

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL
PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

OSTEOGÊNESE, VITAMINA A E ANOMALIAS
ESQUELÉTICAS EM LARVAS DE PACU, *Piaractus*
mesopotamicus

Taís da Silva Lopes
Zootecnista, Msc. em Aquicultura

Jaboticabal, São Paulo
Março de 2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL
PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**OSTEOGÊNESE, VITAMINA A E ANOMALIAS
ESQUELÉTICAS EM LARVAS DE PACU, *Piaractus
mesopotamicus***

Taís da Silva Lopes

Orientadora: Dra. Maria Célia Portella

**Co-orientadora: Dra. Rosangela K.
Jomori**

**Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias –
Unesp, Campus de Jaboticabal, como
parte das exigências para a obtenção
do título de Doutor em Zootecnia
(Produção Animal)**

Jaboticabal, São Paulo

Março de 2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: OSTEOGÊNESE, VITAMINA A E ANOMALIAS ESQUELÉTICAS EM LARVAS DE PACU, *Piaractus mesopotamicus*

AUTORA: TAÍS DA SILVA LOPES

ORIENTADORA: Profa. Dra. MARIA CÉLIA PORTELLA

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. ROSANGELA KIYOKO JOMORI BONICHELLI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MARIA CÉLIA PORTELLA
Departamento de Biologia Aplicada À Agropecuária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. LIZANDRA AMOROSO
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. MARGARIDA MARIA BARROS
Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu

Prof. Dr. LUIS ANDRE NASSR DE SAMPAIO
Universidade Federal do Rio Grande / Rio Grande/RS

Prof. Dr. RODRIGO TAKATA
Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro / Cordeiro/RJ

Data da realização: 17 de fevereiro de 2014.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Taís da Silva Lopes, graduou-se em Zootecnia pela Universidade Estadual de Maringá (2007) e fez Mestrado em Aquicultura (2010) pelo Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista. Foi bolsista do Programa de Educação Tutorial (CAPES/CESu), por três anos, durante a graduação e, no mestrado, foi bolsista CNPq. Atualmente, é aluna de doutorado em Produção Animal pela Universidade Estadual Paulista, e recebe suporte financeiro da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Área de especialização: Reprodução, nutrição, vitaminas, e larvicultura de peixes.

EPÍGRAFE

Vale a pena a tentativa e não o receio,
Vale a pena confiar e nunca ter medo,
Vale a pena encarar e não fugir da realidade,
Ainda que eu fracasse vale a pena lutar,
Vale a pena discordar do melhor amigo e não apoiá-lo em suas atitudes erradas,
vale a pena corrigi-lo,
Vale a pena encarar-se no espelho e ver que está errado, vale a pena ser o que for!
Vale a pena viver...

DEDICO

A família, que Deus criou com toda sua sabedoria, sem a qual nada existiria...

A família (pai: José Claro; mãe: Dorotí e; irmão: Cadu) que cria, instrui e forma para a vida, com todo amor e carinho...

A família (amigos) que cruzam a nossa vida e fazem o dia-a-dia mais feliz...

A família (companheiro: Thiago e; filhos: Alice) que formamos durante o caminho da vida... que dá forças para continuar caminhando e querer realizar novas conquistas a cada dia!

Enfim, dedico a todos vocês, minha FAMÍLIA.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade da vida,

Aos meus pais e irmão que sempre acreditaram nesta luta,

Ao meu companheiro, Thiago, que me apoiou, incentivou e ajudou durante toda esta caminhada,

Aos orientadores/professores/formadores que passaram por minha vida acadêmica, em especial à Profa Dra Maria Célia Portella e Dra Rosangela Jomori,

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

Aos amigos da Rep. Gaiola dos loucos e agregados, pelo dia-a-dia, tenham sido eles fáceis ou difíceis,

Aos colegas de trabalho (Natália de Jesus Leitão, Olívia Menossi (Taxinha), Thiago Mendes de Freitas (Nojento), Juliana Tomomi Kojima, Thyssia Bonfin Silva, Raphael Serafine, Caroline Nebo, Hellen Buzolo, Thiago M. Torres do Nascimento (Strumi), Ligia Neira, Bruna Lima Cabral, Lidiane Sandre, Jesaias Ismael Costa, Natalia de Jorge, Oscar Turmeque, Pablo Fuentes), sem eles não teria chegado até aqui,

A Estação de Hidrologia e Aquicultura da DUKE Energy Brasil, pela estrutura e material biológico concedido, em especial ao Técnico Biólogo Edmilson Antônio Pelisari,

Ao Laboratório de Biologia do Músculo Estriado, UNESP, Botucatu-SP, em especial à Profa Dra Maeli Dal Pai por abrir as portas de seu laboratório, e a Dra Fernanda Carani, por todo o tempo dedicado, ensinamento, paciência, compreensão, companheirismo, amizade, hospitalidade... Enfim, Fer, o quanto você me ajudou não cabe em MUITO OBRIGADA!

A todos que, direta ou indiretamente tiveram participação nestes quatro longos anos de doutorado...

E por último, a minha filha Alice, que, nesta reta final, chegou para me dar ainda mais força e vontade de vencer.

SUMARIO

CAPÍTULO 1- Considerações Gerais.....	1
1. Introdução geral.....	1
2. Revisão de Literatura	4
2.1. Espécie escolhida.....	4
2.2. Desenvolvimento larval de peixes neotropicais	5
2.2.1. Desenvolvimento esquelético	6
2.3. Nutrição endógena e exógena de larvas de peixes	12
2.3.1. Vitaminas para larvas de peixes	13
2.3.2. Vitamina A	15
2.4. Metabolismo ósseo: expressão gênica.....	17
2.5. Vitamina A <i>versus</i> osteogênese: isótopos estáveis como ferramenta	18
3. Objetivos.....	20
4. Referência Bibliográfica.....	20
CAPÍTULO 2- Skeletal development of pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>) larvae - Journal of Fish Biology (ISSN: 1095-8649), vol. 45, p. 15-26, February, 2014.....	30
CAPÍTULO 3 - Skeletal anomalies of pacu, <i>Piaractus mesopotamicus</i> , larvae from a wild-caught broodstock.....	50
CAPÍTULO 4- Anomalias esqueléticas em larvas de pacu provenientes de estoque de reprodutores formados em cativeiro.....	73
1. Introdução	73
2. Material e métodos.....	75
3. Resultados	77
4. Discussão.....	84
5. Referência bibliográfica.....	87
CAPÍTULO 5- Vitamina A e <i>turnover</i> do isótopo estável de carbono $\delta^{13}\text{C}$ em larvas de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>)	92
1. Introdução	93
2. Material e métodos.....	95
2.1. Análises preliminares.....	95
2.2. Obtenção das larvas e tratamentos experimentais	97
2.3. Análises de desempenho.....	98

2.4. Análises esqueléticas	98
2.5. Análises isotópicas	99
3. Resultados	101
3.1. Desempenho	101
3.2. Análises esqueléticas	102
3.3. <i>Turnover</i> do $\delta^{13}\text{C}$	102
4. Discussão.....	105
5. Referência Bibliográfica	109
CAPÍTULO 6- Efeito da vitamina A na incidência de anormalidades esqueléticas em larvas de pacu	
1. Introdução	115
2. Material e métodos.....	117
2.1. Obtenção das larvas e tratamentos	117
2.2. Desempenho zootécnico	121
2.3. Anomalias esqueléticas	121
2.4. Análise molecular.....	122
2.5. Análise estatística.....	126
3. Resultados	126
3.1. Desempenho zootécnico	126
3.2. Anomalias esqueléticas	129
3.4. Análises moleculares	136
4. Discussão	136
5. Referência bibliográfica	142
CONCLUSÕES GERAIS.....	147

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA PARA USO DE ANIMAIS



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



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 008004/11 do trabalho de pesquisa intitulado "Deformidades esqueléticas em larvas de pacu, *Piaractus mesopotamicus*", sob a responsabilidade da Pro^a Dr^a Maria Célia Portella, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 12 de Maio de 2011.

Jaboticabal, 13 de Maio de 2011.


Prof. Dr. Jeffrey Frederico Lui
Presidente - CEUA


Med. Vet. Maria Alice de Campos
Secretária - CEUA

OSTEOGÊNESE, VITAMINA A E ANOMALIAS ESQUELÉTICAS EM LARVAR DE PACU *Piaractus mesopotamicus*

RESUMO

Estudos sobre anomalias esqueléticas em larvas e juvenis têm sido desenvolvidos em várias espécies de peixes produzidas comercialmente. Isso porque o desenvolvimento ósseo anormal pode promover o aumento do custo de produção devido à diminuição da sobrevivência, efeitos negativos no crescimento, pior conversão alimentar, além do aumento da susceptibilidade à doenças. Os fatores causadores de anormalidades esqueléticas em larvas e juvenis de peixes são, principalmente, fatores nutricionais, ambientais e de origem genética. Porém, nada se sabe sobre esse assunto em espécies sul-americanas, como o pacu. Desta forma, o objetivo desta pesquisa foi descrever o desenvolvimento ósseo do pacu; avaliar a incidência de anomalias esqueléticas durante o desenvolvimento larval; verificar o papel da vitamina A na má formação esquelética e a expressão gênica envolvida nesse processo; e conhecer o turnover isotópico (^{13}C) do tecido ósseo e muscular pela influência da vitamina A, com a utilização da técnica de isótopos estáveis.

PALAVRAS-CHAVE: Esqueletogênese, anomalias esqueléticas, vitamina A, isótopos estáveis, peixes de água doce.

OSTEOGENESIS, VITAMIN A AND SKELETAL ANOMALIES IN PACU *Piaractus mesopotamicus* LARVAE

ABSTRACT

Studies on skeletal anomalies in larvae and juveniles have been developed for several fish species commercially produced. The reason is because these anomalies cause many problems to aquaculture, such as increased production costs due to decreased survival, adverse effects on growth, decreased feed conversion, and increased susceptibility to diseases. The factors that determine the incidence of skeletal anomalies in fish larvae and juveniles are mainly nutritional, environmental and genetic. However, nothing is known about this subject in South American species, such as the pacu. Therefore, we aimed to describe the bone development of pacu; to evaluate the incidence of skeletal anomalies during larval development; to study the role of vitamin A in skeletal formation and the gene expression involved in this process, and to understand the turnover of vitamin A in bone and muscle tissues with the use of stable isotopes technique.

KEYWORDS: skeletogenesis, skeletal anomalies, vitamin A, stable isotopes, freshwater fish.

CAPÍTULO 1- Considerações Gerais

1. Introdução geral

O pacu, *Piaractus mesopotamicus*, é uma das espécies nativas mais utilizadas para a aquicultura, tanto pela facilidade no manejo e boa taxa de crescimento, como pela aceitação no mercado consumidor (Urbinati e Gonçalves, 2010). Atualmente, é a terceira espécie nativa mais produzida no Brasil, representando 21.689 ton. em 2011, precedida pelo tambaqui (*Colossoma macropomum*) e de seu híbrido tambacu (*C. macropomum* x *P. mesopotamicus*) (MPA, 2013). Entretanto, com o crescimento da piscicultura como atividade econômica no Brasil, a demanda por larvas e juvenis de peixes tem sido cada vez maior, evidenciando a necessidade de implantar tecnologia de produção que garanta maior disponibilidade de juvenis (Queiroz et al., 2005), e que esses sejam de boa qualidade para o sucesso das etapas subsequentes.

As larvas de peixes passam por grandes alterações funcionais e morfológicas nas fases de desenvolvimento. O desenvolvimento normal e, conseqüentemente, a qualidade das larvas, pode ser afetado por vários fatores, determinando inclusive à baixa porcentagem de sobrevivência na fase de larvicultura (Koumoudouros et al., 2001; Cahu et al., 2003; Gjerde et al., 2005; Sfakianakis et al., 2006; Lall e Lewis-MacCrea, 2007; Karahan et al., 2012; Owen et al., 2012). Além disso, a qualidade das larvas, que também está diretamente relacionada com a qualidade dos reprodutores, vem sendo considerada limitante na produção de peixes. Por isso, estudos relacionados à importância dos reprodutores na qualidade das larvas vem sendo desenvolvidos para várias espécies (*Anguilla japonica*, Furuita et al. 2003; *Scophthalmus maximus* L., Kjørsvik et al., 2003; *Centropomus undecimalis*, Yanes-Rocca et al. 2009; *Polyprion oxygeneios*, Rohn & Symonds, 2012), inclusive comparando larvas obtidas de reprodutores selvagens e de estoque de reprodutores proveniente de piscicultura, quanto à incidência de anomalias esqueléticas (*Gadus morhua* L., Lanes et al., 2012).

Deformidades e anomalias esqueléticas causam sérios problemas econômicos na aquicultura, aumentando o custo de produção, por diminuir a sobrevivência na larvicultura e, posteriormente, por reduzir o valor comercial de

indivíduos deformados. Além disso, prejudicam o crescimento, a conversão alimentar e aumentam a susceptibilidade a doenças (Boglione et al., 2001, 2009). Os fatores responsáveis pela alta incidência de anomalias são, especialmente, a nutrição, as condições ambientais, e a endogamia (Cahu et al., 2003, Gjerde et al., 2005, Sfakianakis et al., 2006). Em *Sparus aurata*, foi demonstrado que somente uma fração pequena de larvas afetadas por anomalias esqueléticas sobreviveu depois de completar o desenvolvimento larval (Andrades et al., 1996). Várias outras anormalidades ósseas foram listadas em larvas de peixes (Boglione et al., 2003; 2009). Recentemente, devido à grande incidência de anormalidades esqueléticas em larvas de peixes marinhos criadas intensivamente, Russo et al. (2010) desenvolveram o software SOMs (Self-Organized Maps) para avaliar a presença de anormalidades esqueléticas de acordo com os parâmetros de criação, em larvas de *Sparus aurata*.

Muitos estudos sobre o impacto da alimentação inicial no desenvolvimento dos peixes mostram que determinados nutrientes (fosfolipídios, vitaminas e proteínas) têm papel central no aparecimento de anomalias esqueléticas, pois nem sempre são corretamente oferecidos nas dietas durante a fase larval (Cahu et al., 2003), quando muitas estruturas esqueléticas estão se formando ou diferenciando. Entre os nutrientes necessários está a vitamina A que, por meio do ácido retinóico (metabólito dietético), regula a esqueletogênese e o desenvolvimento da cartilagem pelo controle das funções dos condrócitos, maturação e proliferação das células (osteoblastos e osteoclastos) (Lall e Lewis-McCrea, 2007).

O papel da vitamina A na anomalia esquelética de larvas de peixes criadas intensivamente tem sido estudado há alguns anos (Takeuchi et al., 1995, 1998, Haga et al., 2002, 2003). Estes autores, alimentando larvas de *Paralichthys olivaceus* com organismos vivos enriquecidos com altas doses de vitamina A, mostraram redução de ocorrência de pigmentação anormal nos peixes, porém, indesejavelmente, resultou em aumento de anomalias ósseas. A maior parte dos estudos baseia-se em experimentos tipo dose-resposta e, atualmente tem-se explorado cada vez mais o controle molecular dos processos envolvidos nas anormalidades esqueléticas em peixes, como visto nas revisões de Fernandez e Gisbert (2011) e Haga et al. (2011), que exploraram os efeitos da vitamina A na

osteogênese e anomalias esqueléticas. Ainda, o estudo do metabolismo associado com a morfogênese, em *Solea senegalensis*, indica que a vitamina A, em larvas de peixes, é absorvida pelos enterócitos, transportada para o fígado e entregue aos tecidos alvo, como os ossos (Darias et al., 2012). Os mecanismos moleculares envolvidos em cada etapa deste metabolismo também foram investigados por estes autores.

A assimilação e incorporação dos nutrientes, por sua vez, não ocorrem da mesma forma em cada parte dos animais. Estudos indicam relativa escala de tempo para cada tecido, sendo a diferenciação mais lenta em ossos, comparadas com o fígado (Gaston e Suthers, 2004) e músculo. Assim, é possível utilizar o conhecimento do *turnover* nos ossos, para identificar futuramente fatores nutricionais que influenciam a formação óssea, e que causam anomalias esqueléticas em peixes. Por exemplo, os retinóides reduzem a síntese de colágeno e formação óssea, o que acelera o *turnover* ósseo, causando mineralização precoce (Lall e Lewis-McCrea, 2007). Essa indicação reforça a ideia de que a falta ou o excesso de vitamina A, na dieta, podem resultar em anomalias esqueléticas durante o desenvolvimento larval de peixes. Alimentos com diferentes assinaturas isotópicas ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) podem ser utilizados para compor dietas com assinaturas isotópicas distintas do tecido inicial do animal, e assim medir taxas de *turnover* em todo o corpo, isso porque a composição isotópica dos tecidos e fluidos de animais depende principalmente da sua alimentação (Caldara et al., 2007, 2008).

Estudos sobre anomalias esqueléticas em larvas e juvenis têm sido desenvolvidos para várias espécies de peixes produzidas comercialmente, como *Pagellus bogaraveo*, *Gymnocranius euanus* e *Seriola dumerilli* (Kitajima et al., 1994), *Sparus auratus* (Andrades et al., 1996; Koumoundouros et al., 1997; Faustino e Power, 1998; Boglione et al., 2001), *Myoxocephalus quadricornis* (Bengtsson et al., 1998), *Paralichthys olivaceus* (Takeuchiet al., 1995, 1998, Takeuchi, 2001, Haga et al., 2002, 2003), *Latris lineata* (Cobcroft et al., 2001, 2009), *Solea senegalensis* (Gavaia et al., 2002), *Epinephelus marginatus* (Boglione et al., 2009), *Dicentrarchus labrax* (Sfakianakis et al., 2006; Mazurais et al., 2009; Darias et al., 2010a, b). Porém, os primeiros estudos sobre desenvolvimento e anomalias esqueléticas de

larvas de peixes sul-americanos (neotropicais) estão sendo desenvolvidos no âmbito do presente estudo.

2. Revisão de Literatura

2.1. Espécie escolhida

O teleósteo *Piaractus mesopotamicus*, popularmente denominado como pacu, caranha, pacu-caranha ou pacu-guaçu, pertence à família Serrassalmidae, ordem Characiformes, superordem Ostariophysi, da subdivisão dos Otophysi, os quais compõem aproximadamente 27% de todas as espécies de peixes e 75% dos peixes de água doce (Fuiman 1984; Bird e Mabee 2003). É originário da bacia dos rios Paraná, Paraguai e Uruguai (Godoy, 1975). É a terceira espécie nativa mais cultivada no Brasil desde 2008, e sua produção aumentou no último censo, passando de 15.190 t em 2008, para 21.689 t em 2011. Considerando a produção de seu híbrido, o tambacu (tambaqui X pacu, 49.818t), perfazem 13,1% do total de peixe produzido no país, precedido pelo tambaqui (111.084 t) (MPA, 2013). Essa produção significativa se deve às excelentes características zootécnicas que a espécie apresenta, como rusticidade, crescimento rápido, fecundidade elevada e grande aceitação no mercado (Castagnolli e Zuim, 1985; Castagnolli, 1992; Urbinati et al., 2010).

O hábito alimentar do pacu é onívoro, e na natureza sua alimentação sofre flutuações que dependem, além da disponibilidade de alimento, das variações ambientais e da migração reprodutiva (Silva, 1985; Menton, 1989).

A reprodução da espécie é realizada por indução hormonal, utilizando, na maioria das vezes, extrato de pituitária de carpa, em quantidades de 5,5 mg/kg de peso vivo para fêmeas, em duas doses com intervalo de 12 horas, e de 1 mg/kg de peso vivo para os machos, coincidindo com a segunda dose da fêmea. A extrusão dos gametas é realizada após 275 horas grau, a fertilização dos ovócitos é realizada a seco, com posterior hidratação, lavagem e incubação dos ovos. O desenvolvimento embrionário se completa em 18 a 22 horas, de acordo com a temperatura da água (22 a 28°C, respectivamente), com taxas de fertilização e eclosão que variam de 60-98% e 60-95%, respectivamente (Urbinati et al., 2010).

As larvas eclodem parcialmente desenvolvidas, com cavidade oral e ânus ainda não totalmente formados, e utilizam o vitelo como alimento endógeno. Cerca de 60 horas após a eclosão, apresentam absorção parcial do saco vitelínico e abertura bucal, quando começam a buscar o alimento exógeno. Com 4 a 6 dias após a eclosão as larvas estão aptas a receber exclusivamente alimento exógeno, constituído por organismos vivos do plâncton (Jomori et al., 2003). A alimentação de larvas é fator crítico nesta fase, sendo que o alimento vivo é fundamental para proporcionar desenvolvimento normal, resultando em melhor desempenho e sobrevivência, em relação ao alimento formulado (Jomori et al., 2003; Tesser et al., 2006; Leitão et al., 2011; Menossi et al., 2012).

Após abertura da cavidade oral, o manejo mais utilizado em pisciculturas é transferir as larvas para viveiros escavados fertilizados, que disponibilizam alimento natural (plâncton selvagem). Esse sistema de criação semi-intensivo geralmente resulta em bom desempenho de crescimento, porém em baixas taxas de sobrevivência (Jomori et al., 2003). Em sistema alternativo de criação (intensivo), as larvas são mantidas em laboratório, em densidades que variam de 10 a 20 larvas/L, com manejo alimentar baseado em náuplios de artêmia como alimento vivo, em níveis gradativos diários de 500 a 1500 náuplios/larva, na frequência de quatro a seis vezes ao dia (Jomori, 2001). O início da substituição do alimento vivo pelo alimento formulado é recomendada entre 12 e 21 dias após início da alimentação exógena, desde que as larvas apresentem peso superior a 13 mg de peso úmido (Jomori et al., 2008). Nesta fase, a larva atinge desenvolvimento do trato digestório suficiente para aproveitar os nutrientes disponíveis da dieta formulada (Jomori, 2005; Menossi et al., 2012). Essa fase de substituição do alimento é realizada de forma gradativa, diminuindo o número diário de náuplios/larva nas proporções 75%, 50% e 25% em relação a quantidade até então disponibilizada, passando-se a oferecer ração a vontade, durante seis dias, a partir daí é realizada a retirada total do alimento vivo (Jomori et al., 2008; Tesser e Portella, 2006).

2.2. Desenvolvimento larval de peixes neotropicais

Larvas de peixes sofrem profundas alterações funcionais e morfológicas durante suas fases iniciais de desenvolvimento (Portella e Dabrowski, 2008). Vários

fatores podem interferir no desenvolvimento normal e afetar a sua qualidade, fazendo com que uma baixa porcentagem de larvas chegue até os estágios juvenil e adulto (Koumoudouros et al. 2001, Sfakianakis et al. 2006, Owen et al. 2012, Cahu et al. 2003, Lall e Lewis-MacCrea 2007, Gjerde et al. 2005, Karahan et al. 2012).

A ontogenia das larvas vem sendo estudada em diferentes espécies de peixes, principalmente nos sistemas digestório e sensorial, que estão relacionados com a alimentação e nutrição durante o desenvolvimento inicial, bem como a do aparelho locomotor (muscular e esquelético), representado pelo desenvolvimento de fibras musculares, que ocorre simultaneamente à esqueletogênese, e que irão refletir no crescimento dos peixes (Leitão et al., 2011; Takata, 2011). O desenvolvimento do sistema ósseo, por sua vez, também possui papel importante na alimentação das larvas, pois o fortalecimento das estruturas que constituem a mandíbula e a cauda é fundamental para garantir habilidade predatória e poder de natação para apreensão do alimento e fuga de predadores (Portella et al., 2012).

O desenvolvimento de algumas estruturas esqueléticas de pacu foi registrado por Yamanaka (1988), que constatou ossificação mais precoce exatamente das estruturas mandibulares e do complexo caudal. Neste contexto, a ocorrência de anomalias esqueléticas na mandíbula, cauda e coluna vertebral podem causar sérios problemas econômicos, aumentando o custo de produção, diminuindo a sobrevivência na larvicultura e depreciando os juvenis deformados. Além disso, acarretam em efeitos negativos ao crescimento, conversão alimentar, bem como aumentam a susceptibilidade a doenças (Bogliione et al., 2001). Altas frequências de anomalias têm sido verificadas na produção de juvenis de peixes marinhos, causadas principalmente por fatores nutricionais, ambientais e de origem genética (Cahu et al. 2003, Sfakianakis et al. 2006, Gjerde et al. 2005). Porém, pouco se sabe sobre os tipos de anomalias esqueléticas que ocorrem em peixes de água doce, em especial, espécies sul-americanas, assim como suas consequências.

2.2.1. Desenvolvimento esquelético

A osteogênese ou desenvolvimento ósseo (processo de ossificação) dos peixes é um dos eventos mais importantes durante o desenvolvimento larval, principalmente devido as funções de proteção aos órgãos internos e de formação

estrutural do corpo (Estêvão et al. 2011). Importante também pela possibilidade de se entender como os processos vitais ocorrem, por exemplo os da alimentação, natação e respiração, uma vez que os mecanismos de funcionamento destes processos dependem e se correlacionam com as estruturas de suporte, como os ossos da mandíbula, nadadeiras e brânquias, respectivamente (Osse e van den Boogaart, 1999; 2004). Além disso, o desenvolvimento ósseo auxilia na classificação de peixes, em metodologias que se baseiam na osteologia e na paleontologia para identificar o hábito alimentar das espécies (Helfman et al., 1997).

Com isso, têm sido desenvolvidas técnicas que favoreçam a identificação de estruturas ósseas, e a compreensão da formação e do desenvolvimento esquelético. A técnica de coloração de ossos com vermelho de alizarina e da cartilagem com azul de alcian é relativamente antiga (Dingerkus e Uhler, 1977; Potthoff, 1984; Taylor & van Dyke, 1985), mas vem sendo adaptada para diversas espécies (Darias et al., 2010a) e muito utilizada desde então no estudo de desenvolvimento esquelético de peixes (Cubbage e Mabee, 1996; Grandel e Schulte-Merker, 1998; Wagemans et al., 1998; Faustino e Power, 1998, 1999, 2001; Koumoundouros et al., 2001; Gavaia et al., 2002; Strecker et al., 2013). Nos últimos cinco anos, a técnica de coloração óssea também tem sido utilizada como ferramenta para avaliar o efeito nutricional na qualidade do esqueleto de peixes, no período larval (Fernandez et al., 2009; Fernandez e Gisbert, 2010; 2011; Mazurais et al. 2009; Darias et al., 2010a, 2011, 2012; Haga et al., 2011; Boglino et al., 2012).

De forma geral, o desenvolvimento esquelético é estudado por meio de avaliações morfométricas e merísticas. Mas, outras metodologias têm sido empregadas por exemplo a análise molecular. A expressão de genes como a osteocalcina, uma proteína presente de forma abundante na matriz extracelular de tecidos ósseos, pode ser utilizada como marcador na formação e remodelação óssea de vertebrados (Gavaia et al., 2006; Darias et al., 2010a). Ainda, outras ferramentas podem ser utilizadas para estudar diferentes aspectos do tecido ósseo, como a microscopia eletrônica de varredura para porosidade, densitometria óssea para o teor de cinzas (minerais), por exemplo.

Outra técnica que pode auxiliar os estudos de desenvolvimento esquelético é o raio-x (Koumoundouros, et al. 2000); porém, com maiores limitações devido as

dificuldades de visualizar detalhadamente estruturas ósseas quando os exemplares são muito pequenos, como nos estágios iniciais do desenvolvimento. Entretanto, esta técnica tem sido aprimorada para tomografia microcomputadorizada visando melhorar a qualidade das imagens (Epple e Neues, 2010).

Além de estudar as etapas de formação, conhecer as características das estruturas ósseas dos peixes é de extrema importância para entender o processo de osteogênese como um todo, uma vez que o grau de mineralização da matriz óssea é variável, dependente do tipo histológico do osso (celular ou acelular) e do ambiente aquático em que os peixes habitam (água doce ou marinho). A maioria dos teleósteos, incluindo os ostariophisios, possui ossos acelulares com poucos osteócitos (Estêvão et al. 2011), e sua formação pode ocorrer por dois mecanismos distintos: ossificação a partir de um molde de cartilagem ou pelo pericôndrio circundante à cartilagem (osso endocondral ou pericondral); ou diretamente da condensação mesenquimal, por calcificação intra-membranosa (osso dermal) (Bird e Mabee, 2003).

Os ostariophisios possuem características em comum, como a presença do aparelho de Weber. Além de possuir tal estrutura, acredita-se que o pacu apresente as mesmas características ósseas dos ostariophisios, como, por exemplo osso acelular, permitindo, assim a utilização de espécies desta super-ordem como referência para comparações nas descrições do processo de ossificação do pacu.

A osteogênese é uma das etapas do desenvolvimento ontogenético e sofre profundas transformações durante as fases iniciais da vida dos peixes, desde a cartilagem até a formação óssea (Faustino e Power, 1999). Para facilitar as descrições, utilizou-se, nesta tese, a seguinte divisão do esqueleto de peixes: craniofacial, axial (coluna vertebral associada às nadadeiras ímpares) e apendicular (demais nadadeiras) (Fiaz et al. 2012).

O crânio é parte do esqueleto craniofacial que protege o encéfalo e alguns órgãos do sentido. Em *Danio rerio* são descritos 74 ossos craniofaciais (Figura 1), que podem ser divididos em regiões: olfatória (etimóide, cinetímóide, etimóide lateral, pré-etimóide, supra-etimóide e vômer), orbital (frontal, infra-orbital, orbito-esfenoide, para-esfenóide, ptero-esfenóide, esclerótico anterior e posterior e supra-orbital), ótica (epioccipital, intercalar, parietal, pós-temporal, pro-ótico, pterótico,

esfenóide, supra-temporal), occipital (basioccipital, exoccipital, notocorda e supraoccipital), mandibular (anguloarticular, coronomeckelian, dentário, maxilar, pré-maxilar, retroarticular), palato (ectopterigóide, entopterigóide, matapterigóide, palatino, quadrado), hioide (basihial, raios branquiostegal, ceratohial, epihial, hiomandibular, hipohial dorsal e ventral, simpletico e uohial), branquial (basibranquial, ceratobranquial, epibranquial, hipobranquial, faringobranquial) e opercular (interopercular, opérculo, pré-opérculo e sub-opérculo). Em 29 desses ossos, a ossificação é do tipo dermal e em 43, do tipo cartilagem. O osso intercalar (região ótica) é o único com ossificação membranosa e a notocorda, aqui representada na região occipital, da lugar ao molde cartilaginoso que sofre ossificação pericondral (Cubbage e Mabee, 1996).

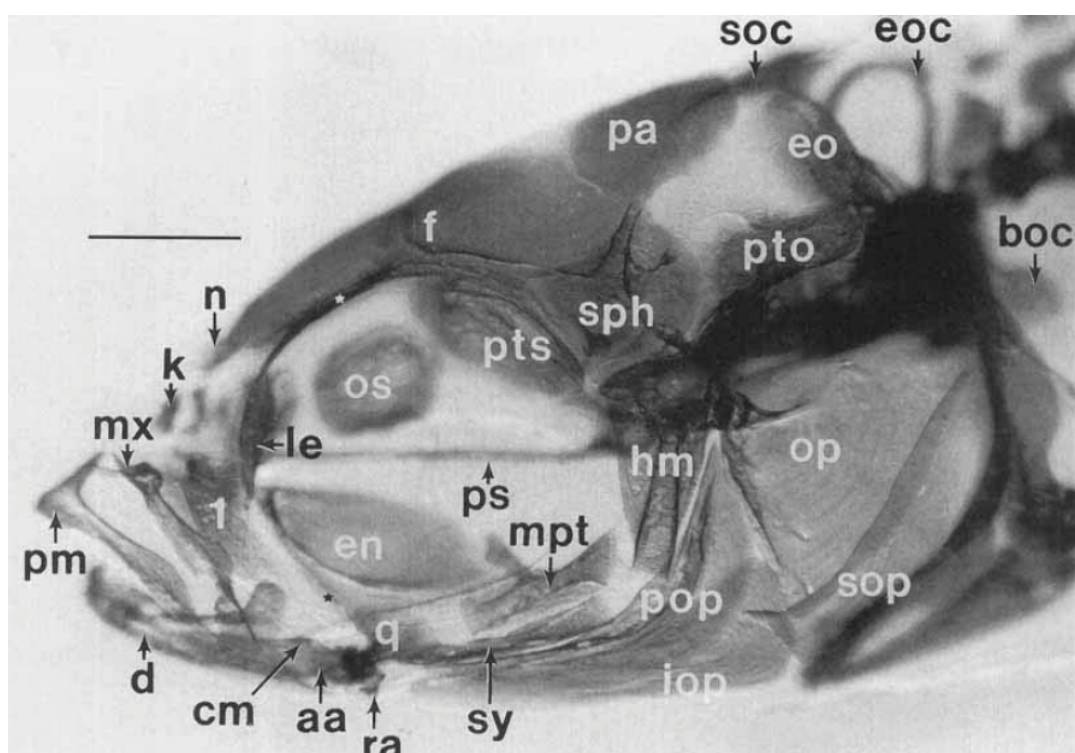


Figura 1. Ossos do esqueleto craniofacial de *Danio rerio*: (aa) anguloarticular; (boc) basioccipital; (cm) coronomeckelian (cartilagem de Meckel); (d) dentário; (en) entopterigóide; (eo) epioccipital; (eoc) exoccipital; (f) frontal; (hm), hiomandibular; (iop) interopercular; (*preto) ectopterigóide; (*branco) supra orbital; (1) infra orbital; (k) cinetmóide; (le) lateral etmóide; (mpt) matapterigóide; (mx) maxila; (n) nasal; (op)

opérculo; (os) orbitosfenóide; (pa) parietal; (pm) pré-maxila; (pop) pré-opercular; (ps) parasphenoide; (pto) pterótico; (pts) pterosphenoid; (q) quadrado; (ra) retroarticular; (soc) supraoccipital; (sop) suboperculo; (sph) esfenóide e; (sy) simplético (Cubbage e Mabee, 1996).

