação organismo-ambiente, convertendo se num organismo exclusivamente exotrófico. O rápido desenvolvimento das estruturas sensoriais na espécie possibilita esse tipo de interação.

Considerações finais

O estudo do desenvolvimento inicial, da ontogenia das estruturas sensoriais, e das mudanças no comportamento larval é fundamental para o entendimento de múltiplos aspectos da ecologia larval em águas abertas, assim como para o desenvolvimento de técnicas adequadas a implementar durante a incubação e larvicultura de peixes. Na atualidade, a execução destes estudos é prioritária para o desenvolvimento de pacotes tecnológicos de espécies de peixes Neotropicais.

Referências

- Appelbaum, S., Riehl, R. 1997. Scanning electron microscopic observations of the chemo- and mechanoreceptors of carp larvae (*Cyprinus carpio*) and their relationship to early behaviour. *Aquatic Living Resources*, 10: 1-12.
- Arvedlung, M., Larsen, Kim., Winsor, H. 2000. The embryonic development of the olfactory system in *Amphiprion melanopus* (Perciformes: Pomacentridae) related the host imprinting hypothesis. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 80: 1103-1110.
- Balon, E.K. 1984. Reflections on Some Decisive Events in the Early Life of Fishes. *Transactions of American Fisheries Society* 113 (2): 178-185.
- Bever, M. M. & Fekete, D. M. 2002. Atlas of the developing Inner Ear in Zebrafish. *Developmental Dynamics* 223: 536-543.
- Blaxter J.H.S, Hempel G. 1963. The influence of egg size on herring larvae (*Clupea harengus* L). *Journal du Conseil International pour l'Exploration de la Mer* 28: 210-240.
- Blaxter, J.H.S. 1986. Development of Sense Organs and Behaviour of Teleost Larvae with Special Reference to Feeding and Predator Avoidance. *Transactions of American Fisheries Society* 115: 98-114.
- Bleckmann, H. 1993. Role of the lateral line in fish behaviour. Pages 201-246 in: Pitcher, T.J. (ed) Behaviour of Teleost Fishes. 2^a edi. Chapman & Hall. London.
- Cestarolli, M.A. 2005. Larvicultura do pintado *Pseudoplatystoma coruscans* (Agassiz, 1829): Aspectos da alimentação inicial e do desenvolvimento de estruturas sensoriais. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Centro de Aqüicultura CAUNESP. 110p.

- Clavijo-Ayala, J.A., Vetorelli, M.P., Portella, M.C. 2006. Desenvolvimento inicial e caracteres de identificação de larvas vitelinas de Pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). CIVA 2006: 819-828. (<http://www.civa2006.org>).
- Easter, S.S.Jr. & Nicola, G.N. 1996. The Development of Vision in the Zebrafish (*Danio rerio*). *Developmental Biology* 180: 646-663.
- Fishelson, L. 2005. Histogenesis of the oropharyngeal cavity taste buds and the relevant nerves and brain centers in substrate-brooding and mouth-brooding cichlid fish (Cichlidae, Teleostei). *Anat Embryology* 209: 179-192.
- Ghysen, A. & Dambly-Chaudière, C. 2006. Development of the zebrafish lateral line. *Current Opinion in Neurobiology* 14: 67-73.
- Ghysen, A. & Dambly-Chaudière, C. 2007. The lateral line microcosmos. *Genes & Development* 21: 2118-2130.
- Haddon, C. & Lewis, J. 1996. Early Ear Development in the Embryo of the Zebrafish, *Danio rerio*. *The Journal of Comparative Neurology* 365: 113-128.
- Hansen, A. & Zielinski, B.S. 2005. Diversity in the olfactory epithelium of bony fishes: Development, lamellar arrangement, sensory neuron cell types and transduction components. *Journal of Neurocytology* 34: 183-208.
- Hansen, A., Reutter, K., Zeiske, E. 2002. Taste Bud Development in the Zebrafish, *Danio rerio*. *Developmental Dynamics* 223: 483-496.
- Hara, T.J. & Zielinsky, B. 1989. Structural and Functional Development of the Olfactory Organ in Teleosts. *Transactions of the American Fisheries Society* 118: 183-194.
- Hara, T.J. 1993. Role of olfaction in fish behaviour. *Pages* 171-199 *in*: Pitcher, T.J. (ed) *Behaviour of Teleost Fishes*. 2^a edi. Chapman & Hall. London.
- Hawkins, A.D. 1993. Underwater sound and fish behaviour. *Pages* 129-169 *in*: Pitcher, T.J. (ed) *Behaviour of Teleost Fishes*. 2^a edi. Chapman & Hall. London.

- Iwai, T. 1980. Sensory anatomy and feeding of fish larvae. *Pages* 124-145 *in*: J.E. Bardach *et al*, (eds) Fish behaviour and its use in the capture and culture of fishes. *International Center for Living Aquatic Resources Management*, Manila.
- Johnston, I.A., L.A. Vera, L. Vieira, M. Abercromby. 1995. Temperature and myogenesis in embryos of the atlantic herring *Clupea harengus*. *Journal of Experimental Biology* 198: 1389–1403.
- Junqueira, L.C. & Carneiro, J. 2004. Histologia Básica. 10^a edi. Editora Guanabara Koogan S.A. 488p.
- Kasumyan, A.O. & Døving, K.B. 2003. Taste preferences in fishes. *Fish and Fisheries* 4: 289-347.
- Kawamura, G. & Washiyama, N. 1989. Ontogenetic changes in Behaviour and Sense Organ Morphogenesis in Largemouth Bass and *Tilapia nilotica*. *Transactions of the American Fisheries Society* 118: 203-213.
- Kawamura, G., Massuma, S., Tezuka, N., Koiso, M., Jinbo, T., Namba, K. 2003. Morphogenesis of the sense organs in bluefin tuna *Thunnus orientalis*. *Pages* 123-135 *in*: The Big Fish Bang. Proceedings of the 26th Annual Larval Conference, Bergen (Norway).
- Kendall, A.W.Jr, Ahlstrom, E.H., Moser, H.G. 1984. Early Life History Stages of Fishes and Their Characters. *Pages* 11-22 *in*: Moser, H.G., Richards, W.J., Cohen, D.M., Fahay, M.P., Kendall, A.W.Jr., Richardson, S.L. (editors) Ontogeny and systematics of fishes. *American Society of Ichthyologists and Herpetologists*. Special Publication Number 1. Allen Press, Inc. Lawrence.
- Kotrschal, K. 1995. Ecomorphology of solitary chemosensory cell systems in fish: a review. *Environmental Biology of Fishes* 44: 143-155.
- Kotrschal, K. 1996. Solitary chemosensory cells: why do primary aquatic vertebrates need another taste system? *Trends Ecology Evolut* 11: 110-114.
- Kotrschal, K. 2000. Taste(s) and olfaction(s) in fish: a review of specialized sub-systems and central integration. *European Journal of Physiology* 439 (Suppl): R178-R180.

- Kotrschal, K., Krautgartner, W-D., Hansen, A. 1987. Ontogeny of the Solitary Chemosensory cells in Zebrafish, *Danio rerio*. *Chemical senses* 22: 111-118.
- Kotrschal, K., Royer, S., Kinnamon, J. C. 1988. High-Voltage Electron Microscopy and 3-D Reconstruction of Solitary Chemosensory Cells in the Anterior Dorsal Fin of the Gadid Fish *Ciliata mustela* (Teleostei). *Journal of Structural Biology* 124: 59- 69.
- Kunz, Y.W. 2007. Review of Development and Aging in the Eye of Teleost fish. *Neuroembryology and Aging* 4: 31-60.
- Liem, K.F., Bemis, W.E., Walker, Jr. W.F., Grande, L. 2001. Functional Anamoty of the Vertebrates. An Evolutionary Perspective. 3 edi. Thomson. Belmont .703p.
- Machado-Allison, A. 1990. Ecología de los peces de las áreas inundables de los Llanos de Venezuela. *Interciencia* 15(6): 411-423.
- Mago-Leccia, F. 1970. Estudios preliminares sobre la ecología de los peces de los Llanos de Venezuela. *Acta Biológica Venezuelica* 7(1): 71-102.
- Mana, R.R. & Kawamura, G. 2002. A comparative study on morphological differences in the olfactory system of red sea bream (*Pagrus major*) and black sea bream (*Acanthopagrus schelegeli*) from wild and cultures stocks. *Aquaculture* 209: 285-306.
- Matsuoka, M. 2001. Development of the sense organs in the Japanase sardine *Sardinops melanostictus*. *Fisheries science* 67: 1036-1045.
- Moyle, P.B. 2004. Sensory perception. *Pages* 167-196 *in*: Moyle, P.B., Cech, J.J. (eds.) *Fishes: an introduction to ichthyology*. 5th ed. Prentice Hall. Upper Saddle River.
- Nakatani, K., Agostinho, A.A., Baumgartner, G., Bialetzki, A., Sanches, P.V., Makrakis, M.C. 2001. Ovos e larvas de peixes de água doce. Desenvolvimento e manual de identificação. Editora da Universidade Estadual de Maringá. Maringa 365p.
- Nelson, J.S. 2006. *Fishes of the World*. 4 edi. John Wiley & Sons, Inv. New Jersey. 601p.