O esqueleto axial é derivado da mesoderme e inicialmente é sustentado por uma estrutura chamada notocorda (haste longitudinal simples), que sofre ossificação pericondral transformando-se na coluna vertebral. As vértebras são formadas a partir de blocos cartilagosos, sendo que geralmente há uma vértebra para cada segmento do corpo. A coluna vertebral é usualmente dividida em vértebras pré-caudais e caudais (Figura 2). As vértebras pré-caudais são compostas de vértebras centrais, arcos neurais, espinhas, parapófises e costelas, e as vértebras caudais possuem vértebras centrais, arcos e espinhas neurais, arcos e espinhas hemais. As vértebras mais posteriores são modificadas para sustentar a nadadeira caudal. A última vértebra pré-caudal e/ou primeira vértebra caudal é conhecida como vértebra transitória, exibindo arcos hemais alongados fundidos ou parapófises, costelas drasticamente reduzidas e ausência de uma espinha hemal (Bird e Mabee, 2003).

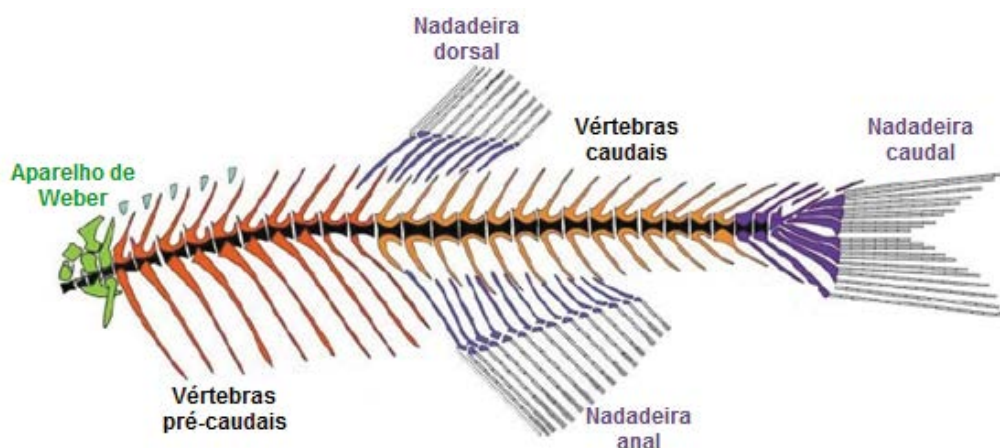


Figura 2. Esqueleto axial de *Danio rerio* (Bird and Mabee, 2003).

As vértebras sofrem ossificação sequencialmente, a partir da terceira e quarta vértebras, com o osso circundando a notocorda. As quatro primeiras vértebras permanecem fusionadas durante o desenvolvimento, podendo, em algumas

espécies, haver fusão da 2^a e 3^a vértebras, para desenvolvimento do aparelho de Weber, uma característica dos Otophysi. O aparelho de Weber é tradicionalmente formado pelos ossículos: scaphium, intercalarium, tripus e suspensorium, incluindo arcos e espinhas neurais e supraneurais (Figura 3). Estes ossos servem para conectar a vesícula gasosa com a membrana do labirinto, cujo papel é a transmissão de som e/ou vibração (Rosen e Greenwood 1970 apud Bird e Mabee, 2003). O número total de vértebras nos peixes é variável de acordo com a espécie, sendo 31 incluindo o uróstilo, em *Danio rerio* (4 Weber, 10 pré-caudais e 17 caudais) (Ferrerri et al., 2000), e de 38 a 43 vértebras em *Piaractus mesopotamicus* com ossificação completa (exemplares com 10 a 19 mm de CP) (Yamanaka, 1988).

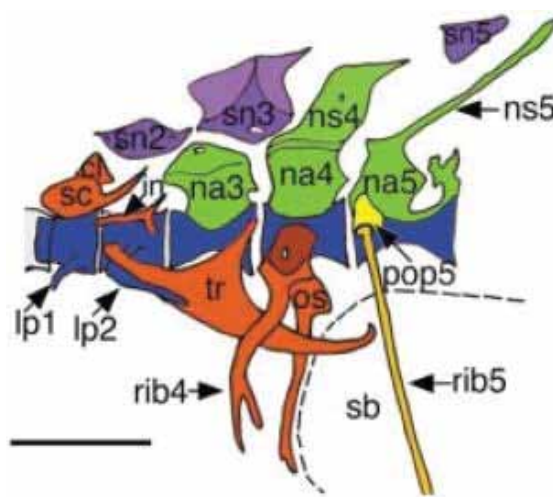


Figura 3. Esquema do Aparelho de Weber de *Danio rerio* formado pelas vértebras 1 a 5, o scaphium (SC), intercalarium (in), tripus (tr) e suspensorium (os). Além dos demais elementos: arcos neurais (na 3 a 5), espinhas neurais (ns 4 e 5), supraneurais (sn 2, 3 e 5), processo lateral (lp 1 e 2), costelas (rib 4 e 5) e vesícula gasosa (sb) (Bird e Mabee, 2003).

Também fazem parte do esqueleto axial as nadadeiras ímpares (dorsal, anal e caudal). A nadadeira dorsal está localizada na superfície dorsal do corpo dos peixes, e consiste de suporte de endoesqueleto ou pterigióforos (radiais proximais e distais) e suporte de exoesqueleto ou raios. A nadadeira anal localiza-se na superfície ventral do corpo, é delimitada anteriormente pelo ânus e igualmente

formada por pterigióforos e raios. A nadadeira caudal é um complexo que inclui vértebras centrais, acessórios e raios. O endoesqueleto é composto de cinco hipurais, parahipural, espinhos neural e hemal, uroneural, epural e uróstilo. O uróstilo possui o complexo centroual, centropleurale, pseudo-uróstilo e uróstilo. O desenvolvimento dos raios da nadadeira caudal começa com o espessamento do osso membranoso distalmente aos hipurais até a ossificação (Yamanaka, 1988; Bird e Mabee, 2003).

Por último, o esqueleto apendicular, representado pelas nadadeiras pares. A nadadeira peitoral é formada por osso dermal (cleitrum, postcleitrum e supracleitrum), ossos cartilagosos (coracóides, mesocoracóides, escápula, pterigióforos proximais e distais) e os raios. A nadadeira pélvica é composta apenas de ossos cartilagosos: o basipterigia, os pterigióforos e os raios por onde se inicia a ossificação (Cubbage e Mabee, 1996).

2.3. Nutrição endógena e exógena de larvas de peixes

A nutrição do embrião e da larva recém-eclodida depende dos nutrientes do vitelo. Durante a fase endotrófica, os peixes utilizam os glóbulos de vitelo e as gotículas lipídicas ou os glóbulos de gordura como fonte primária de nutrientes e energia. A utilização desses nutrientes está relacionada com a camada sincicial do vitelo (Jaroszewska e Dabrowski, 2011), tecido extra-embrionário que, em algumas espécies, desempenha juntamente com o fígado as funções de metabolismo e transporte de nutrientes do vitelo para o peixe (Sire et al., 1994).

O sistema digestório de larvas altriciais apresenta-se incompleto e com estômago ausente no início do período exotrófico. Sendo assim, as larvas são incapazes de aproveitar satisfatoriamente os nutrientes de dietas formuladas (Portella et al., 2012). Por isso, diversos estudos mostram que o manejo alimentar mais adequado para esse período crítico é o fornecimento de organismos vivos (Person-Le Ruyet, 1989; Bengtson, 1993; Kolkowski et al., 1997).

Os estudos para alimentação de larvas neotropicais, como o pacu, mostraram que as maiores taxas de sobrevivência e crescimento foram obtidas com o uso de organismos vivos (rotífero, artemia, entre outros) como alimento inicial (Cericato, 2005; Jomori et al., 2008; Mukai-Corrêa, 2008; Leitão et al., 2011), pelo menos

durante os primeiros dias de alimentação exógena, pois são constituídos de nutrientes essenciais ao desenvolvimento larval, como proteínas, aminoácidos indispensáveis, ácidos graxos essenciais, vitaminas, dentre outras. Porém, nem todos estes nutrientes estão presentes em quantidades adequadas nos organismos vivos, e uma alternativa em produções comerciais de larvas de peixes marinhos tem sido a utilização de diversas formas de enriquecimento do alimento vivo (Bogolino et al., 2012; Negm et al., 2013; Negm et al., 2014).

As exigências nutricionais de larvas de peixes são muito difíceis de serem determinadas por métodos tradicionais (Conceição et al., 2009). Por isso, para a transição alimentar e/ou substituição do alimento vivo pelo formulado na larvicultura de peixes neotropicais, são utilizadas dietas contendo níveis entre 55 e 60% de proteína, supondo-se que a demanda de proteína seja alta devido à alta taxa de crescimento que apresentam na fase larval; 15-20% de lipídios e carboidratos entre 10 a 20% (Cahu e Zambonino-Infante, 2001). As dietas também são suplementadas com minerais e vitaminas, mesmo sem prévio conhecimento das exigências propriamente ditas.

Os impactos da inadequação das dietas ou do desbalanceamento de nutrientes na fase inicial do desenvolvimento dos peixes podem ser vistos, inclusive no desenvolvimento ósseo, ocasionando má formação esquelética (Takeuchi et al., 1998; Cahu et al., 2003; Lall e Lewis-McCrea, 2007; Izquierdo et al., 2010; Bogolino et al., 2012).

2.3.1. Vitaminas para larvas de peixes

São diversos os fatores bióticos e abióticos que podem influenciar as mudanças morfológicas e funcionais durante os estágios iniciais de desenvolvimento dos peixes. Entre os principais estão os fatores nutricionais, destacando-se a importância das vitaminas que desempenham papel fundamental no desenvolvimento larval (Cahu et al., 2003). A exigência de vitaminas é influenciada pela fase de vida e estado fisiológico dos peixes, e pelas possíveis inter-relações dos nutrientes com os fatores ambientais (Rotta, 2003; NRC, 2011). Recentemente foram compiladas as informações existentes sobre as funções de cada vitamina para larvas de espécies nativas e exóticas e seu papel no processo de esqueletogênese,

ressaltando a necessidade de mais estudos sobre as exigências desses micronutrientes durante o desenvolvimento inicial das larvas (Portella et al., 2012).

Vitaminas em geral são compostos orgânicos distintos dos aminoácidos, carboidratos e lipídios, e são necessárias em quantidades pequenas a partir de fontes exógenas para garantir o crescimento normal dos peixes (Halver, 1989). As vitaminas são classificadas em hidrossolúveis (entre as mais estudadas estão a vitamina C e complexo B) e lipossolúveis (vitaminas A, D, E e K). A seguir, são apresentados os papéis, diretos ou indiretos, de cada vitamina no processo de ossificação e/ou má-formação óssea dos peixes.

A vitamina hidrossolúvel mais estudada é a vitamina C (ácido ascórbico), que atua diretamente no crescimento, desenvolvimento esquelético e cartilaginoso. O ácido ascórbico exerce importante função antioxidante (NRC, 2011), é um potente agente redutor, além de cofator em reações de hidroxilação, como por exemplo, para síntese de colágeno (Linnea et al., 1998), entre outras participações. Estudos com larvas de espécies nativas sul-americanas, como tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Chagas e Val, 2003), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (Miranda et al., 2003) e dourado (*Salminus brasiliensis*) (Okamura et al., 2008), mostraram que a vitamina C, em doses ideais, melhora o ganho em peso dos animais. Em juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) a não inclusão desta vitamina na dieta resultou em animais com anomalias esqueléticas, principalmente na região da cabeça (Fujimoto e Carneiro, 2001).

As vitaminas hidrossolúveis como as do complexo B participam de inúmeros processos metabólicos, melhorando o desempenho dos peixes (Tunison et al., 1943). Porém, não foram encontrados estudos sobre a influência destas vitaminas no desenvolvimento esquelético e incidência de anormalidades.

Vitaminas lipossolúveis desempenham funções importantes na osteogênese e metabolismo em geral. A vitamina D, por exemplo, é fundamental para a regulação do metabolismo do cálcio e fósforo (DeLuca, 2004), além de agir diretamente nos osteoblastos, células responsáveis pela formação e remodelação óssea (Sutton et al., 2005). Entretanto, o papel fisiológico desta vitamina não é claramente definido, principalmente em peixes (Lall e Lewis-McCrea, 2007). Estudos com larvas de peixe marinho (*Dicentrarchus labrax*) mostram a sensibilidade tanto ao excesso desta

vitamina, dificultando a absorção de cálcio (Darias et al., 2010b), quanto ao déficit em associação à vitamina C (Darias et al., 2011), ambos ocasionando anomalias esqueléticas durante o processo de osteogênese.

A vitamina E (tocoferóis e tocotrienóis) funciona como antioxidante, protegendo o tecido lipídico da ação de radicais livres (endógenos e exógenos) (Lall e Lewis-McCrea, 2007), que por sua vez estimulam a diferenciação de células como os osteoclastos, inibindo atividades de osteoblastos, o que pode causar reabsorção óssea e levar a má-formação (Parhami, 2003).

A vitamina K age no metabolismo de proteínas do osso. Sua atuação ocorre sinergicamente com a vitamina D para reduzir a perda óssea, explicada pela ação das duas vitaminas na homeostase do cálcio. Ou seja, a vitamina D induz a reabsorção óssea, o que resulta em aumento deste metabolismo e excreção urinária de cálcio, enquanto a vitamina K pode diminuir essa excreção (Hamre et al., 2010). Roy e Lall (2007) mostraram que a deficiência de vitamina K reduziu a mineralização óssea e, portanto, causou maior suscetibilidade ao aparecimento de anormalidades esqueléticas.

A última vitamina lipossolúvel a ser mencionada é a vitamina A. Trata-se de um nutriente morfogenético, que inclui todos os componentes com a mesma atividade biológica do retinol, sendo seu principal metabólito o ácido retinóico. Esta vitamina desempenha papel fundamental no desenvolvimento esquelético, bem como no crescimento, desenvolvimento do sistema nervoso, sistema imune e visão (Haga et al., 2002), o que a torna relevante para a fase inicial de desenvolvimento dos peixes. Fernandez e Gisbert (2011) mostraram os efeitos da vitamina A no desenvolvimento e esqueletogênese de peixes marinhos, e a necessidade de conhecer os níveis ideais para cada fase de desenvolvimento, uma vez que o desbalanceamento desta vitamina pode causar severas anomalias esqueléticas, causando prejuízos a aquicultura. Por sua importância no contexto desta pesquisa, informações mais detalhadas sobre a vitamina A são apresentadas em tópico separado.

2.3.2. Vitamina A

Por se tratar de um dos nutrientes que mais afetam o desenvolvimento ósseo, maior atenção é dada a vitamina A (VA) ou retinóides. Os peixes, assim como outros animais, não são capazes de sintetizá-la e, desta forma, há necessidade de ser fornecida pela dieta, sem que haja excesso. De forma geral, o metabolismo da VA é semelhante para todos os vertebrados. As fontes podem ser de duas origens, vegetal (carotenoides) e animal (ésteres de retinol). Alguns vegetais possuem em sua composição carotenoides, que são convertidos em retinol no organismo dos peixes, pela ação de enzimas específicas (Lehninger, 1991; Blomhoff, 1994). Porém as taxas de conversão, de acordo com o precursor de VA, são diferentes, como demonstrado em larvas de linguado japonês, *Paralichthys olivaceus* que não foram capazes de metabolizar eficientemente dietas contendo β -caroteno (Takeuchi et al., 1995).

Os retinóides têm papel importante na morfogênese, nos processos de diferenciação, proliferação e desenvolvimento de células e tecidos, tanto na fase de embriogênese quanto na fase de desenvolvimento larval, além de apresentar efeito direto sobre as células presentes no osso (Fernandez e Gisbert, 2011). Os osteoblastos, envolvidos na formação óssea, são inibidos em caso de hipervitaminose A, enquanto os osteoclastos, responsáveis pela reabsorção óssea, são estimulados. Desta forma, os retinóides reduzem a síntese de colágeno e a formação óssea, o que acelera o *turnover* ósseo, causando mineralização precoce (Lall e Lewis-McCrea, 2007). Ou seja, tanto a falta como o excesso de vitamina A na dieta podem resultar em anomalias esqueléticas durante o desenvolvimento larval dos peixes.

A forma de VA mais comum presente no organismo é o retinol. A vitamina A presente na dieta é absorvida e esterificada em ésteres de retinil, que são incorporados pelos citocromos, secretados na linfa e transportados ao fígado, onde são endocitados pelos hepatócitos e estocados na forma de retinol livre. Por outro lado, o retinol estocado pode ser reesterificado, por meio de ativação metabólica, produzindo ácido retinóico (AR). Ou seja, as vias metabólicas envolvem regulação da síntese e catabolismo de AR, de acordo com os níveis fisiológicos intracelulares. Finalmente, o AR livre no citoplasma das células-alvo pode ser degradado por enzimas (Cyp26) ou se ligar a proteínas (CRABP-I), evitando a degradação pela

Cyp26, ou ainda ser transportado para os nucléolos das células-alvo para ativar os fatores de transcrição dependentes da ligação RAR (Retinoic Acid Receptors) e RXR (Retinoid X Receptors) (Fernandez e Gisbert, 2011; Boglione et al., 2013).

Estudos recentes buscam respostas para o efeito da VA sobre o desempenho dos animais e a incidência de anormalidades esqueléticas, por meio do metabolismo molecular (Fernandez et al., 2011; Darias et al., 2012). Para isso, é necessário conhecer o perfil de expressão de genes ligados ao metabolismo da VA e ao crescimento. Em estudo com *Solea senegalensis* os autores concluíram que a composição da dieta induz diferentes estratégias de absorção desta vitamina, influenciando o metabolismo de morfogênese, consequentemente afetando o desenvolvimento larval, crescimento e saúde dos peixes (Darias et al., 2012).

2.4. Metabolismo ósseo: expressão gênica

A ação do ácido retinóico (AR) é mediada por duas famílias de receptores retinóides específicos no núcleo das células, e tem padrão espaço temporal semelhantes à expressão gênica, durante o desenvolvimento dos vertebrados (Haga et al., 2002, 2003). A regulação da expressão gênica pelo ácido retinóico ocorre via formação de dímeros, que podem ser homodímeros, como RXR/RXR, ou heterodímeros como RAR/RXR e outros (e.g. RXR/VDR- receptor de vitamina D), que se ligam às sequências específicas do DNA de regiões promotoras de vários genes, chamados RARE (elemento-resposta do ácido retinóico), ativando ou inibindo sua transcrição (Fernandez e Gisbert, 2011; Boglione et al., 2013).

Estudos realizados, com larvas de linguado japonês, sugerem que a VA induz o aparecimento de anomalias esqueléticas por meio da via RAR/RXR durante estágios mais avançados (Haga et al., 2002). O aumento da expressão do RARs tem sido observado concomitante a anomalias na mandíbula, em larvas que receberam suplementação de VA (Haga et al., 2011). Além disso, estes autores encontraram diferenças nos tipos e severidade das anomalias esqueléticas de acordo com o precursor de VA (*all-trans* RA e *9-cis* RA) utilizado na dieta. Ou seja, a expressão de RAR e RXR é dependente do precursor utilizado.

A ação destes receptores, em níveis fisiológicos de VA, pode estimular a diferenciação dos osteoblastos, via inibição da expressão durante o

desenvolvimento de formação normal da coluna vertebral. Porém, quando doses excessivas de VA estão presentes nas larvas, a VA induz a rápida mineralização via diferenciação prematura das células osteoprogenitoras no ligamento intervertebral dentro dos osteoblastos, levando assim a fusão de vértebras p.e. (Haga et al., 2011).

Sendo assim, os receptores mencionados desempenham função extremamente importante durante a osteogênese dos peixes, das espécies que já foram estudadas. Entretanto, não existem informações sobre os mecanismos que determinam má-formações esqueléticas em espécies de peixes sul-americanos, principalmente relacionados à expressão de genes responsáveis por esses processos.

2.5. Vitamina A *versus* osteogênese: isótopos estáveis como ferramenta

Metodologias tradicionais que estudam a assimilação de nutrientes, como a coleta fecal, são inviáveis para larvas de peixes. Assim, outras ferramentas têm sido utilizadas para avaliar o metabolismo e assimilação de nutrientes dos alimentos, como os isótopos estáveis (CHONS), traçadores que ocorrem naturalmente nos diferentes tecidos vivos e que permitem rastrear os constituintes alimentares (Schroeder, 1983). Ou seja, isotopicamente, o conteúdo de ^{13}C do tecido animal, por exemplo, reflete o valor de ^{13}C da dieta que lhe foi oferecida, isto é possível devido ao pequeno fracionamento associado aos processos de respiração e incorporação do carbono pelo animal (Parker et al., 1989).

Uma vez que a composição isotópica dos tecidos e fluidos de animais depende principalmente da sua alimentação, dietas com assinaturas isotópicas distintas podem ser usadas para medir taxas de *turnover* em todo o corpo do animal (Ducatti, 2004¹). Com isso, alimentos vivos e dietas com diferentes sinais isotópicos, que diferem inicialmente da composição isotópica das larvas, podem ser utilizadas para verificar a assimilação dos nutrientes após alimentação (Jomori et al., 2008). Porém, a mudança isotópica ocorre de acordo com o tecido, ou seja, depende da

¹ DUCATTI, C. **Isótopos estáveis ambientais**. (Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista) Apostila, 2004.

atividade metabólica com que os constituintes são incorporados pelo organismo (Caldara et al., 2007, 2008)

Le Vay e Gamboa-Delgado (2011) revisaram a aplicação dos isótopos estáveis na larvicultura de organismos aquáticos, e mostraram que esta ferramenta vem sendo utilizada com diversas finalidades, por exemplo conhecer a preferência alimentar das larvas de *Piaractus mesopotamicus* (Jomori et al., 2008), estudar a contribuição de nutrientes no crescimento e *turnover* muscular em juvenis de *Oreochromis niloticus* (Zuanon et al., 2006), balancear a dieta de acordo com as exigências nutricionais de larvas de *Litopenaus vannamei* (Gamboa-Delgado et al., 2009), entre outros trabalhos.

Com o intuito de contribuir para maiores informações sobre a importância da vitamina A no desenvolvimento larval, o presente estudo utiliza a técnica de isótopos estáveis de carbono e de nitrogênio para avaliar o *turnover* ósseo e muscular e desta forma avaliar a importância da vitamina A no desenvolvimento destes componentes corpóreos.

3. Objetivos

Descrever o desenvolvimento esquelético e as anomalias comumente observadas em estágios iniciais de desenvolvimento (larvas/juvenis) de pacu de diferentes origens (reprodutores selvagens ou mantidos em cativeiro por várias gerações).

Conhecer o *turnover* isotópico do tecido ósseo de larvas de pacu que receberam ou não suplementação de vitamina A, durante desenvolvimento inicial, por meio da aplicação da técnica de isótopos estáveis.

Avaliar o efeito de níveis de vitamina A suplementados às dietas, no desempenho (sobrevivência, crescimento) e na morfogênese (incidência e tipo de anomalia esquelética) de larvas de pacu, assim como na expressão de genes associados ao desenvolvimento ósseo.

4. Referência Bibliográfica

ANDRADES, J.; BECERRA, J.; FERNANDEZ-LLEBREZ, P. Skeletal deformities in larval, juvenile and adult stages of cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). **Aquaculture**, v. 141, p. 1-11, 1996.

BENGTSON, D. A. A comprehensive program for the evaluation of artificial diets. **Journal of World Aquaculture Society**, v. 24, p. 285-293, 1993.

BIRD, C. B.; MABEE, P. M. Developmental morphology of the axial skeleton of the zebrafish, *Danio rerio* (Ostariophysi: Cyprinidae). **Developmental Dynamics**, v. 228, p. 337-357, 2003.

BLOMHOFF, R. Overview of Vitamin A metabolism and function. In: Blomhoff, R. (Ed.), **Vitamin A in Health and Disease**. Marcel Dekker, New York, p. 1-35, 1994.

BOGLINO, A.; DARIAS, M. J.; ORTIZ-DELGADO, J. B.; OZCAN, F.; ESTÉVEZ, A.; ANDREE, K. B.; HONTORIA, F.; SARASQUETE, C.; GISBERT, E. Commercial products for artemia enrichment affect growth performance, digestive system maturation, ossification and incidence of skeletal in senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae. **Aquaculture**, v. 324-325, p. 290-302, 2012.

BOGLIONE, C.; COSTA, C.; DI DATO, P.; FERZINI, G.; SCARDI, M.; CATAUDELLA, S. Skeletal quality assessment of reared and wild sharpsnout sea bream and pandora juveniles. **Aquaculture**, v. 227, p. 373-394, 2003.

BOGLIONE, C.; GAGLIARDI, F.; SCARDI, M.; CATAUDELLA, S. Skeletal descriptors and quality assessment in larvae and post-larvae of wild-caught and hatchery-reared gilthead sea bream (*Sparus aurata* L. 1758). **Aquaculture**, v. 192, p. 1-22, 2001.

BOGLIONE, C.; GISBERT, E.; GAVAIA, P.; WITTEN, P.E.; MOREN, M.; FONTAGNÉ, S.; KOUMOUNDOUROS, G. Skeletal anomalies in reared European fish larvae and juveniles. Part 2: main typologies, occurrences and causative factors. **Aquaculture**, v. 5, p. S121-S167, 2013.

BOGLIONE, C.; MARINO, G.; GIGANTI, M.; LONGOBARDI, A.; DE MARZI, P.; CATAUDELLA, S. Skeletal anomalies in dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe 1834) juveniles reared with different methodologies and larval densities. **Aquaculture**, v. 291, p. 48-66, 2009.

CAHU, C.; ZAMBONINO-INFANTE, J. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. **Aquaculture**, v. 200, p. 161-180, 2001.

CAHU, C.; ZAMBONINO-INFANTE, J.; TAKEUCHI, T. Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. **Aquaculture**, v. 227, p. 245-248, 2003.

CALDARA, F. R.; DUCATTI, C.; BERTO, D. A.; DENADAI, J. C.; SILVA, E. T.; ANDRADE, G. A.; GIOSSO, M. M. Glutamina e *turnover* do carbono no tecido adiposo de leitões. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 1601-1607, 2007.

CALDARA, F. R.; DUCATTI, C.; BERTO, D. A.; DENADAI, J. C.; SILVA, E. T.; GARCIA, R. G. Efeito da glutamina sobre o *turnover* do carbono ($\delta^{13}\text{C}$) de músculos e vísceras de leitões desmamados: glutamina e *turnover* de carbono tecidual. **Acta Scientiarum**, v. 30, p. 291-297, 2008.

CASTAGNOLLI, N. Espécies exóticas próprias para a piscicultura. In: Castagnolli, N. **Piscicultura de água doce**. Jaboticabal: FUNEP, p.71-96, 1992.

CASTAGNOLLI, N.; ZUIM, S. M. Consolidação do conhecimento adquirido sobre pacu, *Colossoma mitrei*-Berg, 1895. **Boletim Técnico do CEPTA**, v. 5, p.1-2, 1985.

CERICATO, L. **Larvicultura do piau *Leporinus macrocephalus*: estudo da substituição do alimento vivo pelo artificial e da morfologia do sistema digestório**. 2005. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Centro de Aquicultura da Unesp. Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, SP, Brasil.

CHAGAS, E. C.; VAL, A. L. Efeito da vitamina C no ganho de peso e em parâmetros hematológicos de tambaqui. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p. 397-402, 2003.

COBCROFT, J. M.; BATTAGLENE, S. C. Jaw malformation in striped trumpeter *Latris lineata* larvae linked to walling behavior and tank colour. **Aquaculture**, v. 289, p. 274-282, 2009.

COBCROFT, J. M.; PANKHURST, P. M.; SADLER, J.; HART, P. R. Jaw development and malformation in cultured striped trumpeter *Latris lineata*. **Aquaculture**, v. 199, p. 267-282, 2001.

CONCEIÇÃO, L. E. C.; ARAGÃO, C.; RICHARD, N.; ENGROLA, S.; GAVAIA, P.; MIRA, S. E.; DIAS, J. Avanços recentes em nutrição de larvas de peixes. **Revista Brasileira Zootecnia**, v. 38, p. 26-35, 2009.

CUBBAGE, C. C.; MABEE, P. M. Development of the Cranium and Paired Fins in the Zebrafish *Danio rerio* (Ostariophysi, Cyprinidae). **Journal of Morphology**, v. 229, p. 121-160, 1996.

DARIAS, M. J.; BOGLINO, A.; MANCHADO, M.; ORTIZ-DELGADO, J. B.; ESTÉVEZ, A.; ANDREE, K.B.; GISBERT, E. Molecular regulation of both dietary vitamin A and fatty acid absorption and metabolism associated with larval morphogenesis of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 161, p. 130-139, 2012.

DARIAS, M. J.; LAN CHOW WING, O.; CAHU, C.; ZAMBONINO-INFANTE, J. L.; MAZURAS, D. Double staining protocol for developing European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 26, p. 280-285, 2010a.

DARIAS, M. J.; MAZURAS, D.; KOUMODOUROS, G.; GLYNATSI, N.; CHRISTODOULOPOULOU, S.; HUELVAN, C.; DESBRUYERES, E.; LE GAL, M. M.; QUAZUGUEL, P.; CAHU, C. L.; ZAMBONINO-INFANTE, J. L. Dietary vitamin D3 affects digestive system ontogenesis and ossification in European sea bass. **Aquaculture**, v. 298, p. 300-307, 2010b.

DARIAS, M.J.; MAZURAS, D.; KOUMOUNDOUROS, G.; CAHU, C.L.; ZAMBONINO-INFANTE, J. L. Overview of vitamin D and C requirements in fish and their influence on the skeletal system. **Aquaculture**, v. 315, p. 49-60, 2011.

DELUCA, H. F. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. **American Journal Clinic Nutrition**, v. 80, p. 1689–1696, 2004.

DINGERKUS, G.; UHLER, L. D. Enzyme clearing of Alcian blue stained whole small vertebrates, for demonstration of cartilage. **Stain Technology**, v. 52, p. 229–232, 1977.

EPPLE, M.; NEUES, F. Synchrotron microcomputer tomography for the non-destructive visualization of the fish skeleton. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 26, p. 286-288, 2010.

ESTÊVÃO, M. D.; SILVA, N.; REDRUELLO, B.; COSTA, R.; GREGÓRIO, S.; CANÁRIO, A. V. M.; POWER, D. M. Cellular morphology and markers of cartilage and bone in the marine teleost *Sparus auratus*. **Cell Tissue Research**, v. 343, p. 619-335, 2011.

FAUSTINO, M.; POWER, D. M. Development of osteological structures in the sea bream: vertebral column and caudal fin complex. **Journal of Fish Biology**, v. 52, p. 11–22, 1998.

FAUSTINO, M.; POWER, D. M. Development of the pectoral, pelvic, dorsal and anal fins in cultured sea bream. **Journal of Fish Biology**, v. 54, p. 1094-1110, 1999.

FAUSTINO, M.; POWER, D. M. Osteologic development of the viscerocranial skeleton in sea bream: alternative ossification strategies in teleost fish. **Journal of Fish Biology**, v. 58, p. 537–572, 2001.

FERNANDEZ, I.; DARIAS, M.; ANDREE, K.B.; MAZURAS, D.; ZAMBONINO-INFANTE, J.L.; GISBERT, E. Coordinated gene expression during gilthead sea bream skeletogenesis and its disruption by nutritional hypervitaminosis A. *BMC Developmental Biology*, v.11, p. 7, 2011.

FERNANDEZ, I.; GISBERT, E. Senegalese sole bone tissue originated from chondral ossification is more sensitive than dermal bone to high vitamin A content in enriched Artemia. *Journal of Applied Ichthyology*, v. 26, p. 344-349, 2010.

FERNANDEZ, I.; GISBERT, E. The effect of vitamin A on flatfish development and skeletogenesis: a review. *Aquaculture*, v. 315, p. 34-48, 2011.

FERRERI F., NICOLAIS C., BOGLIONE C., BERTOLINI B. Skeletal characterization of wild and reared zebrafish: anomalies and meristic characters. *Journal of Fish Biology*, v. 56, p. 1115-1128, 2000.

FAZ, A. W., LÉON-LOOSTERZIEL, K. M., GORT, G., SCHULTE-MERKER, S. Swim-Training Changes the Spatio-Temporal Dynamics of Skeletogenesis in Zebrafish Larvae (*Danio rerio*). *Plos one*, v. 7, p. e34072, 2012.

FUJIMAN, L. A. Ostariophysi: development and relationships. In: H.G. Moser, D.M. Cohen, M.P. Fahay, A.W. Kendall, Jr., W.J. Richards, and S.L. Richardson (Eds). **Ontogeny and Systematics of Fishes**. Special Publication n. 1, American Society of Ichthyologists and Herpetologists. Lawrence, Kansas, p. 126-137, 1984.

FUJIMOTO, R. Y.; CARNEIRO, D. J. Adição de ascorbil polifosfato, como fonte de vitamina C, em dietas para alevinos de pintado, *Pseudoplatistoma corruscans* (Agassiz, 1829). *Acta Scientiarum*, v. 23, p. 855-861, 2001.

FURUITA, H.; YAMAMOTO, T.; SHIMA, T.; SUZUKI, N.; TAKEUCHI, T. Effect of arachidonic acid levels in broodstock diet on larval and egg quality of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, v. 220, p. 725-735, 2003.

GASTON, T. F.; SUTHERS, I. M. Spatial variation in $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ of liver, muscle and bone in a rocky reef planktivorous fish: the relative contribution of sewage. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 304, p. 17-33, 2004.

GAVAIA, P. J.; DINIS, M. T.; CANCELA, M. L. Osteological development and abnormalities of the vertebral column and caudal skeleton in larval and juvenile stages of hatchery-reared Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture*, v. 211, p. 305-323, 2002.

GAVAIA, P. J.; SIMES, D. C.; ORTIZ-DELGADO, J. B.; VIEGAS, C. S. B.; PINTO, J. P.; KELSH, R. N.; SARASQUETE, M. C.; CANCELA, M. L. Osteocalcin and matrix Gla protein in zebrafish (*Danio rerio*) and senegal sole (*Solea senegalensis*): comparative gene and protein expression during larval development through adulthood. *Gene Expression Patterns*, v. 6, p. 637-652, 2006.

GJERDE, B.; PANTE, M. J. R.; BAEVERFJORD, G. Genetic variation for a vertebral deformity in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, v. 244, p. 77-87, 2005.

GODOY, M. P. **Peixes do Brasil: subordem Characidae: bacia do rio Mogi-guaçu**. Piracicaba, São Paulo, Brasil. 1975.

GRANDEL, H.; SCHULTE-MERKER, S. The development of the paired fins in the Zebrafish (*Danio rerio*). **Mechanisms of development**, v. 79, p. 99-120, 1998.

HAGA, Y.; DU, S.; SATOH, S.; KOTANI, T.; FUSHIMI, H.; TAKEUCHI, T. Analysis of the mechanism of skeletal deformity in fish larvae using a vitamin A-induced bone deformity model. **Aquaculture**, v. 315, p. 26-33, 2011.

HAGA, Y.; SUZUKI, T.; KAGECHIKA, H.; TAKEUCHI, T. A retinoic acid receptor-selective agonist causes jaw deformity in the japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. **Aquaculture**, v. 221, p. 381-392, 2003.

HAGA, Y.; SUZUKI, T.; TAKEUCHI, T. Retinoic acid isomers malformations in postembryonic development of the japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. **Zoological Science**, v. 19, p. 1105-1112, 2002.

HALVER, J. E. **Fish Nutrition**. 2 ed. San Diego: Academic, EUA. 1989.

HAMRE, K.; KROSSOY, C.; LOCK, E.; MOREN, M. Roles of lipid-soluble vitamins during ontogeny of marine fish larvae. **Aquaculture Research**, v. 41, p. 745-750, 2010.

HELFMAN, S. G.; COLLETTE, B. B.; FACEY, D. E.; BOWEN, B. W. Skeleton, skin and scales. In: Helfman, S. G.; Collette, B. B.; Facey, D. E.; Bowen, B. W. (Eds). **The diversity of fishes: Biology, evolution, and ecology**, v. 2, p. 23-35, 1997.

IZQUIERDO, S.; SOCORRO, J.; ROO, J. Studies on the appearance of skeletal anomalies in red porgy: effect of culture intensiveness, feeding habits and nutritional quality of live prey. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 26, p. 320-326, 2010.

JAROSZEWSKA, M.; DABROWSKI, K. Utilization of yolk: transition from endogenous to exogenous nutrition in fish. In: J. Holt (Eds). **Larval Fish Nutrition**. Wiley-Blackwell. UK. 2011.

JOMORI, R. K. **Desenvolvimento, sobrevivência e aspectos econômicos da produção de alevinos de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), diretamente em viveiros ou com diferentes períodos de cultivo inicial de larvas em laboratório**. 2001. 80 f. Dissertação (mestrado em Aquicultura) - Centro de Aquicultura da UNESP, Universidade Estadual Paulista, Câmpus Jaboticabal, São Paulo, Brasil.

JOMORI, R. K. **Organismos vivos e dietas secas na larvicultura do pacu, *Piaractus mesopotamicus* e o uso dos isótopos estáveis de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) como indicadores naturais da incorporação do alimento no tecido larval**. 2005. 151 f. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Centro de Aquicultura da UNESP, Universidade Estadual Paulista, Câmpus Jaboticabal, São Paulo, Brasil.

JOMORI, R. K.; CARNEIRO, D. J.; MALHEIROS, E. B.; PORTELLA, M. C. Growth and survival of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) juveniles reared in

ponds or at different initial larviculture periods indoors. **Aquaculture**, v. 221, p. 277-287, 2003.

KARAHAN, B.; CHATAIN, B.; CHAVANNE, H.; VERGNET, A.; BARDON, A.; HAFFRAY, P.; DUPONT-NIVET, M.; VANDEPUTTE, M. Heritability and correlations of deformities and growth-related traits in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L) in four different sites. **Aquaculture Research**, p. 1-11. 2012.

KJØRSVIKA, E.; HOEHNE-REITANA, K.; REITA, K.I. Egg and larval quality criteria as predictive measures for juvenile production in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). **Aquaculture**, v. 227, p. 9-20, 2003.

KOHN, Y.Y.; SYMONDS, J.E. Evaluation of egg quality parameters as predictors of hatching success and early larval survival in hapuku (*Polyprion oxygeneios*). **Aquaculture**, v. 342-343, p. 42-47, 2012.

KOLKOVSKI, S.; KOVEN, W.; TANDLER, A. The mode of action of *Artemia* in enhancing utilization of microdiet by gilthead seabream *Sparus aurata* larvae. **Aquaculture**, v. 155, p. 193-205, 1997.

KOUMOUNDOUROS, G.; DIVANACH, P.; KENTOURI, M. The effect of rearing conditions on development of saddleback syndrome and caudal fin deformities in *Dentex dentex* (L.). **Aquaculture**, v. 200, p. 285-304, 2001.

KOUMOUNDOUROS, G.; DIVANACH, P.; KENTOURI, M. The effect of rearing conditions on development of saddleback syndrome and caudal fin deformities in *Dentex dentex* (L.). **Aquaculture**, v. 200, p. 285-304, 2001.

KOUMOUNDOUROS, G.; DIVANACH, P.; SAVAKI, A.; KENTOURI, M. Effects of three preservation methods on the evolution of swimbladder radiographic appearance in sea bass and sea bream juveniles. **Aquaculture**, v. 182, p. 17-25, 2000.

KOUMOUNDOUROS, G.; GAGLIARDI, F.; DIVANACH, P.; BOGLIONE, C.; CATAUDELLA, S.; KENTOURI, M. Normal and abnormal osteological development of caudal fin in *Sparus aurata* L. fry. **Aquaculture**, v. 149, p. 215-226, 1997.

LALL, P. S.; LEWIS-MCCREA, L. M. Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish-an overview. **Aquaculture**, v. 267, p. 3-19, 2007.

LANES, C. F. C.; TESHOME, T. B.; BOLLA, S.; MARTINS, C.; FERNANDES, J. M. O.; BIANCHINI, A.; KIRON, V.; BABIAK, I. Biochemical composition and performance of Atlantic cod (*Godus morhua* L.) eggs and larvae obtained from farmed and wild broodstocks. **Aquaculture**, v. 324-325, p. 267-275, 2012.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**. São Paulo: Savier, 1991.

LEITÃO, N. J., PAI-SILVA, M. D., ALMEIDA, F. L. A., PORTELLA, M. C. The influence of initial feeding on muscle development and growth in pacu *Piaractus mesopotamicus* larvae. **Aquaculture**, v. 315, p. 78-85, 2011.

LINNEA, A.; DIBBLE, M. V.; TURKIKI, P. R.; MITCHELL, H. S.; RYNBERGEN, H. J. **Nutrição**, Rio de Janeiro: Ed. Guanabara, 1998.

MAZURAS, D.; NOMIKI, G.; DARIAS, M. J.; CHRISTODOULOPOULOU, S.; CAHU, C. L.; ZAMBONINO-INFANTE, J. L.; KOUMOUNDOUROS, G. Optimal levels of dietary vitamin a for reduced deformity incidence during development of european sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) depend on malformation type. **Aquaculture**, v. 294, p. 262-270, 2009.

MENOSSE, O. C. C.; TAKATA, R.; SANCHES-AMAYA, M. I.; FREITAS, T. M.; YÚFERA, M.; PORTELLA, M. C. Alimentação inicial de pacu com dieta microencapsulada produzida experimentalmente e sua relação com o crescimento e estruturas do sistema digestório. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, p. 1-10, 2012.

MENTON, D. J. Research considerations into the nutrition of Colossoma and Piaractus in relation to culture conditions. In: Hernandez, R. (Ed). **Cultivo de Colossoma**. Guadalupe, Colombia, v. 75-84, 1989.

MIRANDA, E. C.; PINTO, L. G. Q.; FURUYA, W. M.; PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; PEZZATO, A. C. Ganho de peso e taxa de sobrevivência de pós-larvas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) alimentadas com rações contendo diferentes níveis de vitamina C. **Acta Scientiarum**, v. 25, p. 31-36, 2003.

MPA, Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim estatístico da pesca e Aquicultura no Brasil 2010. Brasília, 2012. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/mpa/seap/Jonathan/mpa3/docs/anu%e1rio%20da%20pesca%20completo2.pdf>>. Acesso em: 26 jun. 2013.

MUKAI-CORRÊA, R. **Produção de micropartículas por gelificação iônica para alimentação de larvas de peixes: Estudos em Sistema-Modelo com inclusão de micropartículas lipídicas ou emulsão lipídica e Teste in vivo**. 2008. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Nutrient Requirements of fish and shrimp**. Washington: National Academic Press. 2011.

NEGM, R.; COBCROFT, J.M.; BROWN, M.R.; NOWAK, B.F.; BATTAGLENE, S. C. The effects of dietary vitamin A in rotifers on the performance and skeletal abnormality of striped trumpeter *Latris lineata* larvae and post larvae. **Aquaculture**, v. 404-405, p. 106-115, 2013.

NEGM, R.; COBCROFT, J.M.; BROWN, M.R.; NOWAK, B.F.; BATTAGLENE, S. C. Performance and skeletal abnormality of striped trumpeter *Latris lineata* larvae and post larvae fed vitamin A enriched *Artemia*. **Aquaculture**, v. 422-423, p. 115-123, 2014.

OKAMURA, D.; ARAÚJO, F. G., LOGATO, P. V. R.; SILVEIRA, U. S.; MURGAS, L. D. S.; FREITAS, R. T. F. Palmitato de ascorbil e acetato de tocoferol como

antioxidantes metabólicos em larvas de dourado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 1061-1068, 2008.

OSSE, J. W. M.; VAN DEN BOOGAART, J. G. M. Dynamic morphology of fish larvae, structural implications of friction forces in swimming, feeding and ventilation. **Journal of Fish Biology**, v. 55, p. 156–174, 1999.

OSSE, J. W.; VAN DEN BOOGAART., J. G. M. Allometric growth in Fish Larvae: Timing and Function. In: J.J. Govoni (Ed.). **The Development of Form and Function in Fishes and the Question of Larval Adaptation**, American Fisheries Society, Symposium 40, Bethesda, Maryland, p. 167-194, 2004.

OWEN, M. A. G.; EYNON, B.; WOODGATE, S.; DAVIES, S. J.; FOX, S. Increased water current induces micro-architectural changes to the vertebral bone of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 344-349, p. 141-146, 2012.

PARHAMI, F. Possible role of oxidized lipids in osteoporosis: could hyperlipidemia be a risk factor? Prostaglandins. **Leukotrienes and Essential Fatty Acid**, v. 68, p. 373-378, 2003.

PERSON LE-RUYET, J. Early weaning of marine fish larvae onto microdiets: constraints and perspectives. **Actes de Colloque in Advances in Tropical Aquaculture**. Tahiti, p. 625-642, 1989.

PORTELLA, M. C.; LEITÃO, N. J.; TAKATA, R.; LOPES, T. S. Alimentação e nutrição de larvas. In: Fracalossi, D. M.; Cyrino, J. E. P. (Eds). **NUTRIAQUA: Nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira**. Ministério da Pesca e Aquicultura. Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, v. 1, p. 185-216, 2012.

PORTELLA, M.C.; DABROWSKI, K. Diets, physiology, biochemistry and digestive tract development of freshwater fish larvae. In: Cyrino, J.E.P.; Bureau, D.; Kapoor, B.G. (Eds). **Feeding and Digestive Functions in Fishes**, Science Publisher, Academic Press, New Hampshire, EUA, p. 227-279, 2008.

POTTHOFF, T. Clearing and staining techniques. In: H.G. Moser, W.J. Richards, D.M. Cohen, M.P. Fahay, A.W. Kendall Jr.; S.L. Richardson (Eds). **Ontogeny and Systematics of Fishes**. American Society of Ichthyologists and Herpetologists. Special publication, v. 1, p. 35-37, 1984.

QUEIROZ, F J; LOURENÇO, J. N.; KITAMURA, P.; SCORVO FILHO, J. D.; CYRINO, J. E.; CASTAGNOLLI, N.; VALENTI, W.; BERNARDINHO, G. Aquaculture in Brazil: Research priorities and potential for further international collaboration. **Journal of World Aquaculture Society**, v. 36, p. 45-50, 2005.

ROSEN D. E.; GREENWOOD, P. H. Origin of the Weberian apparatus and the relationships of the ostariophysan and gonorynchiform fishes. **Am Mus Novit**, v. 2428, p. 1–25, 1970.

ROTTA, M. A. **Utilização do ácido ascórbico (vitamina C) pelos peixes**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2003. 54 p. (Embrapa Pantanal. Documentos 49)

RUSSO, T.; PRESTINICOLA, L.; SCARDI, M.; PALAMARA, E.; CATAUDELLA, S.; BOGLIONE, C. Progress in modeling quality in aquaculture: an application of the Self-Organizing Map to the study of skeletal anomalies and meristic counts in gilthead seabream (*Sparus aurata*, L. 1758). **Journal of Applied Ichthyology**, v. 26, p. 360-365, 2010.

SFAKIANAKIS, D. G., GEORGAKOPOULOU, E., KENTOURI, M., KOUMOUNDOUROS, G. Geometric quantification of lordosis effects on body shape in European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). **Aquaculture**, v. 256, p. 27-33, 2006.

SILVA, A. J. **Aspectos de alimentação do pacu adulto, *Colossoma mitrei* (Berg, 1985) (Pisces, Characidae), no pantanal de Mato Grosso**. 1985. 92f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

SIRE, M-F.; BABIN, P. J.; VERNIER, J-M. Involvement of the lysosomal system in yolk protein deposit and degradation during vitellogenesis and embryonic development in trout. **Journal of Experimental Zoology**, v. 269, p. 69-83, 1994.

STRECKER, R.; WEIGT, S.; BRAUNBECK, T. Cartilage and bone malformations in the head of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Toxicology and applied Pharmacology**, v. 268, p. 221-231, 2013.

SUTTON, A. L., ZHANG, X., ELLISON, T. I., MACDONALD, P. N. The 1, 25(OH) 2D3-regulated transcription factor MN1 stimulates vitamin D receptor-mediated transcription and inhibits osteoblastic cell proliferation. **Molecular Endocrinology**, v. 19, p. 2234-2244, 2005.

TAKATA, R. **Dietas desbalanceadas em aminoácidos indispensáveis e a adoção de estratégias na utilização de nutrientes para o pacu, *Piaractus mesopotamicus***. 2011. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Centro de Aquicultura da Unesp. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, Brasil.

TAKEUCHI, T.; DEDI, J.; EBISAWA, C.; WATANABE, T.; SEIKAI, T.; HOSOYA, K.; NAKAZOE, J. The effect of β -carotene and vitamin A enriched *artemia* nauplii on the malformation and color abnormality of larval japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Fisheries Science**, v. 61, p. 141-148, 1995.

TAKEUCHI, T.; DEDI, J.; HAGA, Y.; SEIDAI, T.; WATANABE, T. Effect of vitamin A compounds on bone deformity in larval japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Aquaculture**, v. 169, p. 155-165, 1998.

TAYLOR, W. R.; VAN DYKE, G. C. Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. **Cybium**, v. 9, p. 107-119, 1985.

TESSER, M. B.; CARNEIRO, D. J.; PORTELLA, M. C. Co-feeding of pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg 1887) larvae with *Artemia* nauplii and microencapsulated diet. **Journal Applied Aquaculture**, v. 17, p. 47-49, 2006.

TESSER, M. B.; PORTELLA, M. C. Ingestão de ração e comportamento de larvas de pacu em resposta a estímulos químicos e visuais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, p. 1887-1892, 2006.

TUNISION, A. V.; BROCKWAY, D. R.; SHAFFER, H. B.; MAXWELL, J. M.; MCCAY, C. M.; PALM, C. E.; WEBSTER, D. A. **Fish Research Bull.** 1943. 26p.

URBINATI, E.C.; GONÇALVES, F.D. TAKAHASHI, L.S. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: Baldisserotto, B.; Gomes, L.C. (Eds.). **Espécies nativas para a piscicultura no Brasil**. UFSM: Santa Maria, RS, Brasil. 2010.

WAGEMANS, F.; FOCANT, B.; VANDEWALEE, P. Early development of the cephalic skeleton in the turbot. **Journal of Fish Biology**, v. 52, p. 166–204, 1998.

YAMANAKA, N. **Descrição, desenvolvimento e alimentação de larvar e pré-juvenis do pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) (Teleostei, characidae), mantidos em confinamento**. Tese (Doutorado em Biologia) Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. 1988.125 p.

YANES-ROCA, C.; RHODY, N.; NYSTROM, M.; MAIN, K.L. Effects of fatty acid composition and spawning season patterns on egg quality and larval survival in common snook (*Centropomus undecimalis*). **Aquaculture**, v. 287, p.335-340, 2009.

ZUANON, J. A. S., PEZZATO, A. C. DUCATTI, C. Muscle $\delta^{13}\text{C}$ change in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): effects of growth and carbon turnover. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 145, p. 101-107, 2006.

CAPÍTULO 2- Skeletal development of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) larvae

T. S. Lopes¹, R. K. Jomori², D. J. Carneiro³ and M. C. Portella³

¹ São Paulo State University (UNESP), Jaboticabal, SP, 14884-900, Brazil

² Faculdade Dr. Francisco Maeda/FE, Ituverava, SP, 14500-000, Brazil

³ Aquaculture Center of São Paulo State University (CAUNESP/UNESP), Jaboticabal, SP, 14884-900, Brazil

Abstract

The present study describes the osteological development of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) larvae based on morphological and meristic features and their relationship. The standard length (SL) of wild- and captive-type larvae exhibited specific variation throughout development. After notochord flexion, when larvae exhibited 5.74 ± 0.37 mm SL, head structures were the first to be ossified along with the vertebral column. Ossification of all fin rays occurs latter. Complete skeleton ossification was associated to larval growth (SL), irrespective of age (days post hatching, dph) or offspring type. Head ossification occurred when larvae reached 9.54 ± 0.74 mm, the vertebral column and caudal fin with 7.75 ± 0.28 mm SL, dorsal fin with 10.24 ± 1.07 mm SL, anal fin with 11.92 ± 2.13 mm SL, and paired fins with 19.88 ± 0.05 mm (pectoral) and 14.26 ± 2.6 mm (pelvic) SL. The adipose fin was observed only 40 dph onwards.

Keywords: Ontogeny, osteology, skeleton, double staining, South American fish.

INTRODUCTION

Fish farming has developed as an economic activity in Brazil, and given the increased demand for fish larvae and juveniles, production techniques that ensure their quality must be implemented (Queiroz et al. 2005). The pacu (*Piaractus mesopotamicus*) is a commercially important neotropical fish, representing nearly 15% of native species farmed in Brazil (over 21000 tons in 2010, MPA 2012). It belongs to the family Characidae, order Characiformes, superorder Ostariophysi, subdivision Otophysi, which accounts for approximately 27% of all fish worldwide and 75% of freshwater fish (Fuiman 1984; Bird & Mabee 2003; Briggs 2005).

34 Fish skeletogenesis is one of the most important events during larval
35 development, especially because of the important role of the skeleton in protecting
36 internal organs and forming body structure. Fish bones are divided into cellular and
37 acellular histological types, the latter predominating in teleosteans such as the
38 ostariophysians, which exhibit acellular bones with a few osteocytes (Estevão et al.
39 2011). Bone develops from a cartilage frame or perichondrium around the cartilage
40 (endochondral or perichondral bone) or by intermembrane ossification, the direct
41 conversion of mesenchymal tissue into bones (dermal bones) (Bird & Mabee 2003;
42 Spoorendonk et al. 2010).

43 Fish skeleton can be divided into craniofacial, axial (vertebral column
44 coupled to unpaired fins) and appendicular (other fins) (Fiaz et al. 2012). In general,
45 ostariophysians exhibit specific features such as the Weberian apparatus, an
46 association of precaudal vertebrae to other bone structures (ossicles) connecting the
47 air bladder to the membranous labyrinth and whose function is to transmit sound and
48 vibration (Rosen & Greenwood 1970 apud Bird & Mabee 2003). Other osseous
49 features of ostariophysians, such as acellular bones, are believed to occur in pacu.
50 Therefore, other ostariophysian species can be used as reference to investigate
51 ossification processes in pacu.

52 Osteogenesis, one of the stages of ontogenesis, involves deep
53 transformations in the first phases of fish development (Faustino & Power 1998). This
54 process, however, can be affected by several factors (e.g. genetic, nutrition,
55 management, environmental conditions, etc.), which eventually results in skeletal
56 malformation (Koumoudouros et al. 2001; Sfakianakis et al. 2006; Owen et al. 2012;
57 Gjerde et al. 2005; Karahan et al. 2012). Ossification of head and caudal fin
58 components, for instance, occurs quickly in early ontogeny because they are
59 essential for feeding and locomotion (escaping predation) and closely related to fish
60 survival (Osse & van den Boogaart 1999; 2004). Therefore, high metabolic
61 investment is allocated to ensure the normal development of these structures
62 (Wittenrich et al. 2009). Another recent study on the zebrafish (*Danio rerio*) showed
63 that swimming efforts accelerate skeletogenesis of the structures involved in
64 locomotion, feeding and breathing (Fiaz et al. 2012). Thus, in addition to being
65 biologically important, studies on the ontogenetic skeletal development of fish are
66 also relevant for aquaculture, since they allow early identification of normal

development patterns and control of larvae deformation, an anomaly that would cause future losses.

Osteogenesis has been extensively studied in ostariophysians such as the zebrafish due to the importance of detecting bone malformation (Gavaia et al. 2002; Bird & Mabee 2003; Fiaz et al. 2012) and because they are an alternative model to studies involving human beings (Gorman & Breden 2007; Rafael et al. 2010). However, the processes involved in the skeletal development of South-American ostariophysians are scarcely known. To fill this gap, the present study describes the normal skeletal development of pacu larvae. The results obtained may contribute to identifying and characterizing possible skeletal anomalies in the fish studied, as well as in related species.

MATERIAL AND METHODS

LARVAL PRODUCTION AND REARING CONDITIONS

We evaluated larvae from wild and captive pacu breeders. Six wild breeding pairs (W_1 to W_6) and six pairs reared in captivity (C_1 to C_6) were spawned during two reproductive seasons (2010/11 and 2011/12, respectively). To that end, the hormone-induction protocol with carp pituitary extract (Zaniboni Filho & Weingartner 2007) was performed for final maturation and gamete extrusion. Dry fertilization was then carried out and eggs were incubated in funnel type incubator (200L) until hatching time.

The six wild breeding pairs (W_1 , W_2 , W_3 , W_4 , W_5 and W_6) were captured in the Paranapanema River (22°56'24.24''S and 50°31'07.43''W), and acclimated to captive conditions at the Hydrology and Aquaculture Station of Duke Energy Brazil, Salto Grande, São Paulo. Before first feeding, the larvae were transferred to 30-L tanks supplied with continuous water flow (four tanks for each breeding pair), at a density of 10 larvae per liter, average temperature of 27 ± 2 °C, and reared for 30 days post hatching (dph).

The other set of larvae, obtained from breeder stocks reared in captivity for more than six generations, was produced on three different farms: A (C_{A1} , C_{A2}), B (C_{B3} , C_{B4}) and C (C_{C5} , C_{C6}), all located in the state of São Paulo, Brazil. One thousand larvae from each breeding pair were kept at the Laboratory of Nutrition of

Aquatic Organisms, in 100-L tanks (10 larvae L^{-1}) supplied with continuous water flow and at average temperature of $28.5 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Larval development was accompanied from the first day post hatching to 22 to 60 dph (Fig. 1), according to larvae availability in each group. Larvae at 4 to 5 dph started exogenous feeding, receiving freshly hatched *Artemia* nauplii at amounts recommended by Jomori et al. (2003). From 15 to 21 dph they underwent gradual weaning until complete replacement by commercial feed (59.53% crude protein and 4644.1 kcal crude energy).

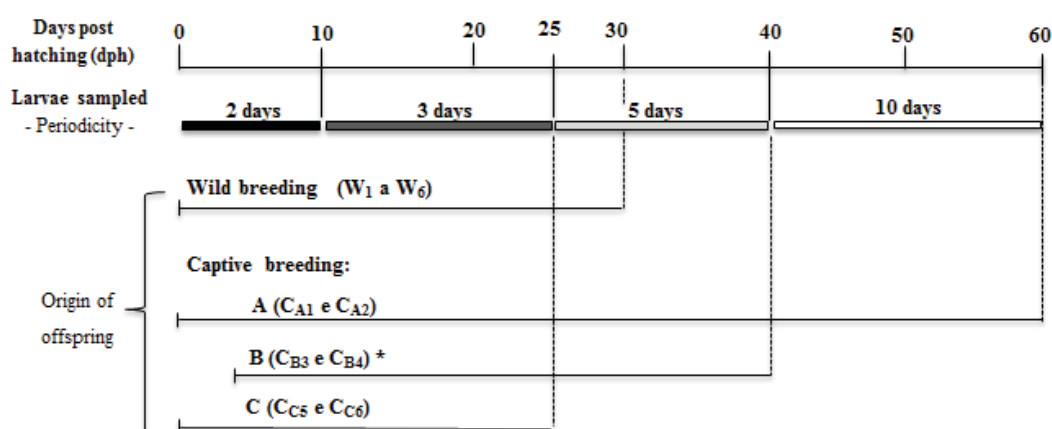


Fig. 1. Time, in days post hatching (dph), and sampling frequency of pacu (*P. mesopotamicus*) larvae.

* Sampling of offspring produced by captive B breeders (C_{B3} and C_{B4}) started with 4 dph.

MORPHOMETRY

Morphometrical characteristics were evaluated in 10 larvae randomly sampled from each breeding pair every 2, 3, 5 and 10 days after hatching, up to 10, 25, 40 and 60 dph, respectively (Fig. 1), totaling 720 larvae from wild breeders and 760 from captive breeders.

To evaluate osteological development, larvae were killed with 0.02% benzocaine, fixed in 10% phosphate buffered formalin and stained to distinguish bone from cartilage structures. This protocol was based on the method proposed by Potthoff (1984) and modified using 0.2% KOH during the staining processes, and adjusting reaction time at each stage, according to larval size. Juvenile specimens (>20 mm) were X-rayed for bone structure analysis (adapted from Koumoundouros et

123 al. 2000), with voltage and intensity manually regulated in 26 vK and 500 mA,
124 respectively, and silicone filter (20 cm thickness).

125 The terminology used to describe development stages was based on
126 notochord flexion, as proposed by Kendall et al. (1984) and applied to neotropical
127 species by Nakatani et al. (2001). Larvae were observed and measured under a
128 stereoscope coupled to a digital camera. Notochord length (NL) was measured in
129 larvae between 1 and 6 dph, and standard length (SL) and total length (TL) from 8
130 dph onwards, when the vertebral column was ossified.

131

132 SKELETAL DEVELOPMENT

133 After morphometrical analysis, larvae were analyzed in terms of differentiation
134 and the appearance of cartilage or mineralized structures. To that end, meristic
135 characteristics were observed and the number of vertebrae and rays in the caudal,
136 dorsal, anal, pelvic and pectoral fins was counted. The number of vertebra was
137 determined only in larvae with a completely ossified vertebral column. Accordingly,
138 the total number of rays in the different fins was determined only after they were
139 completely ossified.

140

141 STATISTICAL ANALYSIS

142 Morphometric variables were analyzed in a completely randomized design
143 (DIC) at two different moments (reproductive seasons), with the main plots consisting
144 of the six breeding pairs (wild or captive) and the subplots of assessment days
145 (sampling throughout development). Wild and captive larvae were compared just
146 after hatching (1 dph). A linear regression analysis of TL on SL was evaluated for
147 each reproductive season. Statistical analyses were carried out using the SAS
148 package (SAS Institute Inc., version 9.0).

149

150 RESULTS

151 MORPHOMETRIC CHARACTERISTICS

152 Of the morphometric parameters evaluated, standard length (SL) best
153 described larval development. The offspring from wild breeders (W_{1-6}) were similar in
154 relation to notochord length (NL, 1-6 dph) and standard length (SL, 8 dph) in the first
155 days of development ($P>0.05$), except at 4 dph, when NL in offspring W_6 was lower

156 (P=0.0374) (Table I). From 10 dph onwards, differences between the offspring
157 became more frequent (P<0.05). At the last larval sampling, the highest SL was
158 observed in offspring W₅ (P=0.0026), followed by offspring W₁, W₂, W₃ and W₄.
159 Offspring W₆ showed the lowest SL.

160 Following a similar pattern, offspring from captive breeders had comparable
161 NL (P>0.05) (Table I). Differences arose from 8 dph onwards, especially in C_{C3}
162 larvae, and mainly in C_{B6} larvae after 10 dph, which showed the highest average SL
163 (P<0.0001). Until 19 dph, offspring C_{A1}, C_{A2} and C_{C4} exhibited lower SL, which was
164 generally variable in C_{C3} and C_{B5}.

Table I. Mean notochord length (NL, 1-6 dph) and standard length (SL, 8-60 dph) of pacu offspring produced by six wild breeding pairs (2010/11) and six captive breeding pairs (2011/12) for 60 days post hatching.