- Neumann, E. 2008. Desenvolvimento de jatuarana, *Brycon amazonicus* (Teleostei, Characidae). Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Centro de Aqüicultura CAUNESP. 108 p.
- Nicolson, T. 2005. The genetics of hearing and balance in Zebrafish. *Annual Review of Genetics* 39: 9-22.
- Noakes, D.L.G. & Godin, J.J. 1988. Ontogeny of behaviour and concurrent developmental changes in sensory systems in teleost fishes. *Pages* 345-394 *in*: Hoar, W.S. & Randall, D.J. (eds) Fish physiology Vol XI B. Academic Press, Inc. London.
- Northcutt, G. 2005. Taste Bud Development in the Channel Catfish. *The Journal of Comparative Neurology* 482: 1-16.
- Otsuka, M. 2003. Neuromast formation in the prehatching embryos of the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Acta Zoologica (Stockholm)* 84: 99-106.
- Pinto, M.M.G. & Castagnolli, N. 1984. Desenvolvimento inicial do pacu *Colossoma mitrei* (BERG, 1895). *Páginas* 523-535 *em*: Anais III Simposio Brasileiro de Aqüicultura. São Carlos –SP.
- Pitcher, T.J. (ed). 1993. Behaviour of Teleost Fishes. 2^a edi. Chapman & Hall. London. 480p.
- Pitcher, T.J., Partridge, B.L., Wardle, C.S. 1976. A blind fish can school. *Science*, 194: 963-965.
- Shardo, J.D. 1996. Radial Polarity of the First Neuromast in Embryonic American Shad, *Alosa sapidissima* (Teleostei: Clupeomorpha). *Copeia* 1: 226-228.
- Reutter, K. & Witt, M. 2004. Are there efferent synapses in fish taste buds? *Journal of Neurocytology* 33: 647-656.
- Ribeiro, C.R., Leme dos Santos, H.S., Bolzan, A.A. 1995. Estudo comparativo da embriogênese de peixes ósseos (Pacu, *Piaractus mesopotamicus*; Tambaqui, *Colossoma macropomum*, e híbrido Tambacu). *Revista Brasileira de Biologia* 55(Supl. 1): 65-78.

- Romagosa, E., Paiva, P.de., Godinho, H.M., Storfer, E.B. 1988. Desenvolvimento dos ovócitos de *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg,1887) (=Colossoma mitrei Berg,1895) em condições de cultivo intensivo. *Ciência e Cultura* 40 (1): 60-64.
- Soules, K.A. & Link, B.A. 2005. Morphogenesis of the anterior segment in the zebrafish eye. *BMC Developmental Biology* 5 (12): 1-16.
- Tanaka, Y., Mukai, Y., Takji, K., Kumai, H. 1991. Chemoreception and vertical movement in planktonic yolk-sac larvae of red sea bream *Pagrus major*. *Journal of Applied Ichthyology*, 7: 129-135.
- Tavolga, W.N. 1917. Sound production and detection *Pages* 135-205 *in*: Hoar, W.S. & Randall, D.J. (eds) *Fish physiology* Vol V. Academic Press, Inc. London.
- Tesser, M.B. & Portella, M.C. 2006. Ingestão de ração e comportamento de larvas de pacu em resposta a estímulos químicos e visuais. *Revista Brasileira de Zootecnia* 35 (5): 1887-1892.
- Uyan, S., Kawamura, G., Vazquez-Archdale, M. 2006. Morphology of the sense organs of anchovy *Engraulis japonicus*. *Fisheries science* 72: 540-545.
- Whitfield, T.T., Riley, B.B., Chiang, M.Y., Phillips, B. 2002. Development of the zebrafish inner ear. *Developmental Dynamics* 223: 427–458.
- Webb, J.F. & Shirey, J.E. 2003. Postembryonic Development of the Cranial Lateral Line Canals and Neuromasts in Zebrafish. *Developmental Dynamics* 228: 370-385.
- Yamanaka, N. 1988. Descrição, desenvolvimento e alimentação de larvas de pré-juvenis do pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) (Teleostei, Characidae), mantidos em confinamento. (Tese de Doutorado –Inst. Bioc. USP). 125p.
- Żuwała, K., Kato, S., Jakubowski, M. 2002. Two generations of the tongue and gustatory organs in the development of *Hynobius dunni* Tago. *Journal of Anatomy* 201: 91-97.