Origin	Pairs	N° larvae	Days post hatching (dph) (mm)															
			1	2	4	6	8	10	13	16	19	22	25	30	35	40	50	60
Wild	W ₁	120	3.46	4.75	6.01 ^a	5.82	5.73	6.16 ^a	7.19 ^a	7.82 ^a	8.44 ^a	9.06 ^a	8.26 ^b	9.41 ^b	-	-	-	-
	W ₂	120	3.46	4.76	5.65 ^a	5.61	6.04	5.85 ^b	6.61 ^b	7.21 ^b	7.79 ^b	7.98 ^c	8.42 ^b	9.79 ^b	-	-	-	-
	W ₃	120	3.43	4.86	5.73 ^a	5.67	6.01	5.97 ^b	6.59 ^b	7.81 ^a	8.61 ^a	9.09 ^a	8.99 ^a	9.20 ^b	-	-	-	-
	W ₄	120	3.75	4.56	5.62 ^a	5.66	5.59	5.86 ^b	6.90 ^b	7.90 ^a	8.57 ^a	8.95 ^a	8.80 ^a	9.53 ^b	-	-	-	-
	W ₅	120	3.76	4.84	5.68 ^a	5.80	5.77	5.86 ^b	7.22 ^a	8.01 ^a	8.26 ^a	8.32 ^b	8.72 ^a	10.77 ^a	-	-	-	-
	W ₆	120	3.45	4.40	5.33 ^b	5.39	5.56	5.42 ^c	7.20 ^a	7.76 ^a	7.91 ^b	8.57 ^b	7.70 ^c	8.510 ^c	-	-	-	-
Average			3.55	4.70	5.66	5.66	5.78	5.85	6.95	7.75	8.26	8.66	8.48	9.54	-	-	-	-
SD			0.16	0.18	0.22	0.16	0.20	0.24	0.30	0.28	0.34	0.45	0.46	0.74	-	-	-	-
Captive	C _{A1}	160	4.52	5.71	5.50	5.56	5.68 ^b	6.52 ^c	7.03 ^c	7.99 ^b	9.68 ^b	9.51 ^c	9.57 ^{bc}	11.75 ^c	12.28 ^c	20.33 ^a	23.92	32.01 ^a
	C _{A2}	160	4.32	5.72	5.69	5.53	5.40 ^b	6.17 ^c	6.74 ^d	7.58 ^b	9.54 ^b	9.17 ^c	10.83 ^c	13.28 ^{bc}	15.05 ^b	18.73 ^c	23.98	29.56 ^b
	C _{B3}	100	4.30	5.40	5.66	5.76	6.31 ^a	6.90 ^b	7.95 ^b	8.70 ^a	10.99 ^{ab}	10.31 ^b	-	-	-	-	-	-
	C _{B4}	100	4.47	5.50	5.49	5.67	5.98 ^b	6.85 ^b	7.02 ^c	8.06 ^b	8.79 ^{bc}	10.31 ^b	-	-	-	-	-	-
	C _{C5}	120	-	-	5.30	5.26	5.34 ^b	6.36 ^c	8.07 ^b	8.91 ^a	10.83 ^{ab}	9.74 ^c	12.98 ^b	14.13 ^b	17.63 ^{ab}	19.50 ^b	-	-
	C _{C6}	120	-	-	5.51	5.44	5.75 ^b	7.27 ^a	9.24 ^a	8.69 ^a	11.60 ^a	12.55 ^a	14.33 ^a	17.88 ^a	18.20 ^a	20.95 ^a	-	-
Average			4.40	5.58	5.52	5.54	5.74	6.68	7.67	8.32	10.24	10.27	11.92	14.26	15.79	19.88	23.95	30.79
SD			0.11	0.16	0.14	0.17	0.37	0.40	0.94	0.52	1.07	1.21	2.13	2.60	2.71	0.97	0.05	1.73

*data followed by a same uppercase letter in a column and lowercase letter in a row do not differ statistically (Tukey test, P<0.05).

At 22 dph, offspring C_{P6} maintained the highest SL values; C_{C3} and C_{C4} showed intermediary SL and offspring C_{A1} , C_{A2} and C_{B5} the lowest averages ($P < 0.0001$). Offspring C_{B6} were the longest larvae until 35 dph, but at 40 dph the highest growth was obtained by C_{A1} and C_{B6} . At the end of the experiment (60 dph), the remaining offspring also showed statistical differences: SL was higher in C_{A1} than in C_{A2} , both subjected to similar rearing conditions ($P = 0.0119$).

A comparison of larval types in the first day post-hatching showed that notochord length was higher in captive than wild larvae ($P < 0.0001$). The growth of both offspring types over time is illustrated in Fig. 2.

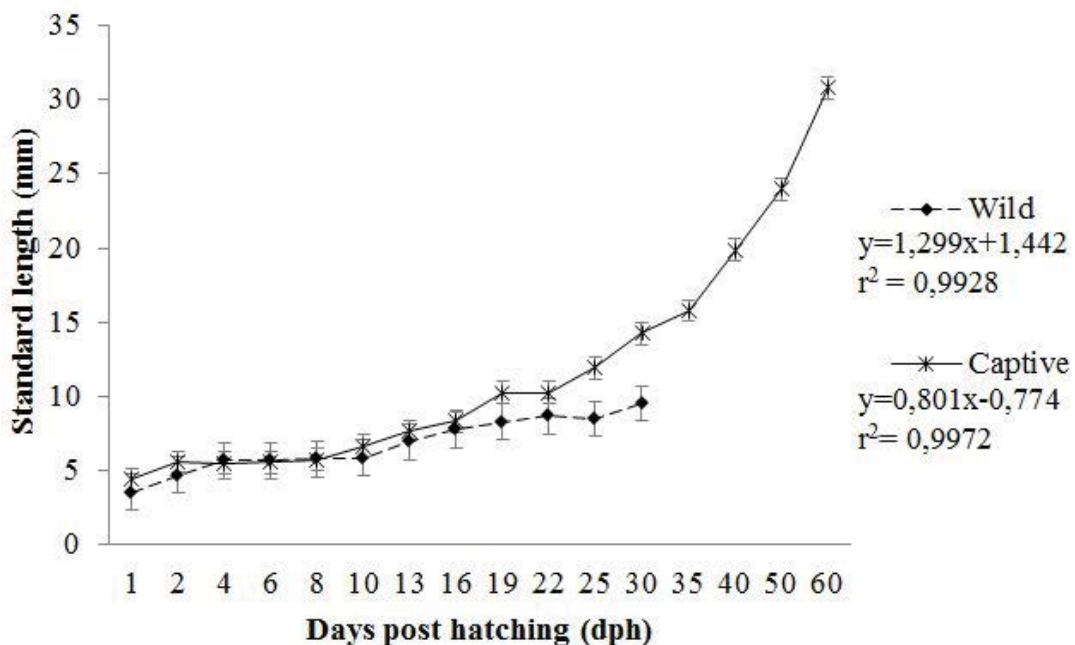


Fig. 2. Mean ($\pm$ dp) standard length (SL, mm) of pacu larvae produced by wild and captive breeders throughout larval development.

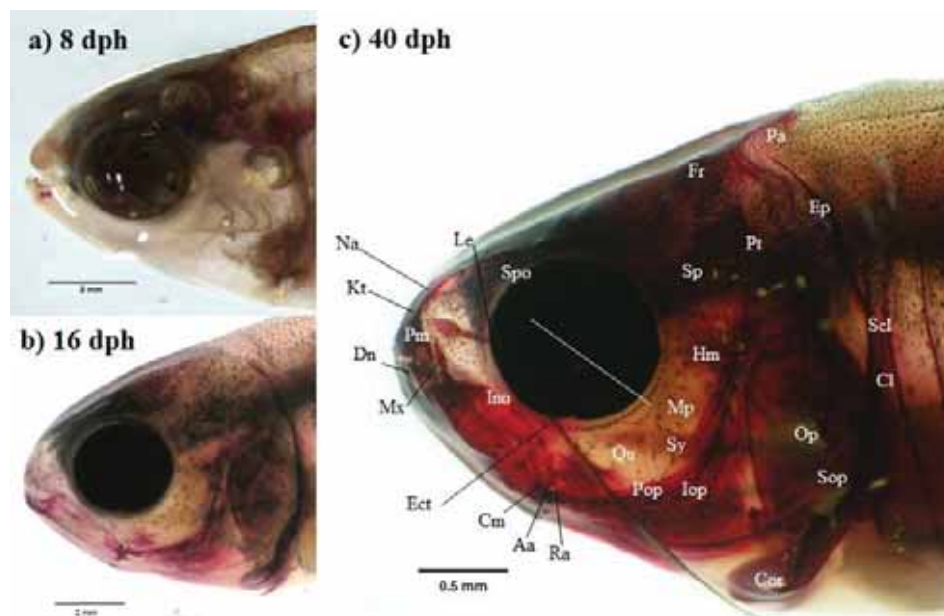
SKELETAL DEVELOPMENT

Bone structures developed as larvae reached specific body sizes, irrespective of offspring type and days of life (dph). Therefore, the ossification process of each structure was described as a function of standard length (SL).

Osteogenesis of the craniofacial skeleton can be observed in Fig. 3. The skeleton can be divided into 9 regions: olfactory, orbital, otic, occipital, jaw, palate,

189 hyoid, branchial and opercular. During the larval phase, the jaw region was the first to
 190 exhibit ossified structures, beginning with dentary bone when the SL of larvae was
 191 5.68 ± 0.20 mm (4 to 6 dph) (Fig. 3a). The number of ossified structures increased
 192 after larvae reached 7.75 ± 0.28 and 8.32 ± 0.52 mm (nearly 16 dph) (Fig. 3b),
 193 particularly in the jaw (dentary, premaxilla, anguloarticular, coronomeckelian,
 194 retroarticular), palate (quadrate), hyoid (branchiostegal ray), opercular (preopercle,
 195 interopercle, subopercle, opercle) and otic (sphenoid, parietal, epioccipital), orbital
 196 (frontal, supraorbital) regions and in the pectoral fins (supracleithrum, cleithrum and
 197 coracoid). The structures of the olfactory region were not ossified with 16 dph, but all
 198 structures were completely ossified at 30 dph, when SL reached 9.54 ± 0.74 mm
 199 (Fig. 3c). The branchial and occipital regions were not described in Fig. 3.

200



201

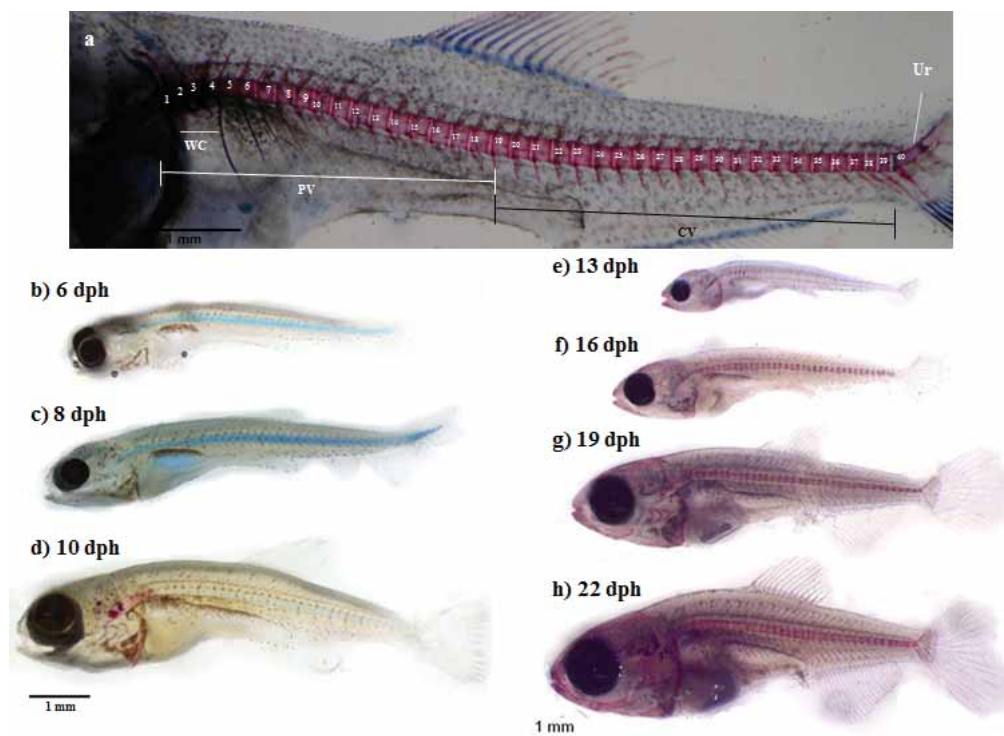
202 Fig. 3. Osteological development of pacu *Piaractus mesopotamicus* head at (a) 8
 203 dph; (b) 16 dph and (c) 40 dph. Na: nasal; Kt: kinethmoid; Pm: premaxilla; Dn:
 204 dentary; Mx: upper jaw (maxilla); Aa: anguloarticular; Ra: retroarticular; Cm:
 205 coronomeckelian (Meckel's cartilage); Ect: Ectopterygoid; Pop: Preopercle; Iop:
 206 Interopercle; Sy: Symplectic; Qu: Quadrate; Mp: Metapterygoid; Hm: Hyomandibula;
 207 Sp: sphenoid; Pt: pterotic; Fr: frontal; Pa: parietal; Ep: epioccipital; Le: lateral ethmoid;

208 Ino: infraorbital; Spo: supraorbital; Op: Opercle; Sop: Subopercle; Scl:
 209 Supracleithrum; Cl: Cleithrum; Cor: Coracoid.

210

211 The first vertebrae ossified simultaneously to head ossification and began
 212 close to the 9th vertebra when larvae reached the notochord flexion stage (Fig. 4d) at
 213 8 dph and average SL of 5.78 ± 0.20 mm (wild offspring) and 5.74 ± 0.37 mm
 214 (captive offspring). At 10 dph (SL of 6.27 ± 0.32 mm), all the larvae had achieved full
 215 notochord flexion, characterizing the post-flexion stage (Fig. 4d). Ossification
 216 followed from the 9th vertebra in the anterior portion (Fig. 4d and e), and then to the
 217 posterior column portion (Figs. 4f, g and h). Complete vertebral column ossification
 218 occurred only after notochord flexion and was observed in larvae with a SL of at least
 219 7.75 ± 0.28 mm (13 to 16 dph according to the offspring). In this condition, the
 220 vertebral column of all offspring contained 40 ± 1 vertebra, with no differences among
 221 them (Fig. 4a).

222



223

224 Fig. 4. Vertebral column of *P. mesopotamicus* larvae fully ossified, mineralized
 225 structures are shown in red and cartilage in blue (1-40 – vertebra number; WC-

226 Weberian complex; PV-precaudal vertebra; CV-caudal vertebra; and Ur – Urostyle)
227 (a), during notochord flexion (b-d) and in the post-flexion stage (e-h).

228

229 After complete ossification, vertebral column structures were described as
230 proposed by Bird and Mabee (2003) for the ostariophysian zebrafish *Danio rerio*, with
231 18 precaudal vertebrae (abdominal vertebrae 1-4, where the Weberian complex is
232 located, and 5-18), 21 caudal vertebrae (19-39, with the last two belonging to the
233 caudal complex), and the urostyle (40) (Fig. 4a).

234 Unpaired fins (caudal, dorsal and anal), which, along with the vertebral
235 column, make up the axial skeleton of fish, are formed from the embryonic
236 membrane (fin fold). It is a continuous structure that surrounds larvae in the post-
237 cephalic body region and continues through the posterior portion until the yolk sac in
238 the ventral portion. In pacu larvae it remained until the notochord flexion stage, when
239 the caudal fin developed.

240 After notochord flexion, in pacu larvae with SL of 5.74 ± 0.37 mm and 8 to 10
241 dph, caudal fin started differentiation, forming the first five rays from the urostyle (Fig
242 4d and e). The caudal fin initiated ossification from hypural and parahypural bones, at
243 the base of the fin. When larvae reached an average SL of 7.75 ± 0.28 mm (19 to 22
244 dph, according to the offspring), 19 completely ossified rays could be observed (Fig.
245 4g and h). During ossification of the caudal complex (Fig. 5), its structures were not
246 completely distinguishable at 13 dph (Fig. 5a), but at 30 dph they could be identified
247 and up to 30 rays visualized.

248 After the appearance of the first caudal fin rays, the dorsal fin was observed as
249 a spot in the dorsal region of the embryonic membrane, which increased until the
250 larvae reached SL of 8.32 ± 0.52 mm (16 to 19 dph) and 10 to 12 segmented rays
251 were identified. At SL of 10.24 ± 1.07 mm (19 to 22 dph), the number of rays
252 increased to 14-15 and we were able to identify the pterygiophores that sustain them
253 (Fig. 5c).

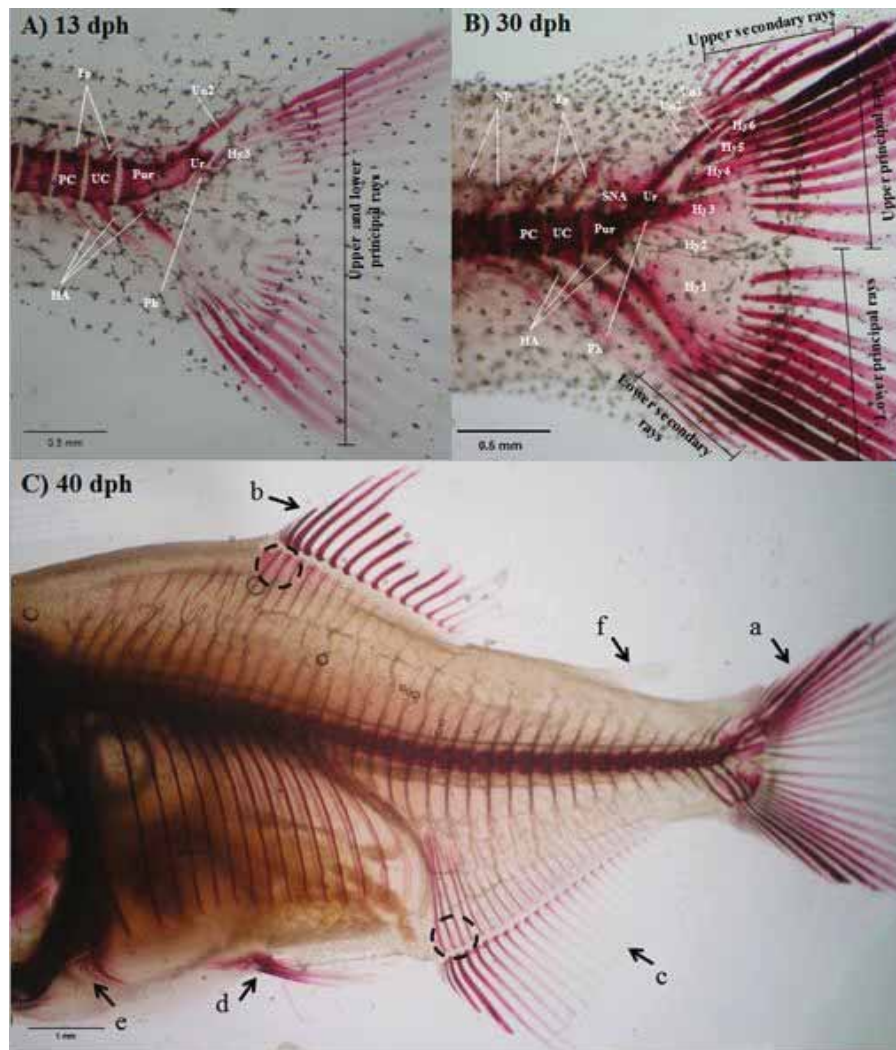


Fig. 5. Ossification of caudal complex structures in pacu (*Piaractus mesopotamicus*), at (A) 13 dph and (B) 30 dph. UC: ural centra, PC: preural centra, Ph: parhypural, Hy1-6: hypural, HA: hemal arch, NP: neural process, Ep: epural, Un1-2: uroneural, SNA: specialized neural arch, PUr: pseudo urostyle and Ur: urostyle; and (C) 40 dph (pterygiophores) and caudal (a), dorsal (b), anal (c), pelvic (d) and adipose (e) fins.

The anal fin was the last to complete differentiation. In larvae measuring 7.75 ± 0.28 mm it appeared as a spot on the embryonic membrane, and its first rays could be observed throughout larval development (>9.0 mm SL, at 19 to 22 dph). When larvae reached SL of 11.92 ± 2.13 mm (25 to 30 dph), 20 to 22 ossified rays and the pterygiophores could be observed in the anal fin (Fig. 5c).

266 Pectoral fins were the first structures to be observed in the appendicular
 267 skeleton (Fig. 5c) of larvae at 2 to 3 dph with SL greater than 4.7 ± 0.18 mm. Their
 268 rays, however, were the last structures to ossify, beginning when the SL of larvae
 269 was 13 mm and ending when it was at least 19.88 ± 0.97 mm, at 40 dph. This was
 270 followed by cleithrum and coracoid ossification between the bones of the craniofacial
 271 skeleton (Fig. 5c). Pelvic fins also developed later and were completely formed only
 272 in larvae that reached SL of 13 mm, at around 30 dph. The adipose fin, located
 273 between the dorsal fin and the caudal peduncle, was the last to initiate development
 274 in larvae with SL of more than 10 mm. It was clearly identified only in larvae after at
 275 least 40 dph.

276 All the structures were ossified and could be observed in X-rays of pacu
 277 specimens with SL of more than 19.88 ± 0.97 mm (40 to 60 dph) (Fig. 6). This phase
 278 is the onset of the pacu's juvenile stage.

279



280

281 Fig. 6. X-ray image of juvenile pacu at 60 dph, with ossified structures in the (A)
 282 head, (B) vertebral column and (C) caudal complex.

283

284 DISCUSSION

285 The initial development of fish is characterized by marked and rapid body
 286 changes. Cartilage reshaping and bone remodeling, triggered during skeletogenesis,
 287 are first required for development and allometric growth, and later continues as an
 288 adaptation to changes in mechanical load (Witten & Huyseune 2009). Growth
 289 heterogeneity, observed in both wild and captive offspring, was also observed during
 290 osteogenesis, and ossification of skeleton structures was accelerated or delayed
 291 according to larval size.

292 Offspring from wild breeders exhibited shorter notochord length at hatching
293 than those from captive breeders. This affected ossification, which was delayed in
294 larvae hatching with shorter notochord length, although ontogenesis was equally fast
295 in both larval types. Thus, the ossification of skeleton structures was more related to
296 larval size (SL) than age (dph). Standard length (SL) was used to represent the
297 development stages of zebrafish (Bird & Mabee 2003; Cubbage & Mabee, 2003;
298 Parichy et al., 2009) and other fish (Fuiman et al., 1998; Adriaens & Verraes, 2002;
299 Campinho et al., 2004). In addition, according to Parichy et al. (2009), SL is the
300 measure that best characterizes larval development since it is highly correlated to a
301 number of variables.

302 The life cycle of fish is generally divided into egg, larval, juvenile and adult
303 stages. However, the development phases and terminology adopted for their
304 classification are still controversial (Balon, 1999; Hensel 1999; Kendall et al. 1984). In
305 general, studies related to aquaculture of altricial fish larvae adopt the terminology
306 proposed by Kendall et al. (1984), considering the larval period from hatching to
307 complete fin and scale formation, followed by the juvenile phase, which lasts until
308 sexual maturity. These authors divide the larval period into yolk-sac, pre-flexion,
309 flexion and post-flexion phases. In addition to the development of several systems
310 and structures during the larval period, larvae undergo metamorphosis, with receding
311 larval structures and formation of new structures essential to adult life (Wald 1981
312 apud Hensel 1999). We found that the pacu larval period starts with a notochord
313 length of 3.55 ± 0.16 mm and lasts until larvae reach a standard length of $19.88 \pm$
314 0.97 mm in the juvenile stage.

315 In the present study, we observed the growth of two types of offspring, from
316 wild and captive breeders. Their growth was accompanied by ossification of
317 craniofacial structures (maxilla, premaxilla and jaw) directly related to food capture.
318 Simultaneously, the appendicular skeleton ossified from the 9th to the anterior
319 vertebrae, and then towards the posterior portion of the vertebral column. A similar
320 pattern was observed in zebrafish, with the first structures ossified in the craniofacial
321 skeleton and thereafter in the axial skeleton, initiating in the 3rd and 4th vertebra
322 (Spoorendonk et al. 2010). This sequence of development was confirmed by Fiaz et
323 al. (2012), who also observed that bone development in anal and dorsal fins of

zebrafish are prioritized when larvae are exposed to increased swimming activity, which they controlled by changes in water flow.

It is known that the formation of bone structures related to swimming and feeding is prioritized at the beginning of fish development (Osse et al. 1997). This pattern was observed in the pacu larvae, which initiated ossification simultaneously and mutually in skeletal structures related to swimming and feeding. This development pattern reflects a survival mechanism used by teleost larvae, which given their small hatching size, depend on strategies for eluding predators and using the available food to ensure survival (Osse et al. 1997). Structures involved in these primary functions show allometric growth during larval development, which is an alternative for coping with difficulties in early life since body changes due to differential growth of craniofacial and axial regions increase the likelihood of survival and fish performance (Osse et al. 1997, Osse e van den Boogaart 1999, 2004).

After pacu larvae skeleton formation, fins differentiated and ossified as described by Nakatani (2001). The caudal fin was the first to initiate and complete development (just after notochord flexion, in larvae measuring 5.74 ± 0.37 mm), followed by the dorsal, anal, pelvic and pectoral fins. This sequence is the same as that observed in larvae of other South-American ostariophysians such as *Psectrogaster amazonica* and *Potamorhina amazonica* (Nascimento & Araújo-Lima 1993), *Leporinus friderici* (Sanches et al. 2001), *Bryconamericus stramineus* (Galuch et al. 2003), *Hoplias malabaricus* (Bialetzki et al., 2008) and *Rhaphiodon vulpinus* (Sousa & Severi, 2002), and the presence of the adipose fin is typical of this fish order. This fin was once mistakenly considered a remnant of the embryonic membrane (Fuiman, 1984).

Knowledge of normal skeletal structure development is crucial in identifying larval species in the natural environment and studying possible causes of bone malformation, significantly reducing losses in fish farming systems. The occurrence of skeletal anomalies throughout the larval development of pacu has been studied by our team (Lopes et al., 2014), given that skeletal malformation increases mortality in both larval and juvenile stages and decreases growth during the grow-out phase, in addition to the fact that deformed fish are rejected by consumers (Boglione et al. 2001; 2009).

The present study described the ossification process of pacu larvae (*P. mesopotamicus*) from different origins, in order to identify their normal osteological development pattern under aquaculture conditions. The information provided represents an important contribution to the detection of skeletal anomalies in the larval stage as well as standardizing larval quality parameters for the species.

361

362

LITERATURE CITED

Adriaens, D., & Verraes, W. (2002). An empirical approach to study the relation between ontogeny, size and age using geometric morphometrics. In: Topics in functional and ecological vertebrate morphology. P. Aerts, K. D'Août, A. Herrel, R. Van Damme. (Eds). Shaker Publishing, Maastricht. 293-324.

Balon, E. K. (1975). Terminology of intervals in fish development. *Journal of Fishery Research* **32**, 1663-1670.

Bialecki, A., Nakatani, K., Sanches, P. V., Baumgartner, G., Makrakis, M. C. & Taguti, T.L. (2008). Desenvolvimento inicial de *Hoplias* aff. *malabaricus* (Bloch, 1794) (Osteichthyes, Erythrinidae) da planície alagável do alto rio Paraná, Brasil. *Acta Scientiarum* **30**, 141-149.

Bird, C. B. & Mabee, P. M. (2003). Developmental morphology of the axial skeleton of the zebrafish, *Danio rerio* (Ostariophysi: Cyprinidae). *Developmental Dynamics* **228**, 337-357.

Boglione, C., Gagliardi, F., Scardi, M. & Cataudella, S. (2001). Skeletal descriptors and quality assessment in larvae and post-larvae of wild-caught and hatchery-reared gilthead sea bream (*Spaurus aurata* L. 1758). *Aquaculture* **192**, 1-22.

Boglione, C., Marino, G., Giganti, M., Longobardi, A., De Marzi, P. & Cataudella, S. (2009). Skeletal anomalies in dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe 1834) juveniles reared with different methodologies and larval densities. *Aquaculture* **291**, 48-66.

Briggs, J. C. (2005). The biogeography of ostariophysan fishes (Ostariophysi: Ostariophysi): a new appraisal. *Journal of Biogeography* **32**, 287-294.

Campinho, M.A., Moutou, K.A. & Power, D.M. (2004). Temperature sensitivity of skeletal ontogeny in *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Fish Biology* **65**, 1003-1025.

- 388 Cubbage, C. C. & Mabee, P. M. (1996). Development of the Cranium and Paired
389 Fins in the Zebrafish *Danio rerio* (Ostariophysi, Cyprinidae). *Journal of*
390 *Morphology* **229**, 121-160.
- 391 Estêvão, M. D., Silva, N., Redruello, B., Costa, R., Gregório, S., Canário, A. V. M. &
392 Power, D. M. (2011). Cellular morphology and markers of cartilage and bone in
393 the marine teleost *Sparus auratus*. *Cell Tissue Research* **343**, 619-335.
- 394 Faustino, M., & Power, D. M. (1998). Development of osteological structures in the
395 sea bream: vertebral column and caudal fin complex. *Journal of Fish Biology* **52**,
396 11-22.
- 397 Fiaz, A.W., Léon-Loosterziel, K.M., Gort, G. & Schulte-Merker, S. (2012). Swim-
398 Training Changes the Spatio-Temporal Dynamics of Skeletogenesis in Zebrafish
399 Larvae (*Danio rerio*). *Plos one* **7**, e34072.
- 400 Fuiman, L.A. (1984). Ostariophysi: development and relationships. In: H.G. Moser,
401 D.M. Cohen, M.P. Fahay, A.W. Kendall, Jr., W.J. Richards, and S.L. Richardson,
402 editors. Ontogeny and Systematics of Fishes. Special Publication n. 1, American
403 Society of Ichthyologists and Herpetologists. Lawrence, Kansas. 126-137.
- 404 Fuiman, L.A., Poling, K.R. & Higgs, D.M. (1998). Quantifying developmental progress
405 for comparative studies of larval fishes. *Copeia*, 602:611.
- 406 Galuch, A.V., Suiberto, M.R., Nakatani¹, K., Bialecki, A. & Baumgartner, G. (2003).
407 Desenvolvimento inicial e distribuição temporal de larvas e juvenis de *Brycon*
408 *americus stramineus* Eigenmann, 1908 (Osteichthyes, Characidae) na planície
409 alagável do alto rio Paraná, Brasil. *Acta Scientiarum* **25**, 335-343.
- 410 Gavaia, P. J., Dinis, M. T. & Cancela. M. L. (2002). Osteological development and
411 abnormalities of the vertebral column and caudal skeleton in larval and juvenile
412 stages of hatchery-reared Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* **211**,
413 305-323.
- 414 Gjerde, B., Pante, M. J. R. & Baeverfjord, G. (2005). Genetic variation for a vertebral
415 deformity in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* **244**, 77-87.
- 416 Gorman, K. F. & Breden, F. (2007). Teleosts as models for human vertebral stability
417 and deformity. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* **145**, 28-38.
- 418 Hensel, K. (1999). To be a juvenile and not to be a larva: an attempt to synthesize.
419 *Environmental Biology of Fishes* **56**, 277-280.

- 420 Jomori, R. K.; Carneiro, D. J.; Malheiros, E. B. & Portella, M. C. (2003). Growth and
421 survival of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) juveniles reared in
422 ponds or at different initial larviculture periods indoors. *Aquaculture* **221**, 277-287.
- 423 Jomori, R. K.; Carneiro, D. J.; Malheiros, E. B. & Portella, M. C. (2005). Economic
424 evaluation of *Piaractus mesopotamicus* juvenile production in different rearing
425 systems. *Aquaculture* **234**, 175-183.
- 426 Karahan, B., Chatain, B., Chavanne, H., Vergnet, A., Bardon, A., Haffray, P., Dupont-
427 Nivet, M. & Vandeputte, M. (2013). Heritability and correlations of deformities and
428 growth-related traits in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L) in four
429 different sites. *Aquaculture Research* **44**, 289–299. doi:10.1111/j.1365-
430 2109.2011.03082.x
- 431 Kendall Jr., A.W., Ahlstrom, E.H. & Moser, H.G. (1984). Early life history stages of
432 fishes and their characters. In: MOSER, H. et al. (Ed.). Ontogeny and systematics
433 of fish. La Jolla: American Society of Ichthyologists and Hepertologists. 11-22p.
- 434 Koumoundouros, G., Divanach, P. & Kentouri, M. (2001). The effect of rearing
435 conditions on development of saddleback syndrome and caudal fin deformities in
436 *Dentex dentex* (L.). *Aquaculture* **200**, 285-304.
- 437 Koumoundouros, G., Divanach, P., Savaki, A. & Kentouri, M. (2000). Effects of three
438 preservation methods on the evolution of swimbladder radiographic appearance
439 in sea bass and sea bream juveniles. *Aquaculture* **182**, 17–25.
- 440 Lopes, T. S., Freitas, T. M., Jomori, R. K., Carneiro, D. J. & Portella, M.C. Skeletal. In
441 prelo. Deformities of pacu *piaractus mesopotamicus* larvae from a wild-caught
442 broodstock. *Journal of World Aquaculture Society*, v. 45, p. 15-27, 2014.
- 443 MPA. (2012). Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura, Brasil 2010: Ministério da
444 Pesca e Aquicultura. 129 p. Accessed in September 4, 2012, at
445 [http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20Estat](http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20Estat%C3%ADstico%20MPA%202010.pdf)
446 [t%C3%ADstico%20MPA%202010.pdf](http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20Estat%C3%ADstico%20MPA%202010.pdf)
- 447 Nakatani, K., Agostinho, A. A., Baumgartner, G., Bialecki, A., Sanches, P. V.,
448 Makrakis, M. C. & Pavanelli, C. S. (2001). Ovos e larvas de peixes de água doce:
449 desenvolvimento e manual de identificação. Maringá: eduem. 378p.

- 450 Nascimento, F. L. & Araújo-Lima, C. (1993). Descrição das larvas de *Psectrogaster*
451 *amazonica* e *Potamorhina amazônica* (Curimatidae, Pisces) da Amazônia
452 Central. *Acta Amazonica* **23**, 457-472.
- 453 Osse, J. W. & van den Boogaart, J. G. M. (2004). Allometric growth in Fish Larvae:
454 Timing and Function. In: J.J. Govoni (ed.), *The Development of Form and*
455 *Function in Fishes and the Question of Larval Adaptation*, pp. 167-194. American
456 Fisheries Society, Symposium 40, Bethesda, Maryland.
- 457 Osse, J. W. M. & van den Boogaart, J. G. M. (1999). Dynamic morphology of fish
458 larvae, structural implications of friction forces in swimming, feeding and
459 ventilation. *Journal of Fish Biology* **55**, 156–174. doi: 10.1111/j.1095-
460 8649.1999.tb01053.x
- 461 Osse, J.W.M., van den Boogaart, J.G.M., van Snik, G.M.J. & van der Sluys, L.
462 (1997). Priorities during early growth of fish larvae. *Aquaculture* **155**, 249-258.
- 463 Owen, M. A. G., Eynon, B., Woodgate, S., Davies, S. J. & Fox, S. (2012). Increased
464 water current induces micro-architectural changes to the vertebral bone of
465 juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* **344-349**: 141-146.
- 466 Parichy, D.M., Elizondo, M.R., Mills, M.G., Gordon, T.N. & Engeszer, E. (2009).
467 Normal table of postembryonic zebrafish development: staging by externally
468 visible anatomy of the living fish. *Developmental Dynamics* **238**, 2975-3015.
469 doi:10.1002/dvdy.22113.
- 470 Potthoff, T. (1984). Clearing and staining techniques. In: H.G. Moser, W.J. Richards,
471 D.M. Cohen, M.P. Fahay, A.W. Kendall Jr. and S.L. Richardson, eds. *Ontogeny*
472 *and Systematics of Fishes*. American Society of Ichthyologists and
473 Herpetologists. Special publication, 35-37p.
- 474 Queiroz, F. J., Lourenço, J. N., Kitamura, P., Scorvo Filho, J. D., Cyrino, J. E.,
475 Castagnolli, N., Valentiand, W. C. & Bernardinho, G. (2005). Aquaculture in
476 Brazil: Research priorities and potential for further international collaboration.
477 *World Aquaculture Magazine* **36**, 45-50.
- 478 Rafael, M. S., Marques, C. L., Parameswaran, M. L., Cancela, M. L. & Laizé, V.
479 (2010). Fish bone-derived cell lines: an alternative in vitro cell system to study
480 bone biology. *Journal of Applied Ichthyology* **26**, 230-234.

- 481 Sanches, P. V., Baumgartner, G., Bialetzki, A., Suiberto, M. R., Gomes, F. D. C.,
482 Nakatani, K. & Barbosa, N. D. C. (2001). Caracterização do desenvolvimento
483 inicial de *Leporinus friderici* (Osteichthyes, Anostomidae) da bacia do rio Paraná,
484 Brasil. *Acta Scientiarum* **23**, 383-389.
- 485 Sfakianakis, D. G., Georgakopoulou, E., Kentouri, M. & Koumoundouros, G. (2006).
486 Geometric quantification of lordosis effects on body shape in European sea bass,
487 *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture* **256**, 27-33.
- 488 Souza, W.T.Z. & Severi, W. (2002). Desenvolvimento inicial de larvas de *Rhaphiodon*
489 *vulpinus* Agassiz (Characiformes, Cynodontidae). *Revista Brasileira de Zoologia*
490 **19**, 85-94.
- 491 Spoorendonk, K. M., Hammond, C.L., Huitema, L.F.A., Vanoevelen, J. & Schulte-
492 Marker, S. (2010). Zebrafish as a unique model system in bone research: the
493 power of genetics and *in vivo* imaging. *Journal of Applied Ichthyology* **26**, 219-
494 224.
- 495 Witten, P. E. & Huysseune, A. (2009). A comparative view on mechanisms and
496 functions of skeletal remodelling in teleost fish, with special emphasis on
497 osteoclasts and their function. *Biological Reviews* **84**, 315-346.
- 498 Wittenrich, M. L., Rhody, N. R., Turingan, R. G. & Main, K. L. (2009). Coupling
499 osteological development of the feeding apparatus with feeding performance in
500 common snook, *Centropomus undecimalis*, larvae: identifying morphological
501 constraints to feeding. *Aquaculture* **294**, 221-227.
- 502 Zaniboni Filho, E. & Weingartner, M. (2007). Técnicas de indução da reprodução de
503 peixes migradores. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* **31**, 367-373.

CAPÍTULO 3 - Skeletal anomalies of pacu, *Piaractus mesopotamicus*, larvae from a wild-caught broodstock - Journal of Fish Biology (ISSN: 1095-8649), vol. 45, p. 15-26, February, 2014.

Skeletal anomalies of pacu, *Piaractus mesopotamicus*, larvae from a wild-caught broodstock

Taís da Silva Lopes, Thiago Mendes de Freitas

São Paulo State University – UNESP, 14884-900, Jaboticabal, SP, Brazil

Rosângela K. Jomori

Laboratório de Aquicultura, Faculdade Dr Francisco Maeda/FE, 14500-000, Ituverava, SP, Brazil.

Dalton José Carneiro and Maria Célia Portella¹

São Paulo State University, Aquaculture Center – UNESP, 14884-900, Jaboticabal, SP, Brazil

¹Corresponding author: portella@caunesp.unesp.br

Abstract

Skeletal anomalies in fish are frequent, representing a major problem for the aquaculture industry. The anomalies usually arise in the larval phase and worsen, persist, or recover over the ensuing stages of development. In addition to impairing larval quality, they compromise the growth, health and food conversion of fish, lowering their economic value. The present study evaluated the occurrence of skeletal anomalies in pacu larvae during the first 30 days of development. The newly-hatched larvae of 6 breeding pairs taken from the Paranapanema river (offspring A, B, C, D, E and F) and subjected to induced spawning were reared separately for 30 days, feeding on live prey (*Artemia nauplii*). Nearly 20 larvae from each breeding pair were killed and stored 1, 2, 4, 6, 8, 10, 13, 16, 19, 22, 25 and 30 days post-hatching. The larvae were stained to differentiate cartilage and bones and examined under a stereo microscope. A total of 1310 larvae were checked for the presence (1) or absence (0) of anomalies in the head, vertebral column and fins. Associations between growth parameters [total length (TL) vs

standard length (SL); standard length (SL) vs vertebral column length (VL)] were obtained by regression. Correspondence analysis was used to correlate data on the different parameters evaluated. On completion of observation, larvae from pair E had the highest SL whereas offspring F were the shortest. All types of skeletal anomalies were detected in the larvae irrespective of the offspring, affecting the normal growth of pacu larvae obtained from wild-caught breeders.

KEYWORDS: South American fish, larvae, skeletal anomalies.

Introduction

In recent years, anomalies in a wide variety of cultured fish species have been the subject of many studies. Different types of skeletal anomalies can affect both wild-caught and farm-raised fish (Boglione et al. 2001, Russo et al. 2010). They develop mainly during the morpho-physiological transformations in the larval period, when osteogenesis begins with cartilage formation followed by ossification (Faustino & Power 1998), and may differ as a function of bone type and fish species. The anomalies can be caused by different factors, such as unfavorable environmental conditions (Koumoudouros et al. 2001, Sfakianakis et al. 2006, Owen et al. 2012), nutritional deficiency (Cahu et al. 2003, Lall & Mac-Crea 2007), inbreeding and other genetic problems (Gjerde et al. 2005, Karahan et al. 2012).

Skeletal anomalies affect larval quality and result in major economic problems since they increase production costs by decreasing survival rate in larviculture and lowering fish value. Moreover, anomalies cause negative effects on growth and feed conversion in addition to increasing fish susceptibility to diseases (Boglione et al. 2001, 2003, 2009).

Anomalies can occur in any skeletal component of the different fish species. In the head, jaw anomaly is associated to head shortening or elongation (Boglione et al. 2001), affecting head shape. The most common deformities in the vertebral column are abnormal vertebrae (e.g. anomalous, fused or hypertrophic vertebral body; anomalous neural and haemal arches) (Haga et al. 2002) and abnormal curvatures in different portions of the vertebral column, characterized as kyphosis (dorsally directed sagittal curve, according to Gorman and Breden, 2007), lordosis or scoliosis. These deformities are reported from larvae to adult fish in many species, e.g. Oncorhynchus mykiss (Madsen & Dalsgaard 1999), Cyprinus carpio (Al-Harbi 2001), Syngnatus abaster (Alaya et al. 2011), Dicentrarchus labrax

(Sfakianakis et al. 2006), Solea senegalensis (Gavaia et al. 2002) and Sparus aurata (Boglione et al. 2001).

During larval development, specific skeletal structures are prioritized, and especially those involved in feeding and escaping predation grow rapidly (Osse and Van den Bogaart 1999). Bones develop in two different ways, forming cartilage and dermal bones. Cartilage bones developed from a cartilage precursor, either endochondrally (with ossification beginning within a cartilage template) or perichondrally (with ossification beginning in the perichondrium surrounding the cartilage template), whereas dermal bones develop directly from a mesenchymal condensation (Patterson 1977 apud Bird and Mabee 2003). Bone development varies according to histological type (cellular or acellular) and the nature of the aquatic environment (seawater or freshwater) (Meuinier and Huysseune 1992 apud Estevão et al. 2011). Skeleton structure and the formation of both dermal and endochondral bones have been studied in several teleost species. Most advanced teleosts (e.g. Sparus aurata) exhibit acellular bones and lack osteocytes. On the other hand, the Salmonids, considered one of the most ancient teleost orders, show cellular bones and the presence of osteocytes (Estevão et al. 2011).

In some species, such as Sparus aurata, anomalies are mainly centered in the caudal complex and characterized by hypural element fused to the urostyle or changes in the caudal fin, including reduction in size and length of the distal section, and the presence of bone notches (Boglione et al. 2001). Anomalies in dorsal and anal fin rays, with reduced length, count and size, were also reported in Solea senegalensis (Gavaia et al. 2002), Sparus aurata (Boglione et al. 2001), Pampus argenteus (Al-Mamry et al. 2010), Oncorhynchus mykiss (Deschamps and Sire, 2010), Pagrus pagrus (Izquierdo et al. 2010), among other species.

Although a number of studies have investigated skeletal anomalies in fish larvae, they are mostly related to marine species, and data on anomaly prevalence and consequences in Neotropical fish species are still unavailable. In this respect, this pioneer study investigates skeletal anomalies in pacu, Piaractus mesopotamicus, larvae. Despite the lack of information on the bone type of pacu, it likely exhibits cellular bones since it belongs to the Ostariophysi order (Rafael et al., 2010). The pacu fish is important for aquaculture in South-America and its production, combined with its hybrid tambacu (Colossoma macropomum x P. mesopotamicus), accounts for nearly 30% of native fish species farmed in captivity in Brazil (42,866 t in 2010, MPA 2012). The increase in Brazilian fish farming has been accompanied

by heightened demand for fish larvae and juveniles, requiring production technologies that ensure the quality of the young fish (Queiroz et al. 2005). The present study is part of a larger project that investigates skeletal anomalies in the main Neotropical fish species, evaluating their causes and consequences. This article is the first to describe anomalies in the head, vertebral column and fins of pacu fish in the early development phase, using larvae from wild-caught broodstock kept in captivity.

Materials and Methods

Larval Production and Experimental Groups

To ensure the genetic variability of the larvae under study, they were developed from gametes stripped from a wild-caught pacu broodstock, captured in the Paranapanema River and acclimated to captivity conditions. The breeding fish, aged approximately 5-years, were kept in ponds at 0.4 kg/m² density, at the Hydrology and Aquaculture Station of Duke Energy Brazil, Salto Grande, São Paulo State. They were fed commercial diet with 26% crude protein 2 to 3 times a day at 1 to 3% of biomass, according to water temperature.

We evaluated the offspring of 6 breeding pairs (A, B, C, D, E and F). After hatching, 1200 larvae from each pair were transferred to 120-L incubators (10 larvae L⁻¹) supplied with continuous water flow, and kept there until the beginning of exogenous feeding. They were then distributed into twenty-four 30-L tanks (4 tanks for each offspring) and held there for 30 days (10 larvae L⁻¹). Nearly 20 larvae from each offspring were randomly collected every 2 days during the first 10 days post hatching (dph), every 3 days until 25 dph and at 30 dph. At 4-5 dph, the larvae began receiving exogenous food, consisting of newly hatched *Artemia* nauplii in quantities recommended by Jomori et al. (2003). The average temperature and dissolved oxygen were 26,19 ± 1,16 °C and 5.4 ± 4 mg. L⁻¹, respectively.

Morphometrics

Morphometric parameters were measured in 1310 larvae until 30 dph. The larvae were killed in 0.02% benzocaine solution and fixed in 10% phosphate buffered formalin. Alcian Blue and Alizarin Red were used to stain the specimens (Potthoff 1984; Taylor and Van Dyke 1985), in order to differentiate bones from cartilage (Darias et al. 2010).

Anomaly incidence and morphometric parameters were evaluated under stereoscope coupled to a digital camera, which captured images using LEICA IM50 software. We

measured notochordal length (NL) or standard length (SL) and total length (TL), body height (H), head length (HL) and eye diameter (ED) of the larvae. Vertebral column length (VL) was calculated by subtracting head length from standard length ($VL=SL-HL$). Larval phases were characterized according to notochord flexion, as proposed by Kendall et al. (1984) and adapted to Neotropical fish by Nakatani et al. (2001).

Anomaly Incidence

Anomaly incidence throughout pacu development was evaluated according to Boggione et al. (2001). Larvae were checked for the presence (1) or absence (0) of anomalies in the upper and lower jaw, notochord or vertebral column (kyphosis, scoliosis, lordosis and abnormal vertebrae) and fin rays (caudal, dorsal and anal).

Larvae at 1-4 dph were evaluated only for flexion in the notochord because at this phase they still use yolk reserves and their mouths are not fully developed. At this phase, their vertebrae and fins have not initiated differentiation and ossification processes, and the larvae present only the embryonic finfold, a transitory structure subsequently replaced by unpaired fins. In larvae between 16 and 30 dph, the number of vertebrae was counted and the incidence of vertebral anomalies assessed. Fin rays were evaluated in specimens from 22 dph onwards because only after this stage the rays were completely ossified.

Statistical Analysis

The experimental design was completely randomized, consisting of 6 groups (offspring from 6 breeding pairs), with 4 replicates each. Morphometric data were analyzed by ANOVA and means were contrasted by the Tukey test, with significance level set at 0.05. Regression analysis was carried out to determine the association between morphometric parameters (TL vs SL and SL vs VL). Statistical analyses were carried out using the Statistical Analysis System package (SAS Institute Inc., version 9.0).

A numerical database was created to calculate anomaly incidence (in percent value) and describe the types of anomalies in the different body portions during early development of each offspring group. Additionally, exploratory data analysis with principal components analysis was applied, to assess the correlation between morphometric parameters (SL, TL, VL, HL, H and ED) and the occurrence of each type of anomaly over 30 days of development (12 samplings).

Results

Morphometrics

SL was the morphometric parameter that best represented larval development. The regression equation of TL on SL ($y = -1.44 + 1.3x$, where $y = TL$ and $x = SL$) was used to estimate total larval length. Similarly, the regression equation of VL on SL ($y = 0.5017x + 1.883$, where $y = VL$ and $x = SL$) estimated the vertebral column length of the larvae from 6 dph to 30 dph.

Mean SL values (Table 1) were statistically similar ($P > 0.05$) among the different offspring in the early development stage (1 and 2 dph). From 4 dph onwards, SL was lower ($P = 0.0374$) in offspring F than A, but did not differ from the other offspring. From 10 dph onwards, statistical differences among the offspring groups became more frequent ($P < 0.05$). At the end of the observations (30 dph), larvae from offspring E had the highest SL, followed by offspring A, B, C and D, all exhibiting higher SL values than those of offspring F ($P = 0.0026$).

Anomaly Incidence

Over 30 dph, 1310 larvae from the 6 breeding pairs were analyzed in terms of jaw, vertebral column (or notochord in the first days) and fins ray anomalies (Table 2). We found 84 (7.8%) larvae with lower jaw anomaly and 33 (3.1%) with upper jaw anomaly. Moreover, 63 (4.8%) larvae had kyphosis, 39 (3.0%) scoliosis and 62 (4.7%) lordosis. All these types of skeletal anomalies can be seen in the Fig. 1. Dorsal and anal fin anomalies were not observed, and ray anomalies in the caudal fin were found in only 4 specimens (1.3%). Their incidence varied over the experiment, and a slight decrease in anomaly frequency was observed from 25 to 30 dph.

TABLE 1. Mean notochordal length (1-4 days post hatching, dph) and standard length (6-30 dph, SL) of larvae from 6 pacu breeding pairs (number of larvae in parenthesis; N = 1310).

Pairs	Average Standard Length (mm) in different dph											
	1	2	4	6	8	10	13	16	19	22	25	30
A (221)	3.46 ^{Aa}	4.75 ^{Ab}	6.01 ^{Ac}	5.82 ^{Ac}	5.73 ^{Ac}	6.16 ^{Ac}	7.19 ^{Ad}	7.82 ^{Ae}	8.44 ^{Af}	9.06 ^{Ag}	8.26 ^{Bh}	9.41 ^{Bi}
B (219)	3.46 ^{Aa}	4.76 ^{Ab}	5.65 ^{ABc}	5.61 ^{Ac}	6.04 ^{Ac}	5.85 ^{Bc}	6.61 ^{Bd}	7.21 ^{Be}	7.79 ^{Bf}	7.98 ^{Cf}	8.42 ^{Bg}	9.79 ^{Bh}
C (230)	3.43 ^{Aa}	4.86 ^{Ab}	5.73 ^{ABc}	5.67 ^{Ac}	6.01 ^{Ac}	5.97 ^{Bc}	6.59 ^{Bd}	7.81 ^{Ae}	8.61 ^{Af}	9.09 ^{Ag}	8.99 ^{Ag}	9.20 ^{Bg}
D (207)	3.75 ^{Aa}	4.56 ^{Ab}	5.62 ^{ABc}	5.66 ^{Ac}	5.59 ^{Ac}	5.86 ^{Bd}	6.90 ^{Be}	7.90 ^{Af}	8.57 ^{Ag}	8.95 ^{Ah}	8.80 ^{Ah}	9.53 ^{Bi}
E (223)	3.76 ^{Aa}	4.84 ^{Ab}	5.60 ^{ABc}	5.80 ^{Ac}	5.77 ^{Ac}	5.86 ^{Bc}	7.22 ^{Ad}	8.01 ^{Ae}	8.26 ^{Af}	8.32 ^{Bf}	8.72 ^{Ag}	10.77 ^{Ah}
F (210)	3.45 ^{Aa}	4.40 ^{Ab}	5.33 ^{Bc}	5.39 ^{Ac}	5.56 ^{Ac}	5.42 ^{Cc}	7.20 ^{Ad}	7.76 ^{Ae}	7.91 ^{Be}	8.57 ^{Bf}	7.70 ^{Ce}	8.51 ^{Cf}
Average	3.55	4.70	5.66	5.66	5.78	5.85	6.95	7.75	8.26	8.66	8.48	9.54
SD	0.16	0.18	0.22	0.16	0.20	0.24	0.30	0.28	0.34	0.45	0.46	0.74

* Same uppercase letter within a column and lowercase letter within a row indicates absence of statistical difference (Tukey test, P>0.05).

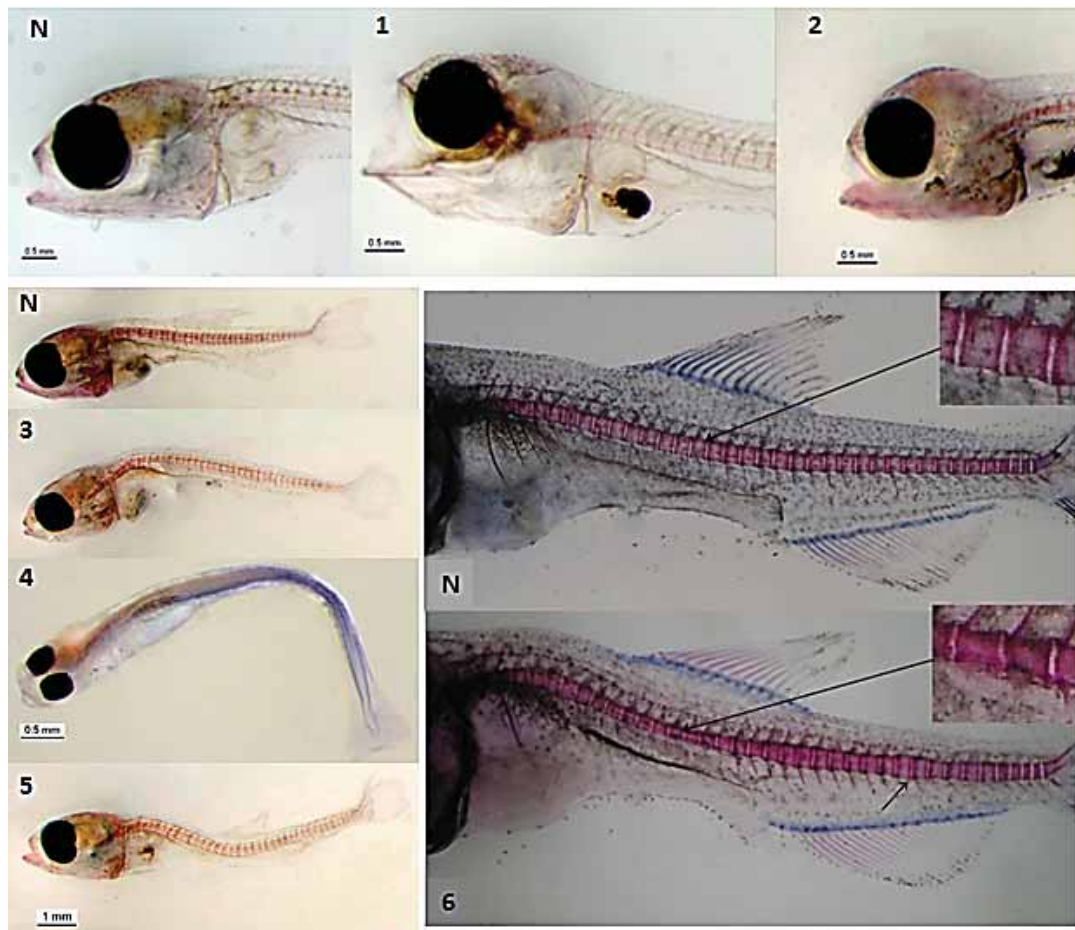


FIGURE 1. Skeletal anomalies observed in jaw (top), column curvature (left side) and vertebrae (right side) of pacu *P. mesopotamicus* larvae. (N) Normal; (1) Lower jaw anomaly (2) Upper jaw anomaly; (3) Kyphosis; (4) Scoliosis; (5) Lordosis; and (6) Abnormal vertebrae.

Larvae from the 6 offspring were statistically similar ($P=0.0135$) in terms of number of vertebrae, which ranged between 39 and 41. The vertebrae were evaluated in larvae with SL of 7.75 mm and complete ossification of the vertebral column. Anomaly incidence was low, affecting 43 larvae (3.3%) from the 6 offspring (Table 2).

TABLE 2. Anomaly incidence (%) in larvae from 6 pacu offspring evaluated at 1 until 30 dph, and total incidence of each type of anomaly (T).

dph	Jaw		Notochord (1-4 dph) or vertebrae column (6-30 dph)				Fins rays		
	Upper	Lower	Kyphosis	Scoliosis	Lordosis	Abnormal	Caudal	Dorsal	Anal
1	-	-	7.5	8.8	8.8	-	-	-	-
2	-	-	1.3	1.3	13.0	-	-	-	-
4	-	-	2.7	5.5	6.8	-	-	-	-
6	4.2	7.1	6.5	6.5	8.3	-	-	-	-
8	2.8	11.0	7.3	4.6	1.8	-	-	-	-
10	3.1	15.3	13.3	1.0	1.0	-	-	-	-
13	2.0	10.8	8.8	1.0	6.9	-	-	-	-
16	2.9	3.6	14.3	2.9	5.7	6.4	-	-	-
19	2.6	2.6	0.6	3.8	3.2	6.4	-	-	-
22	7.5	16.8	0.9	4.7	17.8	0.0	1.3	0.0	0.0
25	0.9	1.8	0.0	5.5	2.8	0.0	0.0	0.0	0.0
30	1.1	5.5	0.0	0.0	3.3	1.1	0.0	0.0	0.0
T	3.1	7.8	4.8	3.0	4.7	3.3	1.3	0.0	0.0

At least one type of head and vertebral column anomaly was detected in the offspring produced by every breeding pair (Table 3), but skeletal anomalies were not observed in all the individuals. Offspring B and D had no fin rays anomalies. Larvae from the other offspring exhibited caudal fin ray anomalies, albeit infrequently (0.3%). Comparing the offspring produced by the different breeding pairs, the most common anomalies were in the lower jaw ($6.4\% \pm 2.4$) and lordosis ($6.4\% \pm 2.9$), and they were more widespread in offspring D (10.6 and 11.6%, respectively).

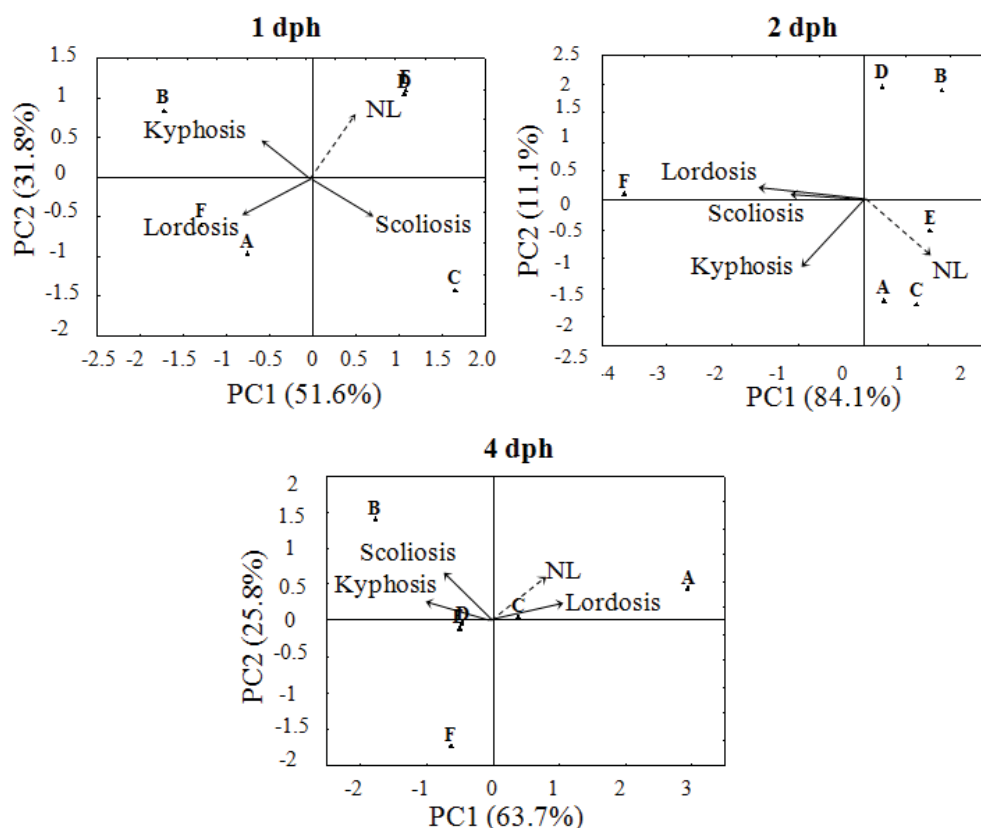
TABLE 3. Incidence (%) of each type of anomaly in larvae from offspring A, B, C, D, E and F, evaluated for 30 dph.

Pairs	Jaw		Notochord (1-4 dph) or vertebrae column (6-30 dph)				Fins rays		
	Upper	Lower	Kyphosis	Scoliosis	Lordosis	Abnormal	Caudal	Dorsal	Anal
A	4.1	7.2	5.4	6.8	4.5	0.9	0.5	0.0	0.0
B	0.5	4.1	6.8	3.7	5.9	0.9	0.0	0.0	0.0
C	3.0	7.0	4.3	4.8	7.8	1.3	0.4	0.0	0.0
D	3.4	10.6	3.9	3.9	11.6	1.0	0.0	0.0	0.0
E	0.9	4.5	5.4	1.8	4.9	3.1	0.4	0.0	0.0
F	3.3	5.2	7.1	2.4	3.8	1.9	0.5	0.0	0.0
Average	2.5	6.4	5.5	3.9	6.4	1.5	0.3	0.0	0.0
SD	1.5	2.4	1.3	1.9	2.9	0.9	0.2	0.0	0.0

Exploratory Data Analysis

The incidence of skeletal anomalies during larval development was correlated to morphometric data, according to exploratory data analysis. The ordination of each offspring (which indicates normality patterns according to the distance to the central axis) and the variables analyzed (arrows) over 30 dph are in the space defined by the first two corresponding axes (PC1 and PC2, comprising at least 50% of overall data variance), as shown in Figures 2, 3, 4 and 5. Variables whose values were above ± 0.65 were assumed to be significant and correlated to the corresponding axis.

Total length and flexion in the notochord (kyphosis, scoliosis and lordosis) were compared between larvae 1 to 4 dph (Fig. 2). In larvae 1 dph, lordosis (-0.82) was positively associated with kyphosis (-0.68), both were inversely related to scoliosis (0.80). At 2 dph the lordosis (-0.98) was inversely related to NL (0.87). On the other hand, with 4 dph lordosis (0.90) was directly correlated to NL (0.75).



234

235 FIGURE 2. Principal components analysis (PC) of skeletal anomalies and morphometric
 236 parameters of 6 offspring (A, B, C, D, E and F) from wild-caught broodstock at 1, 2 and 4
 237 dph.

238

239 At 6, 8, 10 and 13 dph, other variables were included for examination of skeletal
 240 anomalies in pacu larvae (Fig. 3). In this respect, growth parameters TL, SL, VL and H were
 241 also analyzed, as well as ED and HL, which were related to the incidence of head anomalies
 242 (upper and lower jaw). TL (0.90) and SL (0.86) were positively related to kyphosis (0.85) but
 243 inversely related to lordosis (-0.94), at 6 dph. On the other hand, PC2 explains lower jaw
 244 anomalies (0.65), which were positively associated to upper jaw (0.87). These were close to
 245 offspring D and E, which were also in the area of kyphosis occurrence. H (0.72) in turn was
 246 inversely related to VL (-0.93).

247

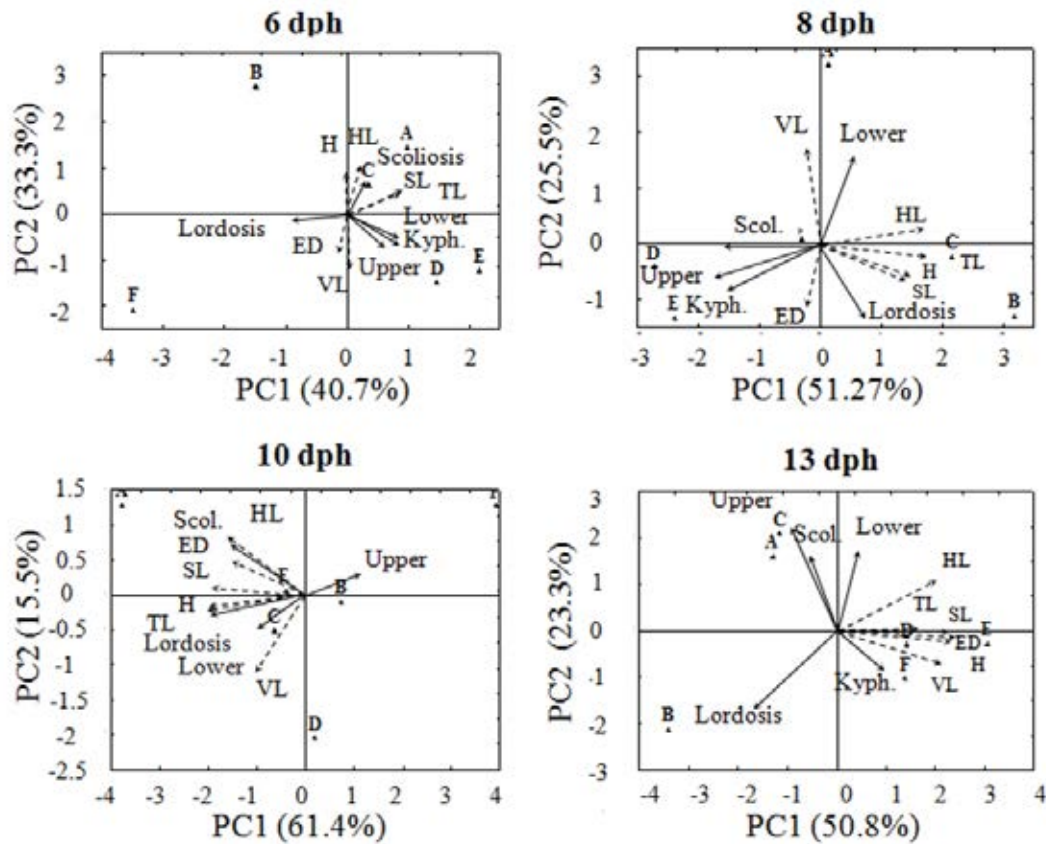


FIGURE 3. Principal components analysis (PC) of skeletal anomalies and morphometric parameters of 6 offspring (A, B, C, D, E and F) from wild-caught broodstock at 6, 8, 10 and 13 dph.

In contrast to the preceding phase, at 8 dph TL (0.79) and SL (0.76) were inversely associated to scoliosis (-0.87) in offspring D and to kyphosis (-0.84) in offspring E (Fig. 3). HL (0.91) was inversely associated to lower jaw anomaly (-0.93) and close to offspring A (PC1) (Fig. 3, at 8 dph). In PC2, ED (-0.65) was inversely associated to upper jaw anomaly (0.81) in offspring D, and VL (0.90) in the inverse relation to lordosis (-0.75).

At 10 dph, offspring F were closer to upper jaw anomaly, offspring A to scoliosis and offspring C to lower jaw anomaly. Larvae at 13 dph showed that growth parameters TL (0.67), SL (0.94), VL (0.89), H (0.93), HL (0.85) and ED (0.94) were inversely related to lordosis (-0.71), that was closer to offspring B.

From 16 dph onwards, the vertebral column was ossified, allowing other parameters related to vertebral anomalies to be included in larval assessment (Fig. 4). At 16 dph,

anomalies in the vertebral column, except for lordosis (0.65), were positively related to VL (-0.91) (affecting larval length), but inversely related to the other growth parameters. Lower jaw anomalies (0.53) did not affected HL (0.98) or ED (0.97), which were positively related. The offspring B was the farthest from the central axis, indicating lower anomaly incidence although it exhibited the lowest SL ($P<0.05$) (Table 1). At 19 dph, offspring E was very close to the central axis, where the anomalies are concentrated, in contrast to offspring B and F, which were more distant.

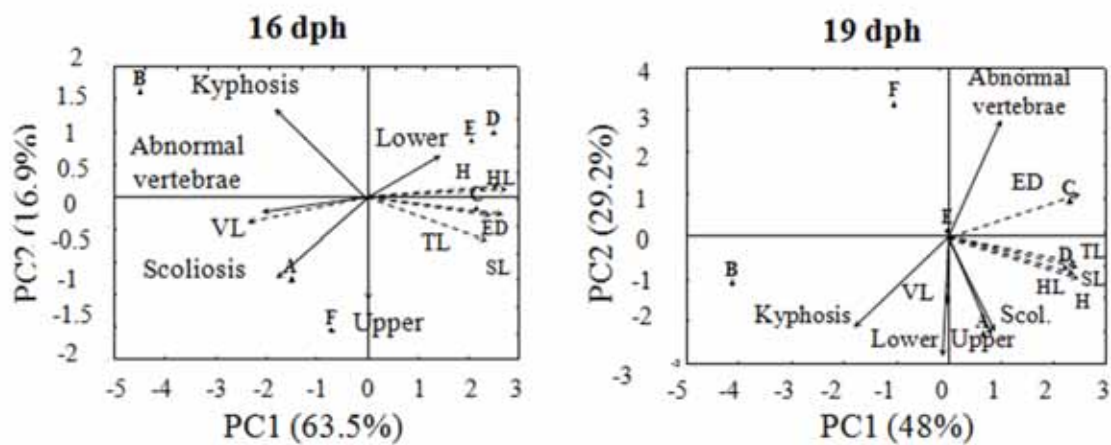


FIGURE 4. Principal components analysis (PC) of skeletal anomalies and morphometric parameters of 6 offspring (A, B, C, D, E and F) from wild-caught broodstock at 16 and 19 dph.

From 22 dph onwards, caudal, dorsal and anal fin rays were included in the evaluations (Fig. 5). In stages 22 and 25 dph, the incidence of lordosis, abnormal vertebrae and dorsal and anal fin anomalies were not detected. As observed at 22 dph, offspring A at 25 dph were closer to scoliosis and offspring E were closer to head anomalies and kyphosis. Offspring C, which were closest to anomalies in the previous stage (before 22 dph), were located closer to growth parameters in 22 and 25 dph.

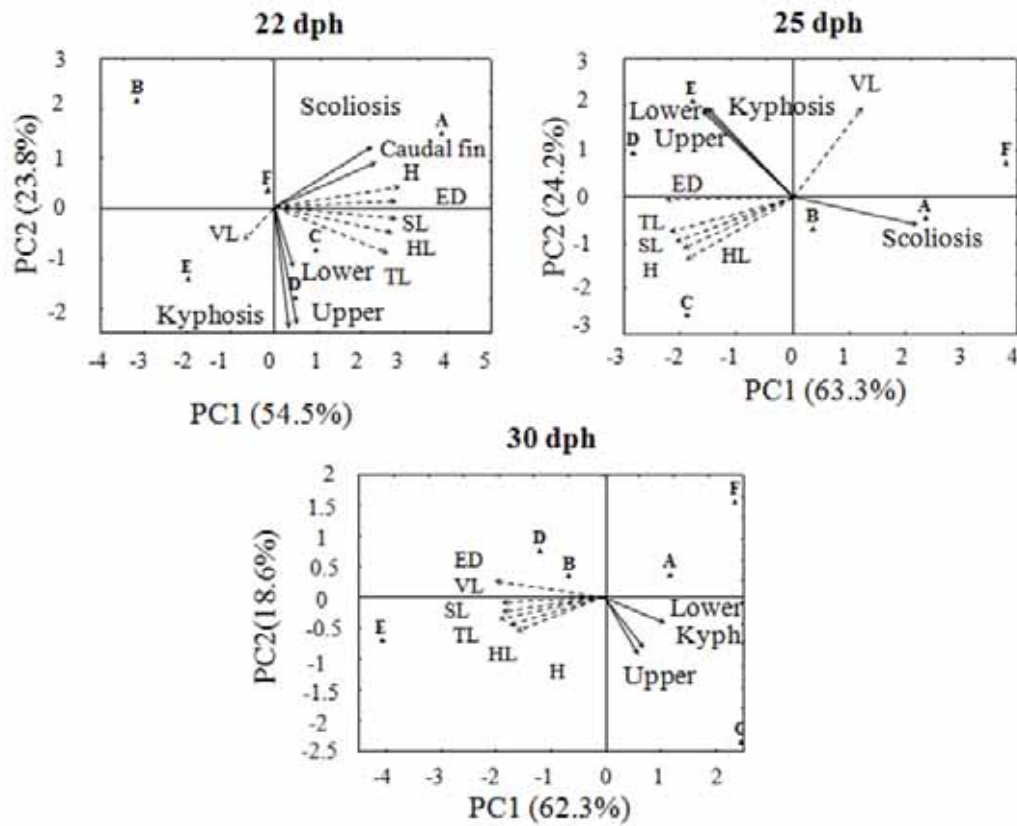


FIGURE 5. Principal components analysis (PC) of skeletal anomalies and morphometric parameters of 6 offspring (A, B, C, D, E and F) from wild-caught broodstock at 22, 25 and 30 dph.

At the end of observations (30 dph), the fish evaluated showed that only head anomalies persisted over development. These anomalies, however, did not prevail in specific offspring. In addition, offspring C and F were far from the central axis, and other groups, including offspring B, which exhibited the lowest SL at the end of the experiment (~8.51 mm), were randomly distributed.

Discussion

Owing to concerns about the quality of larvae produced in aquaculture, an increasing number of studies have provided information on survival, viability, growth performance,

298 biochemical profile (protein, amino acids, fatty acids, lipids and minerals) and anomaly
299 incidence in larvae grown under different farming conditions. These parameters may indicate
300 larval quality and depend not only on broodstock quality, but also on fish genetics and
301 nutrition (Izquierdo et al. 2001, Furuita et al. 2002, 2003, 2007).

302 The present study showed the influence of pacu broodstock on larval quality by
303 assessing growth parameters and skeletal anomalies in the offspring. To that end, the
304 offspring from the different breeding pairs were reared under identical conditions (stocking
305 density, temperature, water quality, food and handling), and although they had similar length
306 at the beginning of the study, differences in growth were detected by the end of the
307 observations. Even when skeletal anomalies occurred at relatively low frequency (e.g.
308 maximum of 17.8% lordosis at 22 dph), they were detected in pacu larvae produced by wild-
309 caught broodstock, which are less susceptible to genetic problems from inbreeding. In a recent
310 study, Lanes et al. (2012) compared the quality of eggs and larvae from wild-caught and
311 farmed-reared Gadus morhua broodstocks and found anomaly incidence in 10.6% and 12.6%
312 of the newly-hatched larvae, respectively. They reported that the main anomalies (kyphosis,
313 lordosis, scoliosis and their combinations) occurred in larvae from hatchery, and were related
314 to the intensive handling and inbreeding.

315 In a broad analysis, all the types of skeletal anomalies were found in the pacu larvae.
316 Their occurrence was not restricted to specific stages of development (sampling day), and
317 were observed from the immediate post-hatching period, when larvae still rely on endogenous
318 reserves, to 30 dph, when skeletal structures were practically ossified. The incidence of
319 anomalies in pacu larvae over time indicates the importance of typological studies and
320 assessment of skeletal anomaly frequency, since they can cause a series of economic losses,
321 affecting the production of juvenile and adult fish (Sfakianakis et al. 2006, Boglione et al.
322 2009, Cobcroft et al. 2012).

323 The use of principal components analyses allowed evaluating the ordination of
324 anomalies throughout larval growth and osteological development, correlating them to
325 morphometric parameters. This permitted combining a significant amount of information on
326 pacu larvae tendency to developing different types of skeletal anomalies. In the first days of
327 development, different types of notochord flexion in larvae were associated to their standard
328 length (SL). Physiological and morphological changes observed in early development are
329 rapid, and many factors (environmental, nutritional and genetic) can affect larval

330 development, thereby triggering malformations. When fish initiate free swimming soon after
331 hatching, the structures used for larval locomotion are highly stressed although they are not
332 completely formed (Sanchez et al. 2011), which can promote malformations.

333 At 6 dph, larvae began developing not only in length, but also increased muscle fiber
334 formation, as indicated by the measures of body height. Accordingly, the epiaxial muscle
335 mass and number of myoseptum also increases in pacu larvae at 5 dph (Leitão et al. 2011).
336 After 8 dph, anomalies started affecting growth parameters, and offspring B (8dph), C (16 and
337 19 dph) and D (19 dph), were distributed close to the growth parameters and oppositely to
338 skeletal deformities. In common carp larvae reared until they reached 200-300 g, abnormal
339 fish are smaller than normal fish, illustrating the effects of anomaly on growth (Al-Harbi
340 2001).

341 The incidence of upper and lower jaw anomalies was inversely correlated with head
342 length (HL) and eye diameter (ED), which can be attributed to changes in larval head shape.
343 Lower jaw malformation was the most frequent anomaly in pacu larvae at 30 dph (7.8%),
344 whereas anomaly in the upper jaw affected only 3.1% of larvae. In zebrafish, 60% of the head
345 bones are formed from a cartilage template, and this occurs during the early development of
346 the larvae. Therefore, if any problem arises during hatching, these skeletal structures will be
347 the first affected, resulting in malformations (Strecker et al. 2013). In a study on common
348 carps, 17.4% of the anomalies occurred in the head, including the upper and lower jaws, and
349 this reflected in lower growth compared to normal fish (Al-Harbi 2001).

350 Offspring with higher proximity to anomalies such as lordosis and scoliosis exhibited
351 lower SL at 13 dph. On the other hand, this relation was not observed in larvae exhibiting
352 kyphosis, suggesting that it exerts a lesser effect on pacu larval growth compared to other
353 types of column flexion. Although kyphosis and lordosis affected the study population in
354 similar proportions (4.7% and 4.8%, respectively), the latter had a greater effect on larval
355 growth. This was marked in offspring E, which achieved a high growth rate at the end of the
356 experiment, despite the high incidence of kyphosis. Comparing the different categories of
357 skeletal anomalies, Witten et al. (2009) proposed 20 types for the vertebral column of the
358 Atlantic salmon, Salmo salar. In pacu larvae we identified kyphosis, scoliosis, lordosis and
359 undersized vertebral bodies, the latter described as anomalous vertebrae.

360 Lordosis is considered the most severe vertebral column anomaly in marine fish.
361 However, for freshwater fish it is described in only a few species, including the common carp

(Al-Harbi 2001), zebrafish (Gavaia 2006), catfish, Clarius gariepenius, tilapia, Oreochromis niloticus (Eissa et al. 2009), and Poecilia wingei (Arbuatti et al. 2013). Some of the factors promoting vertebral anomalies in fish of different species are the absence of a functional swim bladder (Jacquemond 2004), traumatic injuries during capture or transport, and trauma related to strong water flow (Arbuatti et al. 2013). In the present study, lordosis was one the most frequent anomalies (62 fish), but the cases detected were not very severe. Offspring D exhibited the highest proportion (11.6%), corresponding to almost one-third of lordosis diagnoses (24 fish). In addition, lordosis incidence was observed throughout the samplings, both before and after swim bladder inflation (5 dph). Moreover, the pacu larvae tested were not subjected to transportation, remaining in tanks supplied with mild and constant water flow.

The fin rays were completely ossified and were evaluated from 22 dph (~8.66 mm SL) onwards. Only caudal fin rays showed anomalies, albeit infrequent (1.3%). Fin ray anomaly has not been described in larvae of other freshwater fish, but anomaly occurrence in the caudal complex of marine fish such as larvae of Sparus aurata (Boglione et al. 2001) and postlarvae of Scophthalmus maximus (Tong et al. 2012) were found to increase after larval metamorphosis. Caudal fin anomalies were not significant in the pacu larvae under study, likely because this fish species does not undergo drastic transformations during transition from larva to juvenile, as flatfish do. Furthermore, the structures of pacu caudal fins (rays) and vertebrae (hypural bones) were analyzed separately. In the present study we have considered marine fish as a reference for types and incidence of larvae deformity because this information is useful in characterizing the caudal complex and the different forms of assessing the structures in this region. In addition, these data contribute to filling the information gap on caudal complex anomalies in freshwater species.

According to the pattern of anomaly ordination in relation to growth parameters at 22, 25 and 30 dph, offspring with higher anomaly incidence, such as offspring F, exhibited poor growth performance (mean SL of 8.51 ± 0.52 mm) compared to those with lower prevalence of skeletal anomalies, such as offspring E (mean SL of 10.77 ± 0.61 mm). Offspring B, C and D, which were also affected by severe anomalies, exhibited low growth performance (intermediate SL in the final evaluation) despite being positioned close to growth parameters throughout development. These structures, responsible for feeding and locomotion (Osse and

393 van den Boogaart 1999, 2004), activities that are directly related to fish survival, greater
394 metabolic investment is required to ensure normal fish development.

395 In conclusion, we reported, for the first time, skeletal anomalies in the different larval
396 stages of pacu fish. Accordingly, studies on the causes of skeletal malformation are needed to
397 reduce the economic losses from larval anomalies in hatched-reared pacu fish. The anomalies
398 reported compromise the development and behavior of pacu larvae by impairing growth,
399 hindering locomotion (due to vertebral column and fin anomalies), limiting food capture
400 (owing to head anomalies) and ultimately increasing mortality.

401

402 **Acknowledgments**

403 The authors are grateful to the Hydrology and Aquaculture Station of Duke Energy
404 Brazil for providing the fish and structure to conduct the experiment, and to São Paulo
405 Research Foundation (FAPESP) for the financial support (Grants 2008/57411-4 and
406 2010/09782-3).

407

408 **Literature Cited**

409 **Alaya, H. B., R. Galzin, J. P. Quignard, and M. Trabelsi.** 2011. Spinal deformities in the
410 black-striped pipefish Syngnathu sabaster (Pisces, Syngnathidae) from the Tunis North
411 Lake Tunisia. Chemosphere 82:318-320.

412 **Al-Harbi, A. H.** 2001. Skeletal deformities in cultured common Carp Cyprinus Carpio L.
413 Asian fish Sci1. 4:247-254.

414 **Al-Mamry J. M., L. A. Jawad, I. H. Al-Rasady and S. H. Al-Habsi.** 2010. First record of
415 dorsal and anal fin deformities in silver pomfrets, Pampus argenteus (Stromateidae,
416 Actinopterygii). Anales de Biología. 32:73-77.

417 **Arbuatti, A., L.D. Salda, and M. Romanicci.** 2013. Spinal deformities in a wild line of
418 Poecilia wingei bred in captivity: report of cases and review of the literature. Asian
419 Pacific Journal of Tropical Biomedicine 3:1860190.

420 **Bird, C. B., and P. M. Mabee.** 2003. Developmental morphology of the axial skeleton of the
421 zebrafish, Daniorerio (Ostariophysi: Cyprinidae). Developmental Dynamics 228: 337-
422 357.

- 423 **Boglione, C., C. Costa, P. Di Dato, G. Ferzini, M. Scardi, and S. Cataudella.** 2003.
 424 Skeletal quality assessment of reared and wild sharpsnout sea bream and pandora
 425 juveniles. *Aquaculture* 227:373-394.
- 426 **Boglione, C., F. Gagliardi, M. Scardi, and S. Cataudella.** 2001. Skeletal descriptors and
 427 quality assessment in larvae and post-larvae of wild-caught and hatchery-reared gilthead
 428 sea bream (*Spaurus aurata* L. 1758). *Aquaculture* 192:1-22.
- 429 **Boglione, C., G. Marino, M. Giganti, A. Longobardi, P. De Marzi, and S. Cataudella.**
 430 2009. Skeletal anomalies in dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe 1834)
 431 juveniles reared with different methodologies and larval densities. *Aquaculture* 291:48-
 432 66.
- 433 **Cahu, C., J. Zambonino-Infante, and T. Takeuchi.** 2003. Nutritional components affecting
 434 skeletal development in fish larvae. *Aquaculture* 227:245-248.
- 435 **Cobcroft, J. M., A. C. Shu-Chien, M. Kuah, A. Jaya-Ram, and S. C. Battaglione.** 2012.
 436 The effects of tank colour, live food enrichment and greenwater on the early onset of jaw
 437 malformation in striped trumpeter larvae. *Aquaculture* 356-357: 61-72.
- 438 **Darias, M. J., O. Lan Chow Wing, C. Cahu, J. L. Zambonino-Infante, and D. Mazurais.**
 439 2010. Double staining protocol for developing European sea bass (*Dicentrarchus labrax*)
 440 larvae. *Journal of Applied Ichthyology* 26:280-285.
- 441 **Deschamps, M. H. and J. Y. Sire.** 2010. Histomorphometrical studies of vertebral bone
 442 condition in farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal Applied Ichthyology*
 443 26: 377-380.
- 444 **Eissa, A. E., M. Moustafa, I. N. El-Hussiny, S. Saeid, S. Saleh, and T. Borhan.** 2009.
 445 Identification of some skeletal deformities in freshwater teleosts raised in Egyptian
 446 aquaculture. *Chemosphere* 77: 419-425.
- 447 **Estevão, M. D., N. Silva, B. Redruello, R. Costa, S. Gregório, A.V.M. Canário, and D.M.**
 448 **Power.** 2011. Cellular morphology and markers of cartilage and bone in the marine
 449 teleost *Spurus auratus*. *Cell Tissue Research* 343: 619-335.
- 450 **Faustino, M., and D. M. Power.** 1998. Development of osteological structures in the sea
 451 bream: vertebral column and caudal fin complex. *Journal of Fish Biology* 52: 11-22.
- 452 **Furuita, H., H. Tanaka, T. Yamamoto, N. Suzuki, and T. Takeuchi.** 2002. Effects of high
 453 levels of n3 HUFA in broodstock diet on egg quality and egg fatty acid composition of
 454 Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 210:323-333.

- 455 **Furuita, H., K. Hori, N. Suzuki, T. Sugita, and T. Yamamoto.** 2007. Effect of n-3 and n-6
456 fatty acids in broodstock diet on reproduction and fatty acid composition of broodstock
457 and eggs in the Japanese eel Anguilla japonica. Aquaculture 267:55-61.
- 458 **Furuita, H., T. Yamamoto, T. Shima, N. Suzuki, and T. Takeuchi.** 2003. Effect of
459 arachidonic acid levels in broodstock diet on larval and egg quality of Japanese flounder,
460 Paralichthys olivaceus. Aquaculture 220:725-735.
- 461 **Gavaia, P. J., M. T. Dinis, and M. L. Cancela.** 2002. Osteological development and
462 abnormalities of the vertebral column and caudal skeleton in larval and juvenile stages of
463 hatchery-reared Senegal sole (Solea senegalensis). Aquaculture 211:305-323.
- 464 **Gavaia, P. J., D. C. Simes, J.B. Ortiz-Delgado, C. S. B. Viegas, J. P. Pinto, R. N. Kelsh,**
465 **M. C. Sarasquete, and M. L. Cancela.** 2006. Osteocalcin and matrix Gla protein in
466 zebrafish (Danio rerio) and Senegal sole (Solea senegalensis): Comparative gene and
467 protein expression during larval development through adulthood. Gene Expression
468 Patterns 6: 637-652.
- 469 **Gjerde, B., M. J. R. Pante, and G. Baeverfjord.** 2005. Genetic variation for a vertebral
470 deformity in Atlantic salmon (Salmo salar). Aquaculture 244:77-87.
- 471 **Gorman, K. F., and F. Breden.** 2007. Teleosts as models for human vertebral stability and
472 deformity. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 145: 28-38.
- 473 **Haga, Y., T. Suzuki, and T. Takeuchi.** 2002. Retinoic acid isomers malformations in
474 postembryonic development of the Japanese Flounder, Paralichthys olivaceus. Zoological
475 Science 19:1105-1112.
- 476 **Izquierdo, M.S., J. Socorro, and J. Roo.** 2010. Studies on the appearance of skeletal
477 anomalies in red porgy: effect of culture intensiveness, feeding habits and nutritional
478 quality of live preys. Journal Applied Ichthyology 26: 320-326.
- 479 **Izquierdo, M.Z., H. Fernandez-Palacios, and A. G. J. Tacon.** 2001. Effect of broodstock
480 nutrition on reproductive performance of fish. Aquaculture 197:25-42.
- 481 **Jacquemond F.** 2004. Separated breeding of perch fingerlings (Perca fluviatilis L.) with and
482 without initial inflated swim bladder: comparison of swim bladder development, skeleton
483 conformation and growth performances. Aquaculture 239: 261-273.
- 484 **Jomori, R. K., D. J. Carneiro, E. B. Malheiros, and M. C. Portella.** 2003. Growth and
485 survival of pacu Piaractus mesopotamicus (Holmberg, 1887) juveniles reared in ponds or
486 at different initial larviculture periods indoors. Aquaculture 221:277-287.

- 487 **Karahan, B., B. Chatain, H. Chavanne, A. Vergnet, A. Bardon, P. Haffray, M. Dupont-**
 488 **Nivet, and M. Vandeputte.** 2012. Heritability and correlations of deformities and
 489 growth-related traits in the European sea bass (Dicentrarchus labrax, L) in four different
 490 sites. *Aquaculture Research* 1-11.
- 491 **Kendall, Jr., A. W.; E. H. Ahlstrom, and H. G. Moser.** 1984. Early life history stages of
 492 fishes and their characters. Pages 11-22 in H. G. Moser, W. J. Richards, D. M. Cohen, M.
 493 P. Fahay, Jr. A. W. Kendall, and S. L. Richardson, editors. *Ontogeny and systematics of*
 494 *fishes: based on International Symposium dedicated to the memory of Elbert Halvor*
 495 *Ahlstrom. Special publication/American Society of Ichthyologists and Herpetologists*
 496 [New York], USA.
- 497 **Koumoundouros, G., P. Divanach, and M. Kentouri.** 2001. The effect of rearing conditions
 498 on development of saddleback syndrome and caudal fin deformities in Dentex dentex
 499 (L.). *Aquaculture* 200:285-304.
- 500 **Lall, S. P. and L. M. Lewis Mc-Crea.** 2007. Role of the nutrients in skeletal metabolism and
 501 pathology in fish. *Aquaculture* 267:3-19.
- 502 **Lanes, C. F. C., T. B. Teshome, S. Bolla, C. Martins, J. M. O. Fernandes, A. Bianchini,**
 503 **V. Kiron, and I. Babiak.** 2012. Biochemical composition and performance of Atlantic
 504 cod (Gadus morhua L.) eggs and larvae obtained from farmed and wild broodstocks.
 505 *Aquaculture* 324-325:267-275.
- 506 **Leitão, N. J., M. D. Pai-Silva, F. L. A. Almeida, and M. C. Portella.** 2011. The influence
 507 of initial feeding on muscle development and growth in pacu Piaractus mesopotamicus
 508 larvae. *Aquaculture* 315: 78-85.
- 509 **Madsen L and I. Dalsgaard.** 1999. Vertebral column deformities in farmed rainbow trout
 510 (Oncorhynchus mykiss). *Aquaculture* 171:41-48.
- 511 **MPA.** 2012. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura, Brasil 2010: Ministério da Pesca e
 512 Aquicultura. 129 p. Accessed in September 4, 2012, at
 513 [http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20Estat%C3](http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20Estat%C3%ADstico%20MPA%202010.pdf)
 514 [%ADstico%20MPA%202010.pdf](http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20Estat%C3%ADstico%20MPA%202010.pdf)
- 515 **Nakatani, K., A. A. Agostinho, G. Baumgartner, A. Bialecki, P. V. Sanches, M. C.**
 516 **Makrakis, and C. S. Pavanelli.** 2001. Ovos e larvas de peixes de água doce:
 517 desenvolvimento e manual de identificação. EDUEM, Maringá, Brazil.

- 518 **Osse, J.W.M. and J.G.M. van den Boogaart.** 1999. Dynamic morphology of fish larvae,
519 structural implications of friction forces in swimming, feeding and ventilation. *Journal of*
520 *Fish Biology* 55: 156–174.
- 521 **Osse, J.W.M. and J.G.M. van den Boogaart.** 2004. Allometric growth in Fish Larvae:
522 Timing and Function. Pages 167-194 in J.J. Govoni, editor. *The Development of Form*
523 *and Function in Fishes and the Question of Larval Adaptation*. American Fisheries
524 Society Symposium 40 [Bethesda], USA.
- 525 **Owen, M. A. G., B. Eynon, S. Woodgate, S. J. Davies, and S. Fox.** 2012. Increased water
526 current induces micro-architectural changes to the vertebral bone of juvenile rainbow trout
527 (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 344-349: 141-146.
- 528 **Potthoff, T.** 1984. Clearing and staining techniques. Pages 35-37 in H.G. Moser, W.J.
529 Richards, D.M. Cohen, M.P. Fahay, A.W. Kendall Jr. and S.L. Richardson, editors.
530 *Ontogeny and Systematics of Fishes*. American Society of Ichthyologists and
531 Herpetologists. Special publication.
- 532 **Queiroz, F. J., J. N. Lourenço, P. Kitamura, J. D. Scorvo Filho, J. E. Cyrino, N.**
533 **Castagnolli, W. C. Valentian, and G. Bernardinho.** 2005. Aquaculture in Brazil:
534 Research priorities and potential for further international collaboration. *World*
535 *Aquaculture Magazine* 36:45-50.
- 536 **Rafael, M. S., C. L. Marques, M. L. Parameswaran, M. L. Cancela, and V. Laizé.** 2010.
537 Fish bone-derived cell lines: an alternative in vitro cell system to study bone biology.
538 *Journal of Applied Ichthyology* 26: 230-234.
- 539 **Russo, T., L. Prestinicola, M. Scardi, E. Palamara, S. Cataudella and C. Boglione.** 2010.
540 Progress in modeling quality in aquaculture: an application of the Self-Organizing Map to
541 the study of skeletal anomalies and meristic counts in gilthead seabream (*Sparus aurata*,
542 L. 1758). *Journal of Applied Ichthyology* 26:360:365.
- 543 **Sanchez, R. C., E. B. Obregón, and M. R. Rauco.** 2011. Hypoxia is like ethiological factor
544 in vertebral column deformity of salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 316:13-19.
- 545 **Sfakianakis, D. G., E. Georgakopoulou, M. Kentouri, and G. Koumoundouros.** 2006.
546 Geometric quantification of lordosis effects on body shape in European sea bass,
547 *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture* 256:27-33.

- 548 **Strecker, R., S. Weigt and T. Braunbeck.** 2013. Cartilage and bone malformation in the
549 head of zebrafish (Danio rerio) embryos following exposure to disulfiram and acetic acid
550 hydrazide. *Toxicology and Applied Pharmacology* 268: 221-231.
- 551 **Taylor, W.R., and G.C. van Dyke.** 1985. Revised procedures for staining and clearing small
552 fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. *Cybiurn* 9:107–119.
- 553 **Tong, X. H., Q. H. Liu, S. H. Xu, D. Y. Ma, Z. Z. Xiao, Y. S. Xiao, and J. Li.** 2012.
554 Skeletal development and abnormalities of the vertebral column and of the fins in
555 hatchery-reared turbot Scophthalmus maximus. *Journal of Fish Biology* 80: 486-502.
- 556 **Witten, P. E., L. Gil-Martens, A. Huysseune, H. Takle, and K. Hjelde.** 2009. Towards a
557 classification and an understanding of developmental relationships of vertebral body
558 malformations in Atlantic salmon (Salmo salar L.). *Aquaculture* 295: 6-14.

CAPÍTULO 4- Anomalias esqueléticas em larvas de pacu provenientes de estoque de reprodutores formados em cativeiro

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a incidência de anormalidades esqueléticas em larvas de pacu provenientes de seis casais de reprodutores de diferentes origens de cativeiro: A1, A2, B1, B2, C1 e C2 em um intervalo de até 60 dias pós-eclosão (dpe). Larvas (n=1755) foram amostradas ao longo do tempo e coradas para distinção de osso e cartilagem para análise da incidência de anormalidades esqueléticas, verificando-se a presença (1) ou ausência (0) nas regiões da cabeça, coluna vertebral e nadadeiras. Foram mensurados parâmetros de comprimento total (CT) e padrão (CP) para acompanhar o crescimento das larvas, e calculou-se a regressão entre essas variáveis. A análise exploratória dos dados (análise de correspondência) foi utilizada para correlacionar a incidência dos tipos de anormalidades entre os casais de diferentes origens. O CP inicial foi uniforme entre as proles dos diferentes casais, porém houve variações no crescimento ao longo do desenvolvimento, com destaque para as dos casais A1 e B2. Foram verificados todos os tipos de anormalidades esqueléticas nas larvas dos diferentes casais, sendo que as proles dos casais C1 e C2 apresentaram predominância de anormalidades na mandíbula enquanto, B1 e B2 manifestaram mais lordose e escoliose, e A1 e A2 demonstraram-se mais próximos das anomalias no maxilar, vértebras e cifose. Assim, conclui-se que entre as proles de pacu há variações no crescimento, na incidência de anomalias esqueléticas e na prevalência das mesmas de acordo com a origem dos reprodutores, e de cada casal.

Palavras-chave: Peixes sul-americanos, qualidade das larvas, malformação esquelética, análise de correspondência.

1. Introdução

O pacu *Piaractus mesopotamicus* pertence à ordem Characiformes, e superordem Ostariophysi, os quais compõe aproximadamente 27% de todos os peixes e 75% dos peixes de água doce (Bird e Mabee 2003; Briggs 2005). É uma das espécies nativas mais cultivadas no Brasil, com aumento da sua

produção no último censo, passando de 15.190 t em 2008 para 21.689 t em 2011 (MPA, 2013).

Incidência de anormalidades esqueléticas pode reduzir a produção durante a fase inicial de desenvolvimento dos peixes. Isto porque o desenvolvimento inicial é a etapa mais crítica da criação, quando uma série de mudanças morfofisiológicas ocorre, e fatores exógenos (nutrição, manejo e ambiente) e endógenos (genéticos) podem influenciar negativamente o desenvolvimento normal, acarretando em diversos prejuízos, como baixas taxas de sobrevivência e crescimento (Koumoudouros et al. 2001, Sfakianakis et al. 2006, Owen et al. 2012, Gjerde et al. 2005, Karahan et al. 2012).

Entre os fatores exógenos causadores de anomalias, os mais estudados são os nutricionais, devido às dificuldades encontradas para atender as exigências durante a fase larval. Os componentes nutricionais que principalmente afetam o desenvolvimento ósseo normal são os lipídeos (fosfolipídeos e HUFA), proteínas (aminoácidos e peptídeos), vitaminas (ácido ascórbico, A, D, E, K) e minerais (cálcio e fósforo) (Cahu et al., 2003; Takeuchi, 2001; Lall e McCrea, 2007; Hemre et al., 2010). Quanto aos fatores ambientais e de manejo, os que se destacam são a densidade de estocagem (Boglioni et al., 2009), sistema de criação intensivo ou semi-intensivo (Roo et al., 2010), temperatura (Campinho et al., 2004) e cor do tanque (Cobcroft et al., 2001; Cobcroft e Battaglene, 2009; Cobcroft et al., 2012).

Ainda, fatores bióticos como os genéticos podem influenciar a ocorrência de anormalidades esqueléticas (Gjerde et al., 2005). Isto ocorre porque o fenótipo expresso nos peixes durante a ontogênese, modulado pela homeostase do desenvolvimento, pode manter-se por gerações, resistindo a alterações ambientais e genéticas. Porém, quando o estresse ambiental e/ou genético prevalece sobre a homeostase do desenvolvimento, a eficiência do processo normal diminui, e anormalidades podem surgir durante esta fase. De forma geral, esse processo pode ocasionar a presença de assimetria, variação nas contagens de caracteres merísticos, bem como malformações esqueléticas nos indivíduos (Clarke, 1995).

Apesar do grande número de estudos com objetivo de determinar as causas de anormalidades esqueléticas em larvas de peixes, esses se

concentram, na maioria, em espécies marinhas como, *Dentex dentex*, (Koumoundouros et al. 2001), *Dicentrarchus labrax* (Sfakianakis et al. 2006), *Solea senegalensis* (Gavaia et al. 2002, 2006), *Sparus aurata* (Boglione et al. 2001), *Salmo salar* (Witten et al. 2006, 2009), *Pampus argenteus* (Al-Mamry et al. 2010), *Pagrus pagrus* (Izquierdo et al. 2010) e *Syngnatus abaster* (Alaya et al. 2011), e algumas espécies de água doce, *Oncorhynchus mykiss* (Madsen e Dalsgaard 1999, Deschamps e Sire 2010), carpa camum (Al-Harbi 2001), *Danio rerio* (Gavaia 2006), *Clarius gariepinus*, *Oreochromis niloticus* (Eissa et al. 2009), e *Poecilia wingei* (Arbuatti et al. 2013). Pouco conhecimento há sobre a incidência dessas anormalidades em larvas de peixes sul-americanos, a não ser recente trabalho (Lopes et al. 2014) que descreve, pela primeira vez, a incidência de anormalidades esqueléticas nas regiões craniofacial, axial e apendicular de pacu de origem selvagem, durante o desenvolvimento inicial (1 a 30 dias pós-eclosão).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a incidência de anormalidades esqueléticas em larvas e juvenis de pacu, provenientes de estoques de reprodutores de diferentes origens de cativeiro, com o intuito de direcionar novos estudos que apontem as principais causas de anomalias ósseas e gerar informações que possam embasar, no futuro, a proposição de indicadores de qualidade larval.

2. Material e métodos

As larvas foram obtidas a partir da extrusão de gametas de estoques de reprodutores de pacu mantidos em cativeiro por cerca de seis gerações, provenientes de três pisciculturas distintas: A, B e C. No total, foram avaliadas as proles de seis casais de reprodutores, dois de cada piscicultura (A1, A2, B1, B2, C1 e C2). Após a eclosão, as larvas de cada casal foram distribuídas em tanques de 100L, no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos (LANOA), do Centro de Aquicultura da UNESP, na densidade de 15 larvas/L, onde foram mantidas por cerca de 60 dias. Nos dez primeiros dias pós-eclosão (dpe), 30 larvas de cada prole foram coletadas aleatoriamente a cada dois dias, a cada três dias até completarem 25 dpe, a cada cinco dias até 40 dpe e aos 50 e 60 dpe. Especificamente no caso das proles B1 e B2, a coleta teve início a

partir de 4 dpe, em função do transporte da piscicultura até o LANOA. As larvas receberam alimento vivo, composto por náuplios de artêmia recém-eclodidos, em quantidades preconizadas por Jomori et al. (2003), durante 20 dias de alimentação ativa, passando gradativamente para ração comercial (59,5% de proteína bruta e 4644,1 kcal.kg⁻¹ de energia bruta).

As características morfométricas foram avaliadas no período de 60 dpe, totalizando 1755 larvas analisadas. Para isso, os animais foram eutanaziados em solução de benzocaína a 0,02% e fixados em formalina 10% com tampão fosfato. Posteriormente, as amostras coletadas foram coradas com Azul de Alcian e Vermelho de Alizarina (Potthoff 1984, Darias et al. 2010) para distinção de osso e cartilagem. Juvenis de pacu, com mais de 50 dpe foram congelados e radiografados (Amplitude 26 kv, voltagem 600 mA e tempo de 500 ms) (Koumoundouros et al., 2000).

A avaliação da incidência de anomalias foi realizada em estereoscópio e as imagens foram capturadas em câmera fotográfica digital, com o software LEICA IM50. Foram mensurados o comprimento notocordal (CN, de 1 a 6 dpe), comprimento padrão (CP) e comprimento total (CT) das larvas, bem como avaliadas as estruturas ósseas para a determinação da incidência de anormalidades de acordo com o proposto por Boglione et al. (2001). Para isso, todas as larvas amostradas foram avaliadas para verificar a presença (1) ou ausência (0) das anormalidades descritas na Tabela 1 e Figura 1.

Larvas de 1 a 6 dpe foram avaliadas apenas quanto às flexões da notocorda. Ainda, foi avaliada a incidência de anormalidades nas vértebras da coluna de larvas de 16 a 60 dpe. Para a observação dos raios nas nadadeiras foram utilizados exemplares a partir de 22 dpe. Portanto, essas estruturas só foram analisadas quando encontravam-se completamente ossificadas, facilitando a distinção de anormalidades esqueléticas.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado (DIC) com seis tratamentos (proles dos seis casais de reprodutores). Os dados de comprimento padrão ou comprimento notocordal foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias foram analisadas pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de significância. Ainda, foi feita a regressão entre os parâmetros

morfométricos CT x CP. As análises foram realizadas no software Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 9.0).

Uma base de dados numéricos foi elaborada para calcular a incidência de anomalias esqueléticas (%) e também avaliar, descritivamente, os tipos presentes nas regiões do corpo, de acordo com os casais e ao longo do desenvolvimento das larvas. Além disso, foi realizada análise exploratória destes dados, utilizando análise de correspondência.

Tab. 1. Relação de anormalidades verificadas em larvas de pacu (*P. mesopotamicus*).

Regiões	
I	Cabeça
II	Coluna
III	Nadadeiras
Tipo	
1	Mandíbula
2	Maxila
3	Cifose
4	Escoliose
5	Lordose
6	Vértebras irregulares
7	Raios da nadadeira caudal
8	Raios da nadadeira dorsal
9	Raios da nadadeira anal

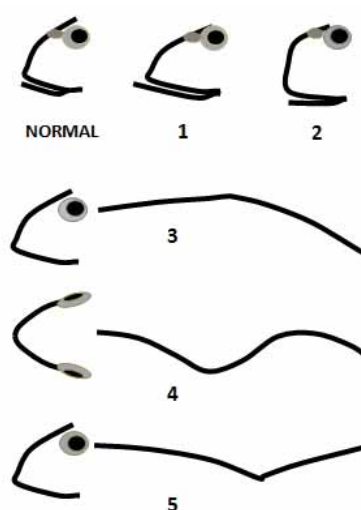


Figura 1. Esquema de algumas anomalias encontradas em larvas de pacu (*P. mesopotamicus*). 1. Mandíbula (prognatismo), 2. Maxila (focinho), 3. Cifose, 4. Escoliose e 5. Lordose. Desenho: L.E. Conceição.

3. Resultados

O CP foi a variável que melhor representou o crescimento das larvas (Tabela 2). A análise de regressão entre CT e CP resultou na equação $y = 1,2453x - 0,9318$ ($R^2 = 0,9972$), onde $y = CT$ e $x = CP$, por meio da qual o CT das larvas pode ser estimado.

Não houve diferença estatística do comprimento da notocorda entre as larvas das diferentes origens, de 1 a 6 dpe, incluindo as proles B1 e B2 (início

das coletas com 4 dpe). Aos 8 dpe, a prole C1 apresentou média significativamente maior que as demais, porém isso não se manteve aos 10 dpe, quando as larvas B2 apresentaram os maiores valores, seguido pelas larvas C1 e C2 ($P < 0,05$).

Tab. 2. Comprimento notocordal (1 a 6 dpe) e comprimento padrão (mm) de larvas de pacu, provenientes de reprodutores originados em cativeiro, de diferentes origens (A1-2, B3-4, e C5-6), coletadas ao longo de 60 dias pós-eclosão.

Casal	N	Dias pós-eclosão (dpe)													
		1	2	4	6	8	10	13	16	19	22	25	30	35	60
A1	312	4,52	5,71	5,5	5,56	5,68 ^b	6,52 ^c	7,03 ^c	7,99 ^b	9,68 ^b	9,51 ^c	9,57 ^{bc}	11,75 ^c	12,28 ^c	32,01 ^a
A2	334	4,32	5,72	5,69	5,53	5,40 ^b	6,17 ^c	6,74 ^d	7,58 ^b	9,54 ^b	9,17 ^c	10,83 ^c	13,28 ^{bc}	15,05 ^b	29,56 ^b
B1	324	-	-	5,3	5,26	5,34 ^b	6,36 ^c	8,07 ^b	8,91 ^a	10,83 ^{ab}	9,74 ^c	12,98 ^b	14,13 ^b	17,63 ^{ab}	-
B2	327	-	-	5,51	5,44	5,75 ^b	7,27 ^a	9,24 ^a	8,69 ^a	11,60 ^a	12,55 ^a	14,33 ^a	17,88 ^a	18,20 ^a	-
C1	214	4,3	5,4	5,66	5,76	6,31 ^a	6,90 ^b	7,95 ^b	8,70 ^a	10,99 ^{ab}	10,31 ^b	-	-	-	-
C2	244	4,47	5,5	5,49	5,67	5,98 ^b	6,85 ^b	7,02 ^c	8,06 ^b	8,79 ^{bc}	10,31 ^b	-	-	-	-
Σ	1755	Média	4,40	5,58	5,52	5,54	5,74	6,68	7,67	8,32	10,24	10,27	11,92	14,26	30,79
		DP	0,11	0,16	0,14	0,17	0,37	0,40	0,94	0,52	1,07	1,21	2,13	2,60	1,73

Médias seguidas de letras diferentes nas colunas apresentaram diferenças estatísticas ao nível de 5% de significância (Tukey).

Aos 13 dpe, o CP da prole B2 foi estatisticamente maior em relação ao CP das demais e, aos 16 dpe, as proles A1, A2 e C1 foram estatisticamente inferiores. Por outro lado, aos 19 dpe, as diferenças estatísticas entre as proles dos casais aumentaram, sendo que B2 foi a prole que apresentou média superior, seguido por C1 e B1 que, por sua vez, não diferiram de A1 e A2. Ainda, a prole C2 apresentou o menor CP. Aos 22 dpe, a prole B2 continuou apresentando CP superior, C1 e C2 apresentaram médias de CP intermediárias (última coleta), e A1, A2 e B1 alcançaram os menores valores.

A partir de 25 dpe houve diferenças estatísticas entre as larvas, sendo que B2 apresentou CP superior aos demais até os 40 dpe, momento em que houve o encerramento do período de coletas das proles B1 e B2. Não houve diferença estatística entre os casais A1 e A2 aos 50 dpe. Ao fim do período experimental, com 60 dpe, a prole A1 apresentou CP estatisticamente superior a A2 nas mesmas condições de criação.

As proles dos seis casais foram analisadas quanto à incidência de anormalidades ao longo de 60 dpe (Tabela 3). De forma geral, foram observados em média 6,7% de animais com anomalias na mandíbula (Figura 2A), variando de 13,3 a 1,5% de acordo com o casal; 4,3% na maxila (Figura 2B); 3,1% com cifose (Figura 2C e E); 2,8% com escoliose (Figura 2D), sendo que essa anomalia não se manifestou em proles de determinados casais (e.g. A1 e C1); 9,5% com lordose (Figura 2C), também com variação alta entre os casais, de 3,4% a 23,5%; 5,1% nas vértebras; 5,0% na nadadeira caudal (Figura 2F), com destaque para 21,4% de ocorrência na prole C1 e 1,2% na nadadeira dorsal (Figura 2G). Não foram verificadas presença de anomalias na nadadeira anal de larvas e juvenis de pacu.

A incidência de anomalia nas proles por casal foi, em média, maior nos reprodutores B1 e C1, com 9,7 e 6,6, respectivamente, variando de 4,3 a 5,6% entre as larvas dos demais casais (Tabela 3).

Entre as anormalidades esqueléticas observadas nos animais, o tipo que mais ocorreu foi a lordose, com 40,1%, seguida pelas anomalias cifose, na mandíbula, escoliose, na maxila e por último nas vértebras (Figura 3).

Tab. 3. Incidência de anomalias esqueléticas em larvas de pacu provenientes de seis casais de reprodutores de diferentes origens (A1, A2, B1, B2, C1 e C2) criados em cativeiro por várias gerações.

Casal	Animais	Cabeça				Coluna vertebral				Raios das nadadeiras			%
		Mandíbula	Maxila	Cifose		Escoliose	Lordose	Vértebras		Caudal	Dorsal	Anal	
A1	362	7,9	3,5	1,9		0,0	4,2	4,3		0,0	0,0	0,0	4,3
A2	380	4,9	4,6	1,6		0,8	3,4	6,0		0,0	0,0	0,0	4,4
B1	324	1,5	6,3	8,6		11,1	23,5	4,7		0,0	0,0	0,0	9,7
B2	327	1,5	2,2	3,7		4,3	12,8	4,8		1,6	0,7	0,0	5,6
C1	214	11,3	5,2	1,4		0,0	4,7	7,1		21,4	6,3	0,0	6,6
C2	244	13,3	3,7	1,2		0,8	8,6	3,5		7,0	0,0	0,0	5,0
Σ	1851	Média	6,7	4,3	3,1	2,8	9,5	5,1		5,0	1,2	0,0	5,9
		DP	5,0	1,4	2,9	4,4	7,7	1,3		8,5	2,5	0,0	2,1

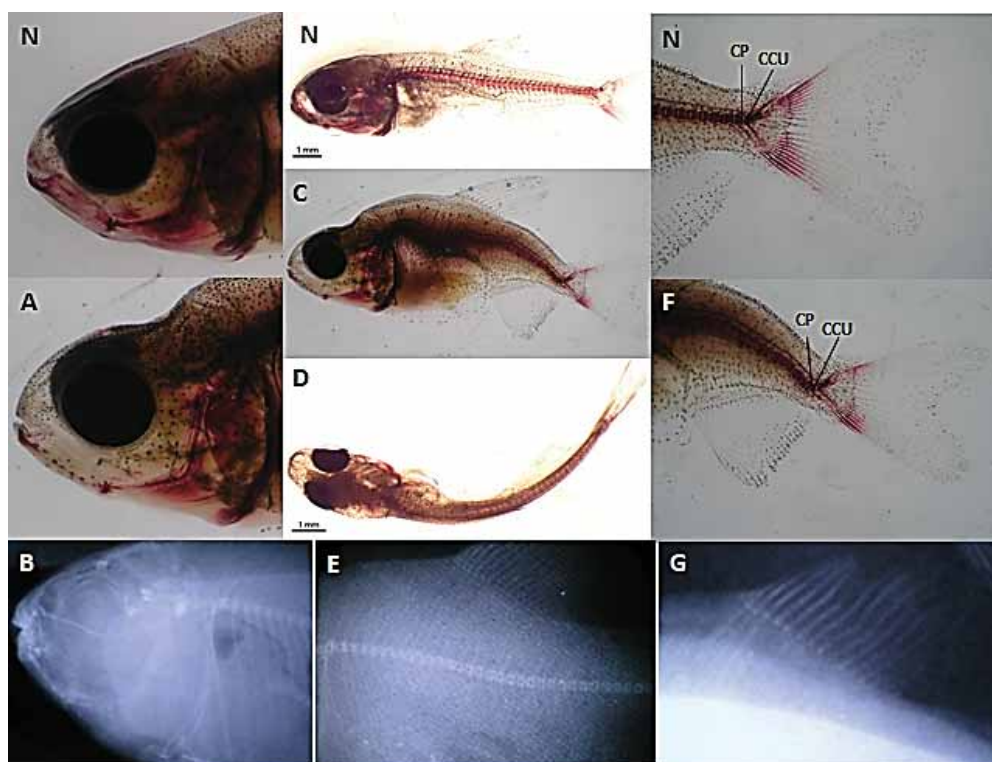


Figura 2. Anomalias esqueléticas encontradas em larvas de pacu: (N) Normal; (A) Maxila; (B) Mandíbula; (C) Cifose e lordose; (D) Escoliose; (E) Cifose; (F) Vértex do complexo caudal (centro pleural, CP e complexo centro ural, CCU) e (G) Raio da nadadeira dorsal.

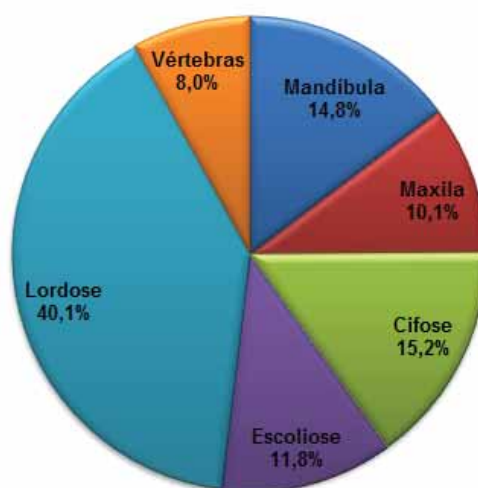


Figura 3. Frequência de ocorrência de anomalias esqueléticas em larvas de pacu, provenientes de reprodutores de cativeiro.

Todos os casais apresentaram larvas com algum tipo de anormalidade esquelética. A anomalia na mandíbula ocorreu principalmente nas proles provenientes da piscicultura C (C1 e C2). O mesmo ocorreu para anomalias nas nadadeiras caudal e dorsal. Anomalias na região da coluna vertebral (escoliose e lordose) ocorreram de forma mais acentuada em proles da piscicultura B, principalmente em B1. As larvas da piscicultura A apresentaram distribuição mais próxima às anomalias no maxilar e nas vértebras. Essas tendências podem ser vistas na Figura 4, que mostra a distribuição dos casais de acordo com a incidência de cada tipo de anomalia esquelética.

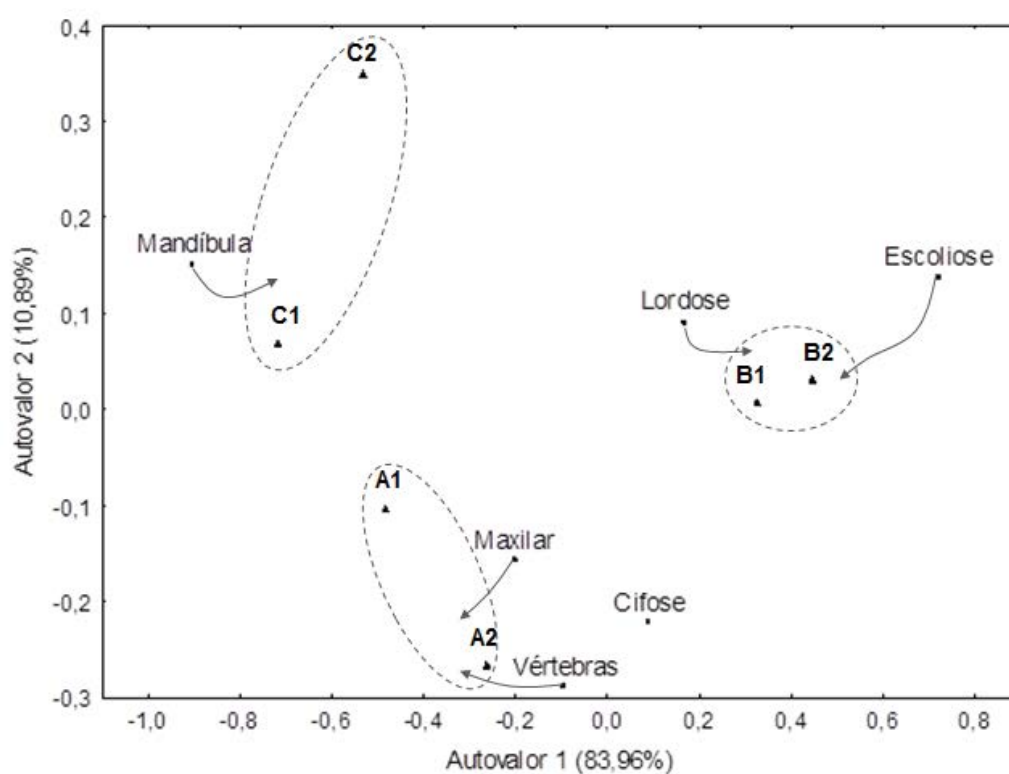


Fig. 4. Distribuição de anomalias esqueléticas encontradas em larvas de pacu, (proles A1, A2, B1, B2, C1 e C2), em relação à origem dos casais de reprodutores (pisciculturas A, B ou C).

4. Discussão

As larvas de pacu apresentaram dinâmica de crescimento variável entre as proles, tanto em função das origens distintas como pelas diferenças entre os casais. Assim, em geral, houve determinadas proles que cresceram mais, como as larvas do casal B2, e outras proles que, inicialmente, cresceram de forma mais lenta, como as dos casais A1 e A2. A boa qualidade das larvas e juvenis produzidos por aquicultura é um dos aspectos mais importantes para assegurar a continuidade e o fortalecimento da atividade. Diversos parâmetros têm sido mensurados com o intuito de avaliar a qualidade dos juvenis, entre eles o desempenho produtivo e a incidência de anormalidades esqueléticas. Esses parâmetros são dependentes não só da qualidade dos reprodutores, mas também da nutrição e da genética dos peixes (Izquierdo et al., 2001), como também de cuidados de manejo. Conhecer as causas e controlar a incidência de anormalidades esqueléticas se faz necessário para garantir melhor desempenho e, conseqüentemente, sobrevivência dos peixes até a fase de juvenil.

Anormalidades esqueléticas foram registradas nas proles de todos os casais estudados, variando em tipo e frequência em que ocorreram. As anomalias na coluna vertebral e cabeça foram as mais frequentes. Algumas foram evidenciadas em todas as proles, como a lordose, cifose, anomalias nas vértebras, mandíbula e maxila. Já a escoliose ocorreu, principalmente, nas proles dos casais da piscicultura B (B1 e B2). Entre todas as proles, a B1 apresentou a maior incidência de lordose e uma das maiores de escoliose, diferentemente da prole B2, mesmo sendo os reprodutores de mesma origem. A diferença entre as proles destes casais também se refletiu no desempenho das larvas, com a prole B1 crescendo de forma mais acelerada que a B2, principalmente nos estágios posteriores, a partir de 22 dpe.

Das anormalidades observadas, a lordose foi a que mais se destacou, seguida da cifose, anomalia na mandíbula e escoliose. A incidência de anormalidades esqueléticas em larvas de pacu obtidas de reprodutores de origem selvagem foi descrita em trabalho recente (Lopes et al., 2014). Em tese, essas larvas têm menor probabilidade de apresentar problemas genéticos por endocruzamentos, associados à presença de anormalidades esqueléticas, que proles originadas de reprodutores mantidos em cativeiro por várias gerações.

Comparado ao presente trabalho, a lordose foi o tipo de anomalia que mais acometeu as larvas de pacu, com média de 6,4% para larvas de reprodutores selvagens (Lopes et al., 2014) contra 9,5% para as de cativeiro. Da mesma forma, a incidência desta deformidade predominou em larvas de *Gadus morhua*, o que foi atribuído a fatores ambientais, como manejo, e genéticos, como endogamia (Lanes et al., 2012).

Na região da cabeça, o destaque foi para incidência de má-formação mandibular em larvas de pacu, encontrada em 2,5% das larvas de origem selvagem (Lopes et al., 2014) e 6,7% em larvas de cativeiro. Apesar do aumento da frequência, estes valores não chegam a ser tão preocupantes quanto o registrado para carpa comum, que apresentou 17,2% de anormalidades na cabeça, afetando inclusive o crescimento dos peixes anormais (Al-Harbi, 2001). Nesse ponto, é interessante destacar que essa espécie vem sendo mantida em cativeiro por mais de três mil anos, e baixa variabilidade genética da população foi detectada (Aliah et al., 2000), o que pode explicar tão elevada taxa de anormalidades. Os demais tipos de anomalias, como nos raios das nadadeiras, foram menos frequentes nas larvas de pacu estudadas no presente trabalho, com exceção das localizadas nas vértebras.

Em média, a incidência de anomalias foi maior nas larvas dos casais B1 e C1, em torno de 8 a 10%. Mais especificamente, por meio da análise multivariada de correspondência, a influência da origem das proles pode ser claramente observada e relacionada à incidência de cada tipo de anomalia registrada. As proles C1 e C2 destacaram-se por apresentar maior porcentagem de anormalidades na cabeça (mandíbula), com moderada presença de anomalias nas vértebras e nadadeiras caudal e dorsal, enquanto as proles B1 e B2 demonstraram maior incidência de flexões na coluna vertebral, principalmente lordose. Considerando que no presente estudo as condições de criação e o manejo alimentar foram iguais para todas as proles, pode-se descartar a influência ambiental e nutricional sobre a presença destas anomalias. Resta, portanto, o efeito do fator genético, que pode estar relacionado à utilização de híbridos, endogamia, genes hereditários, e até fatores epigenéticos, característico dos estoques de reprodutores de cada origem, o que tem sido estudado para várias espécies, como salmão (Gjerde et al., 2005; Kause et

al., 2007), truta (Kause et al., 2005) e carpa (Kocour et al., 2006). Quando o efeito do ambiente é controlado e sua influência sobre o fenótipo for mínima, o fator genético passa a ser questão importante a ser avaliada. Isto porque a correlação genética entre anomalias esqueléticas e crescimento indica que a ocorrência destas anormalidades pode aumentar quando os peixes são selecionados, por exemplo, para maior ganho de peso (Karahan et al., 2012).

A constatação de ocorrência de anormalidades esqueléticas em proles de pacu de diferentes origens mantidas em cativeiro serve como alerta para o manejo reprodutivo e produção de juvenis nas estações de piscicultura. A fim de garantir boa qualidade dos juvenis, vários aspectos devem ser considerados para evitar prejuízos futuros à atividade aquícola, destacando-se especialmente a origem genética dos estoques reprodutores (Taniguchi, 2003). Desta forma, o levantamento da ocorrência de anomalias serve como base para investigações das possíveis causas, uma vez que diferentes tipos de anomalias se manifestaram, diferentemente, de acordo com a origem de criação de cada prole. Posto de outra forma, mesmo tendo sido observadas variações entre os casais da mesma origem, os resultados sugerem que pode haver predomínio de determinadas anomalias nas diferentes pisciculturas.

O pacu é espécie altamente prolífera, e manejos reprodutivos inadequados, como a indução à desova de apenas um (ou pouco mais que um) casal reprodutor, já seria suficiente para abastecer uma piscicultura, mas tal prática promove a redução da variabilidade genética (Moreira et al., 2007; Wasko et al., 2004; Porta et al., 2006). Essa diminuição, por sua vez, aliada ao aumento da endogamia (ou consanguinidade, que consiste no cruzamento de indivíduos aparentados, geneticamente semelhantes), reduz a capacidade que os peixes possuem de se adaptarem a diferentes condições ambientais, além da redução da resistência a doenças (Taniguchi, 2003). Desta forma, um dos principais cuidados que deveriam ser considerados pelo setor produtivo é com o material genético que estará sendo formado nas estações de piscicultura, principalmente quando se trata da formação de novos lotes de reprodutores.

A baixa variabilidade genética do pacu já é vista como problema no ambiente natural, devido à construção de barragens para geração de energia elétrica nos rios

onde ocorrem, que limitam sua locomoção, durante o período reprodutivo (Povh et al., 2008). Por outro lado, nas pisciculturas, este problema é ainda maior, como verificado por Povh et al. (2008, 2011), que compararam a variabilidade genética de pacus provenientes do Rio Paranapanema a de reprodutores de duas estações de piscicultura distintas. Tais problemas genéticos podem refletir no desempenho e sobrevivência dos animais de criação, por meio de anormalidades morfológicas (Mustafa et al., 2003), entre elas, as esqueléticas. Dessa forma, se não houver monitoramento genético, a tendência é que haja cada vez mais, e com maior gravidade, incidência de anomalias morfológicas.

Em síntese, conclui-se que entre as proles de pacu há variações no crescimento, na incidência de anomalias esqueléticas e na prevalência das mesmas de acordo com a origem dos reprodutores, e de cada casal. Isso, provavelmente, ocorre devido às características de cada estoque de reprodutor formado e mantido em pisciculturas por várias gerações, o que pode ser em relação às características genéticas destas populações. Desta forma, estudos sobre os parâmetros genéticos de populações de pacu são necessários para a elucidação desses fatores com o intuito de evitar a incidência de anormalidades esqueléticas, almejando melhor qualidade dos juvenis produzidos por aquicultura.

5. Referência bibliográfica

ALAYA, H. B.; GALZIN, R.; QUIGNARD, J. P.; TRABELSI, M. Spinal deformities in the black -striped pipefish *Syngnathu sabaster* (Pisces, Syngnathidae) from the Tunis North Lake Tunisia. **Chemosphere**, v. 82, p. 318-320, 2011.

AL-HARBI, A. H. Skeletal deformities in cultured common Carp *Cyprinus Carpio* L. **Asian fish Science**, v. 4, p. 247-254, 2001.

ALIAH, R. S.; TANIGUCHI, N. Comparison of genetic variability in nine domesticated stocks Indonesian common carp by using microsatellite DNA markers. **Fish Genetics and Breeding Science**, v. 28, p. 121-130, 1999.

AL-MAMRY J. M.; JAWAD, L. A.; AL-RASADY, I. H.; AL-HABSI, S. H. First record of dorsal and anal fin deformities in silver pomfrets, *Pampus argenteus* (Stromateidae, Actinopterygii). **Anales de Biología**, v. 32, p. 73-77, 2010.

BIRD, C. B.; MABEE, P. M. Developmental morphology of the axial skeleton of the zebrafish, *Danio rerio* (Ostariophysi: Cyprinidae). **Developmental Dynamics**, v. 228, p. 337-357, 2003.

BOGLIONE, C., GAGLIARDI, F.; SCARDI, M.; CATAUDELLA, S. Skeletal descriptors and quality assessment in larvae and post-larvae of wild-caught and hatchery-reared gilthead sea bream (*Spaurus aurata* L. 1758). **Aquaculture**, v. 192, p. 1-22, 2001.

BOGLIONE, C., MARINO, G.; GIGANTI, M.; LONGOBARDI, A.; DE MARZI, P.; CATAUDELLA, S. Skeletal anomalies in dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe 1834) juveniles reared with different methodologies and larval densities. **Aquaculture**, v. 291, p. 48-66, 2009.

CAHU, C., ZAMBONINO-INFANTE, J.; TAKEUCHI, T. Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. **Aquaculture**, v. 227, p. 245-248, 2003.

CAMPINHO, M. A., MOUTOU, K. A.; POWER, D. M. Temperature sensitivity of skeletal ontogeny in *Oreochromis mossambicus*. **Journal of Fish Biology**, v. 65, p. 1003-1025, 2004.

CLARKE, G. M. The genetic basis of the developmental stability: II. Asymmetry of extreme phenotypes revisited. **American Naturalist**, v. 146, p. 708-725, 1995.

COBCROFT, J. M., SHU-CHIEN, A. C., KUAH, M., JAYA-RAM, A.; BATTAGLENE, S. C. The effects of tank colour, live food enrichment and greenwater on the early onset of jaw malformation in striped trumpeter larvae. **Aquaculture**, v. 356-357, p. 61-72, 2012.

COBCROFT, J. M.; BATTAGLENE, S. C. Jaw malformation in striped trumpeter *Latris lineata* larvae linked to walling behavior and tank colour. **Aquaculture**, v. 289, p. 274-282, 2009.

COBCROFT, J. M.; PANKHURST, P. M.; SADLER, J.; HART, P. R. Jaw development and malformation in cultured striped trumpeter *Latris lineata*. **Aquaculture**, v. 199, p. 267-282, 2001.

DARIAS, M. J.; LAN CHOW WING, O.; CAHU, C.; ZAMBONINO-INFANTE, J. L.; MAZURAS, D. Double staining protocol for developing European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 26, p. 280-285, 2010.

DESCHAMPS, M. H.; SIRE, J. Y. Histomorphometrical studies of vertebral bone condition in farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Journal Applied Ichthyology**, v. 26, p. 377-380, 2010.

EISSA, A. E., M. MOUSTAFA, I. N. EL-HUSSINY, S. SAEID, S. SALEH, AND T. BORHAN. Identification of some skeletal deformities in freshwater teleosts raised in Egyptian aquaculture. **Chemosphere**, v. 77, p. 419-425, 2009.

FUIMAN, L. A. Ostariophysi: development and relationships. In: H.G. Moser, D.M. Cohen, M.P. Fahay, A.W. Kendall, Jr., W.J. Richards, and S.L. Richardson (Eds). **Ontogeny and Systematics of Fishes**. Special Publication n. 1, American Society of Ichthyologists and Herpetologists. Lawrence, Kansas, p. 126-137, 1984.

GAVAIA, P. J.; DINIS, M. T.; CANCELA, M. L. Osteological development and abnormalities of the vertebral column and caudal skeleton in larval and juvenile stages of hatchery-reared Senegal sole (*Solea senegalensis*). **Aquaculture**, v. 211, p. 305-323, 2002.

GAVAIA, P. J.; SIMES, D. C.; ORTIZ-DELGADO, J. B.; VIEGAS, C. S. B.; PINTO, J. P.; KELSH, R. N.; SARASQUETE, M. C.; CANCELA, M. L. Osteocalcin and matrix Gla protein in zebrafish (*Danio rerio*) and Senegal sole (*Solea senegalensis*): Comparative gene and protein expression during larval development through adulthood. **Gene Expression Patterns**, v. 6, p. 637-652, 2006.

GJERDE, B.; PANTE, M. J. R.; BAEVERFJORD, G. Genetic variation for a vertebral deformity in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, v. 244, p. 77-87, 2005.

HAMRE, K.; KROSSOY, C.; LOCK, E. MOREN, M. Roles of lipid-soluble vitamins during ontogeny of marine fish larvae. **Aquaculture Research**, v. 41, p. 745-750, 2010.

IZQUIERDO, M. S.; SOCORRO, J.; ROO, J. Studies on the appearance of skeletal anomalies in red porgy: effect of culture intensiveness, feeding habits and nutritional quality of live preys. **Journal Applied Ichthyology**, v. 26, p. 320-326, 2010.

KARAHAN, B.; CHATAIN, B.; CHAVANNE, H.; VERGNET, A.; BARDON, A.; HAFFRAY, P.; DUPONT-NIVET, M.; VANDEPUTTE, M. Heritability and correlations of deformities and growth-related traits in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L) in four different sites. **Aquaculture Research**, p. 1-11, 2012.

KAUSE, A.; RITOLA, O.; PAANANEN, T. Changes in the expression of genetic characteristics across cohorts in skeletal deformations of farmed salmonids. **Genetics Selection Evolution**, v. 39, p. 529-543, 2007.

KAUSE, A.; RITOLA, O.; PAANANEN, T.; WAHLROOS, H.; MANTYSAARI, E. A. Genetic trends in growth, sexual maturity and skeletal deformations, and rate of inbreeding in a breeding programme for rainbow trout. **Aquaculture**, v. 247, 177-187, 2005.

KOCOUR M.; LINHART O.; VANDEPUTTE M. Mouth and fin deformities in common carp: is there a genetic basis? **Aquaculture Research**, v. 37, p. 419 –422, 2006.

KOUMOUNDOUROS, G., DIVANACH, P.; KENTOURI, M. The effect of rearing conditions on development of saddleback syndrome and caudal fin deformities in *Dentex dentex* (L.). **Aquaculture**, v. 200, p. 285-304, 2001.

KOUMOUNDOUROS, G.; DIVANACH, P.; SAVAKI, A.; KENTOURI, M. Effects of three preservation methods on the evolution of swimbladder radiographic

appearance in sea bass and sea bream juveniles. **Aquaculture**, v. 182, p. 17–25, 2000.

LALL, S. P.; LEWIS-MCCREA, L. M. Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish-an overview. **Aquaculture**, v. 267, p. 3-19, 2007.

LANES, C. F. C.; TESHOME, T. B.; BOLLA, S.; MARTINS, C.; FERNANDES, J. M. O.; BIANCHINI, A.; KIRON, V.; BABIAK, I. Biochemical composition and performance of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) eggs and larvae obtained from farmed and wild broodstocks. **Aquaculture**, v. 324-325, p. 267-275, 2012.

LOPES, T. S.; FREITAS, T. M.; JOMORI, R. K.; CARNEIRO, D. J.; PORTELLA, M.C. SKELETAL. Anomalies of pacu *Piaractus mesopotamicus* larvae from a wild-caught broodstock. *Journal of World Aquaculture Society*, v. 45, p. 15-27, 2014.

MADSEN, L.; DALSGAARD, I. Vertebral column deformities in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 171, p. 41-48, 1999.

MOREIRA, A. A.; HILSDORF, A. W. S.; SILVA, J. V.; SOUZA, V. R. Variabilidade genética de duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.521-526, 2007.

MPA, Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura**, Brasil 2010, 129 p. 2012. Disponível em: http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20Estat%20C3%ADstico%20MPA%202010.pdf

MUSTAFA, S.; RAHMAN, R. A.; RANSANGAN, J.; STEPHEN, L. Effects of hatchery rearing in Asian seabass, *Lates calcarifer*. In: Bert, T. M. (ed.). **Ecological and genetic implications of aquaculture activities**. Kluwer Academic Press, 2003.

OWEN, M. A. G.; EYNON, B.; WOODGATE, S.; DAVIES, S. J.; FOX, S. Increased water current induces micro-architectural changes to the vertebral bone of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 344-349, p. 141-146, 2012.

PORTA, J.; PORTA, J. M.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, G.; ALVAREZ, M. C. Genetic structure and genetic relatedness of a hatchery stock of Senegal sole (*Solea senegalensis*) inferred by microsatellites. **Aquaculture**, v.251, p.46-55, 2006.

POTTHOFF, T. Clearing and staining techniques. In: H.G. Moser, W.J. Richards, D.M. Cohen, M.P. Fahay, A.W. Kendall Jr. and S.L. Richardson, (Eds). **Ontogeny and Systematics of Fishes**. American Society of Ichthyologists and Herpetologists. Special publication, p. 35-37, 1984.

POVH, J. A.; RICARDO, P. R.; SIROL, R. N.; LOPERA-BARRERO, N. M.; JACOMETO, C. B.; VARGAS, L.; GOMES, P. C.; LOPES, T. S. Microsatellite analysis of pacu brood stocks used in the stocking program of Paranapanema River, Brasil. **Scientia Agricola**, v. 68, p. 308-313, 2011.

POVH, J. A.; RICARDO, P. R.; SIROL, R. N.; STREIT JUNIOR, D. P.; LOPERA-BARRERO, N. M.; VARGAS, L.; GOMES, P. C.; LOPES, T. S. Diversidade genética de pacu do Rio Paranapanema e do estoque de um programa de repovoamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, p.201-206, 2008.

ROO, J.; SOCORRO, J.; IZQUIERDO, M. S. Effect of rearing techniques on skeletal deformities and osteological development in red porgy *Pagrus pagrus* (Linnaeus, 1758) larvae. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 26, p. 372-376, 2010.

SFAKIANAKIS, D. G.; GEORGAKOPOULOU, E.; KENTOURI, M.; KOUMOUNDOUROS, G. Geometric quantification of lordosis effects on body shape in European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). **Aquaculture**, v. 256, p. 27-33, 2006.

TAKEUCHI, T. A review of feed development for early life stages of marine finfish in Japan. **Aquaculture**, v. 200, p. 203-222, 2001.

TANIGUCHI, N. Genetic factors in broodstock management for seed production. **Review in Fish Biology and Fisheries**, v.13, p.175-185, 2003.

WASKO, A. P.; MARTINS, C.; OLIVEIRA, C.; SENHORINI, J. A.; FORESTI, F. Genetic monitoring of the Amazonian fish matrinchã (*Brycon cephalus*) using RAPD markers: insights into supportive breeding and conservation programmes. **Journal of Applied Ichthyology**, v.20, p.48-52, 2004.

WITTEN, P. E.; GIL-MARTENS, L.; HUYSSEUNE, A.; TAKLE, H.; HJELDE, K. Towards a classification and an understanding of developmental relationships of vertebral body malformations in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Aquaculture**, v. 295, p. 6-14, 2009.

CAPÍTULO 5- Vitamina A e *turnover* do isótopo estável de carbono $\delta^{13}\text{C}$ em larvas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

RESUMO

Um experimento foi realizado no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos, CAUNESP, Jaboticabal, SP, Brasil, com o objetivo de conhecer o efeito da vitamina A no *turnover* do carbono-13 no tecido ósseo de larvas de pacu, e a influência deste nutriente na incidência de anormalidades esqueléticas durante o desenvolvimento ósseo. As larvas receberam dois tratamentos: A0D0, constituído por alimentação inicial com náuplios de artêmia durante os primeiros 15 dias pós-eclosão, passando por seis dias de transição alimentar (com redução do número de náuplios e introdução de dieta formulada) até a substituição total dos náuplios por uma dieta formulada sem suplementação de vitamina A (VA); e A10D10, náuplios de artêmia enriquecidos com 10.000 UI de vitamina A g^{-1} de cisto, com o mesmo período de transição alimentar para uma dieta formulada suplementada com 10.000 UI de VA kg^{-1} , ambos tratamentos com cinco repetições. Não houve diferença estatística para peso e comprimentos total (CT) e padrão (CP) avaliados nas larvas de pacu. A taxa de sobrevivência para as larvas que receberam A0D0 foi de 96%, enquanto A10D10 foi de 94%, na fase em que recebiam alimento vivo, e de 49,36% e 42,64%, respectivamente, para as larvas na fase em que foram alimentadas com dieta formulada. Pela análise conjunta das informações de desempenho zootécnico, incidência de anomalias esqueléticas e análises isotópicas do tecido ósseo, concluiu-se que: a presença de VA, nas quantidades investigadas, não implicou em aumento na incidência de anomalias esqueléticas, assim como não influenciou o desempenho das larvas, mas sim o crescimento ósseo, que apresentou desenvolvimento mais acelerado na presença de VA, cuja incorporação do carbono-13 foi de 2,27 dias a menos em larvas que receberam o tratamento A10D10, em relação ao A0D0.

PALAVRAS-CHAVE: Vitamina A, incorporação de nutrientes, suplementação de vitamina, crescimento ósseo.

1. Introdução

Durante a fase larval dos peixes ocorrem profundas alterações funcionais e morfológicas que levam ao desenvolvimento normal dos mesmos (Portella e Dabrowski 2008; Portella et al. 2012). O processo de ossificação, por exemplo, está entre os eventos mais importantes durante o desenvolvimento larval, principalmente devido às suas funções de proteção aos órgãos internos e de formação estrutural do corpo (Estêvão et al. 2012). Porém, os processos de formação e diferenciação de novos órgãos e estruturas podem ser influenciados por diversos fatores, fazendo com que baixa porcentagem de larvas chegue até os estágios juvenil e adulto (Portella e Dabrowski 2008). Um dos fatores mais importantes que influencia o desenvolvimento das larvas, e que pode levar a prejuízos nesta fase de criação, é a nutrição (Cahu e Zambonino-Infante 2001), com destaque para as vitaminas, que desempenham funções fundamentais no desenvolvimento larval (Cahu et al. 2003).

A vitamina A (VA) é uma vitamina lipossolúvel que inclui todos os componentes com a mesma atividade biológica do retinol, sendo o ácido retinóico seu principal metabólito. Esta vitamina desempenha papel fundamental no desenvolvimento esquelético (atuando na morfogênese, diferenciação e proliferação das células responsáveis pela esqueletogênese: osteoblastos, condrócitos, osteócitos e osteoclastos; e regulação da expressão de vários genes), tornando-se assim essencial para o desenvolvimento larval (Haga et al. 2002, 2011). Como os peixes não são capazes de sintetizá-la, há a necessidade de que seja oferecida pela dieta; porém, sem excessos, pois altas doses são tóxicas. Quando presente em altos níveis na dieta, a VA age diminuindo a síntese de colágeno, acelerando a formação dos ossos, bem como aumentando o número de osteoclastos (células responsáveis pela reabsorção óssea), causando, portanto, perda óssea (Lall e Lewis-McCrea 2007).

O uso de organismos vivos (rotíferos, náuplios de artêmia, entre outros) na alimentação de larvas de peixes neotropicais, como o pacu, tem resultado em altas taxas de sobrevivência e crescimento durante as fases iniciais de desenvolvimento (Cestaroli et al. 1996, Portella et al. 2000, Tesser et al. 2005, Jomori et al., 2008, Leitão et al. 2011). Porém, nem todos os nutrientes, como a VA, estão presentes em

quantidades adequadas nos organismos vivos, e uma alternativa, já utilizada em produções comerciais de larvas de peixes marinhos, é a utilização de enriquecimento do alimento vivo (Conceição et al. 2010; Boglino et al. 2012, Negm et al. 2013). Porém, esse enriquecimento deve ser aplicado de forma cuidadosa para que não incorra em desbalanceamento dos nutrientes, causando prejuízos por excessos (Takeuchi et al. 1998, Fernandez e Gisbert 2010).

Uma ferramenta útil para determinar a incorporação dos nutrientes pelos animais é a técnica dos isótopos estáveis ambientais. Isso porque a composição isotópica dos tecidos dos animais depende, principalmente, da alimentação e das dietas que recebem, cujas assinaturas isotópicas podem ser distintas ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) de acordo com a origem e/ou ciclo fotossintético dos ingredientes que as compõem. Assim, os isótopos de carbono e nitrogênio podem ser usados para medir taxas de *turnover* em todo o corpo do animal (Ducatti et al. 2002). Porém, a mudança isotópica varia de acordo com o tecido, ou seja, depende da atividade metabólica com que os constituintes são incorporados pelo organismo (Caldara et al. 2007, 2008). Estudos indicam relativa escala de tempo para cada tecido, e as taxas de *turnover* são mais lentas em ossos, comparado com outros tecidos como o fígado e músculo (Gaston e Suthers, 2004). Assim, o conhecimento do *turnover* isotópico em cada tecido pode auxiliar na identificação de problemas nutricionais, por exemplo a falta ou excesso de VA em peixes, por meio do desenvolvimento do tecido.

A aplicação dos isótopos estáveis na larvicultura de peixes vem sendo utilizada com diversas finalidades, entre elas conhecer o momento ideal para substituição do alimento vivo pelo formulado, como observado para larvas de *Piaractus mesopotamicus* (Jomori et al. 2008). Além disso, já foi estudada a contribuição de nutrientes no crescimento e *turnover* muscular de juvenis de *Oreochromis niloticus* (Zuanon et al. 2006). Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo conhecer o efeito da VA no *turnover* do carbono-13 nos tecidos muscular e ósseo de larvas de pacu, e se há influência deste nutriente na incidência de anormalidades esqueléticas durante o desenvolvimento ósseo.

2. Material e métodos

2.1. Análises preliminares

Amostras de larvas, dos organismos vivos (enriquecido ou não enriquecidos) e das dietas formuladas foram coletados e analisados para assegurar os níveis de VA, e a distinção do sinal isotópico do carbono ($\delta^{13}\text{C}$). Foram amostradas larvas de pacu recém-eclodidas no Centro de Aquicultura da UNESP, Jaboticabal, SP, bem como náuplios oriundos de cistos de artemia de duas origens distintas (Inve, Great Salt Lake, EUA e Bioartemia, Grossos, RN, Brasil), e a dieta formulada, de composição nutricional adaptada de Palacios et al. (2006) (Tabela 1).

Tabela 1. Dieta formulada semipurificada para larvas de pacu: D0, sem adição de vitamina A (VA), e D10, com adição de 10.000 UI de VA.kg⁻¹ (acetato de retinol).

Ingredientes	g.kg ⁻¹
Caseína livre de vitamina	320
Gelatina	20
Dextrina	270
Celulose	269,5
Carboximetil celulose (CMC)	20
Phosphitan C ²	0,5
Enriquecimento*	40
Óleo de girassol	30
Óleo de canola	30
Total	1kg

*Premix formulado especialmente para ser livre de vitamina A. Composição: 600.000 UI/kg de vitamina D3; 30.000 mg de vitamina E; 3.000 mg de vitamina K3; 4.000 mg de vitamina B1; 4.000 mg de vitamina B2; 3.500 mg de vitamina B6; 8.000 mcg de vitamina B12; 60.000 mg de vitamina C; 20.000 mg ácido nicotínico; 10.000 mg de panteonato de cálcio; 200 mg de biotina; 1.200 mg de ácido fólico; 5.000 mg de antioxidante OxyNil; 3.500 mg de sulfato de cobre; 20.000 mg de sulfato de ferro; 10.000 mg de sulfato de manganês; 24.000 mg de sulfato de zinco; 160 mg de cálcio; 100 mg de sódio, 80 mg de cobalto; 25.000 mg de inositol e 100.000 mg de cloreto de colina. Formulação adaptada de Palacios et al. (2006)

Quatro incubadoras de 20L foram utilizadas para incubação dos cistos e produção dos náuplios de artêmia. As condições de incubação foram 15L de água salinizada (30%), temperatura constante a 28°C, iluminação contínua, em densidade de 2g.L⁻¹. Após 24 horas de incubação, foi realizada a separação das cascas e cistos não eclodidos, e os náuplios voltaram a ser incubados por cerca de 12 horas,

até consumirem quase todo o vitelo. Em seguida, os náuplios de cada incubadora receberam 10 mL.L⁻¹ de uma emulsão enriquecedora, adaptada de Watanabe (1988) e Portella et al. (2000), composta por 5g levedura, 1g de gema de ovo e 100 mL água destilada, homogeneizado por 2 min. A emulsão base foi ou não enriquecida com VA, em diferentes concentrações (0, 10.000, 50.000 e 100.000 UI de acetato de retinol por grama de cistos), e os náuplios permaneceram nesse meio por 6 horas, na temperatura de 28 ± 1 °C.

Após completarem seis horas de alimentação/enriquecimento, amostras de náuplios de artêmia foram lavadas e coletadas ao longo do dia (de 44 a 56 horas após início da incubação), com intervalos de três horas, e foram imediatamente identificadas e congeladas para posterior processamento e análises de VA e de composição isotópica de carbono. O período de coleta de artêmia ao longo do dia foi baseado na rotina de alimentação das larvas de pacu adotado no LANOA (oferta de alimento vivo a cada três horas no período de luz).

As amostras de náuplios de artêmia e das dietas formuladas passaram por secagem em liofilizador até peso constante e, em seguida, foram finamente moídas em moinho criogênico a -196°C. Estas foram encaminhadas ao Laboratório de Análises Clínicas LabTec, para determinação da quantidade de VA presente em cada material, por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Ainda, uma pequena quantidade destas amostras foi levada ao Centro de Isótopos Estáveis Ambientais, do Instituto de Biociências da UNESP, Botucatu, para análise das composições isotópicas ($\delta^{13}\text{C}$).

Os valores encontrados de quantidade de VA e do isótopo $\delta^{13}\text{C}$ encontram-se na Tabela 2. As taxas de eclosão dos náuplios foram de 90±2% para os de origem importada e 84±3% para os nacionais. A escolha do lote de artêmia foi realizada com base no sinal isotópico mais distante do apresentado pelas larvas de pacu (-22,16‰ de $\delta^{13}\text{C}$), originadas do Centro de Aquicultura da UNESP.

Desta forma, foi utilizado como alimento vivo o lote de artêmia de origem nacional (-16,50‰ de $\delta^{13}\text{C}$), sem enriquecimento (A0) ou enriquecido (A10) com 10.000 UI de VA (acetato de retinol), contendo 629,02 e 57.887,00 UI de VA, respectivamente. Ainda, foi utilizada a dieta formulada sem adição de VA (D0), contendo apenas 446,00 UI desta vitamina, como tratamento controle, e com 10.000

UI de VA (D10), garantindo o oferecimento de 12.601,60 de VA neste alimento.

Tabela 2. Concentrações de vitamina A (VA) e relação isotópica de Carbono de náuplios de artêmia de diferentes origens e dieta formulada, bem como das larvas recém-eclodidas utilizadas no experimento.

Alimentos	VA esperado (UI)	VA encontrado (UI)*	$\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (‰)
Artêmia nacional**	-	629,02	-16,78
	>5.000	10.123,70	-16,52
	>10.000	57.887,00	-16,50
	>100.000	442.818,59	-16,69
Artêmia importada**	-	20.358,76	-22,08
	>10.000	36.509,00	-22,16
Dieta formulada	0	446,00	-26,06
	5.000	6.449,35	-25,45
	10.000	12.601,60	-25,39
	50.000	38.372,45	-26,30
Larvas recém-eclodidas	-	-	-22,16

*Análises por HPLC, Laboratório de Análises Clínicas LABTEC.

** Cistos de artêmia originados em Great Salt Lake (Inve), EUA e em Grossos, RN, Brasil (Bioartemia).

2.2. Obtenção das larvas e tratamentos experimentais

O experimento foi realizado no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos (LANOA) do Centro de Aquicultura da UNESP, Jaboticabal, SP, no período de dezembro/2011 a janeiro/2012. Larvas de pacu obtidas por reprodução induzida, com três dias pós-eclosão (dpe), foram aclimatadas e estocadas em tanques de 100L (10 larvas.L⁻¹), dotados de renovação contínua de água (cerca de 20 vezes o volume por dia) e aeração constante. As larvas ficaram expostas ao fotoperíodo de 15 horas de luz e 9 de escuro.

As larvas foram distribuídas aleatoriamente em dois tratamentos (com e sem VA) durante todo o período experimental. Na primeira fase (1 a 15 dppa), as larvas receberam alimento vivo: (A10) náuplios de artêmia enriquecidos com emulsão contendo suplementação de VA (10.000 UI de acetato de retinol), ou (A0) náuplios de artêmia enriquecidos com emulsão livre de VA (controle). Na fase seguinte (16 a 27 dppa), após transição alimentar envolvendo co-alimentação por seis dias (redução do número de náuplios em 70, 50 e 25% de alimento vivo, concomitante à introdução de alimento formulado), as larvas passaram a receber somente as dietas

formuladas suplementada (D10, 10.000 UI de acetato de retinol por quilo de dieta formulada) ou não (D0) com vitamina A. Os dois tratamentos foram nomeados A10D10 e A0D0, respectivamente e foram conduzidos durante 27 dias de alimentação ativa (totalizando 30 dias pós-eclosão). O enriquecimento dos náuplios de artêmia foi realizado como descrito anteriormente (nas análises preliminares) e as dietas foram formuladas segundo Palacios et al. (2006), com adaptações (Tabela 1).

2.3. Análises de desempenho

Aos 15 dppa (término da primeira fase de alimentação), as larvas foram contadas para avaliação de sobrevivência e cerca de 5% das larvas de cada tanque (50 larvas) foram amostradas para determinação do desempenho (peso, comprimento total - CT e comprimento padrão - CP) e com os resultados médios de peso inicial (Pi) e final (Pf) de cada réplica, foi calculada a taxa de crescimento específico por meio da expressão $TCE=100.(ln Pf - ln Pi)/Dt$, considerando Dt o intervalo de tempo em dias. Da mesma forma, ao final do experimento, quando os peixes completaram 30 dpe (27 dppa), foram amostrados 10% dos animais (50 juvenis), eutanasiados por overdose de anestésico (benzocaína a 0,02%), e fixados para a determinação do crescimento (peso, CT e CP). Todos os peixes foram contados para a determinação da taxa de sobrevivência.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado (DIC) com dois tratamentos (sem x com enriquecimento de VA) e cinco réplicas. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias foram analisadas pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de significância. As análises foram realizadas no software Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 9.1).

2.4. Análises esqueléticas

Ao final de cada fase experimental (15 e 30 dpe) cerca de 10 e 5% dos animais de cada réplica (50 e 20 larvas, respectivamente), foram amostrados, submetidos a super dosagens de anestésico (benzocaína a 0,02%), fixados em solução tamponada de formaldeído 10% e coradas para distinção de osso e cartilagem (adaptado de Potthoff 1984). Estas amostras foram utilizadas para verificar a influência da VA na incidência de anomalias esqueléticas (esqueleto

craniofacial, axial e apendicular), durante o desenvolvimento larval de acordo com Boglione et al. (2001).

2.5. Análises isotópicas

Visando projetar a curva exponencial do *turnover* do isótopo estável de $\delta^{13}\text{C}$ com maior precisão, um pool de larvas de cada tratamento foi coletado, ao acaso, no início do experimento (dia zero) e periodicamente ao longo do experimento, com 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27 e 30 dpe. O dia zero tem por objetivo expressar a composição isotópica das larvas antes da primeira alimentação.

Os peixes foram coletados no início da manhã, com 12 horas de jejum, anestesiados por termosensibilização (imersão em banho de gelo), identificados e, imediatamente, congelados a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, até a preparação para as análises isotópicas. Antes das análises, o trato digestório de cada animal foi removido para evitar que a possível presença de alimento não mascarasse o sinal isotópico próprio dos tecidos, assim como as escamas, quando presentes, foram retiradas.

Na sequência, as larvas evisceradas foram divididas em dois grupos: um passou por digestão muscular, com uso de tripsina de pâncreas bovino (Taylor, 1967), e no outro as larvas foram mantidas íntegras, sem o processo de digestão muscular. Desta maneira, foram analisadas larvas em duas condições: larvas não digeridas e; larvas parcialmente digeridas, na tentativa de separar ao máximo o tecido ósseo.

Para análise do isótopo $\delta^{13}\text{C}$, as amostras foram secas em liofilizador até peso constante, finamente moídas em moinho criogênico a $-195\text{ }^{\circ}\text{C}$ e acondicionadas em cápsulas de estanho (aproximadamente $60\text{ }\mu\text{g}$), em duplicata.

As amostras de larvas e dos alimentos foram analisadas em espectrômetro de massa de razão isotópica, no Centro de Isótopos Estáveis Ambientais do Instituto de Biociência da UNESP/Botucatu, com erro analítica da ordem de $0,2\%$.

As comparações relativas entre as amostras e o padrão internacional *Pee Dee Belemnite* (PDB) foram expressas como enriquecimento relativo em delta per mil, pela equação:

$$\delta^{13}\text{C} = [(R_{\text{amostra}}/R_{\text{padrão}}) - 1] \times 10^3$$

onde R é a razão isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, para as amostras e padrão, respectivamente; $\delta\text{‰}^{13}\text{C}$ é o enriquecimento das amostras (delta per mil) em relação ao padrão PDB (Ducatti et al. 1982).

As concentrações isotópicas do $\delta^{13}\text{C}$ (expressas em $\delta\text{‰}$) das amostras de tecido dos animais, coletados ao longo do tempo, foram interpretadas pelo do modelo exponencial descrito por Ducatti et al. (2002), para animais adultos. Entretanto, esse modelo também é adequado para animais em crescimento, pois considera a taxa de troca do isótopo (k), que integra o efeito do novo tecido adicionado (crescimento) e do *turnover* metabólico, como verificado por Zuanon et al. (2006).

$$\delta_{(t)} = \delta_{(f)} + [\delta_{(i)} - \delta_{(f)}] e^{-kt}$$

onde: $\delta_{(t)} = \delta^{13}\text{C}_{(t)}$ = enriquecimento isotópico do carbono no tecido em qualquer tempo t, expresso em ‰; adimensional;

$\delta_{(i)} = \delta^{13}\text{C}_{(i)}$ = enriquecimento isotópico do carbono inicial no tecido, em ‰, adimensional;

$\delta_{(f)} = \delta^{13}\text{C}_{(f)}$ = enriquecimento isotópico do carbono no tecido larval ao atingir o patamar de equilíbrio, em ‰ (valor assintótico), adimensional;

k = taxa de substituição e incorporação de carbono no tecido, em unidades de tempo, dia^{-1} ;

t = tempo, em dias.

Baseado nos valores da constante k, determinou-se a meia-vida do carbono-13 no tecido dos peixes, expressando a condição de 50% da fonte isotópica no tecido, que foi calculada pela fórmula descrita por Ducatti et al. (2002):

$$T = \ln 2 / k$$

onde T representa a meia-vida em dias; Ln é o logaritmo neperiano e k é a taxa de substituição do carbono-13 no tecido.

3. Resultados

3.1. Desempenho

Não houve diferença estatística para as médias de peso, CT e CP entre os tratamentos (Tabela 3). Na fase em que os animais receberam alimento vivo, não houve diferença para taxas de sobrevivência, assim como na segunda fase, quando as larvas passaram a receber somente as dietas formuladas D0 e D10 (Tabela 4). O mesmo pode ser visto para TCE em ambas as fases para os tratamentos avaliados (Tabela 4). Porém é possível observar a redução nos valores destes parâmetros, na segunda fase em relação à primeira.

Tabela 3. Resultados finais de peso, comprimento total (CT) e comprimento padrão (CP) de larvas de pacu que receberam alimentos sem (A0D0) e com (A10D10) enriquecimento de vitamina A (VA), durante 27 dias pós-primeira-alimentação.

	Alimento	A0D0	A10D10
Peso (mg)	Artêmia	19,15±4,93	17,05±4,52
	Dieta	25,54±5,40	23,12±4,80
CT (mm)	Artêmia	10,74±1,13	10,41±0,70
	Dieta	12,61±0,51	12,62±0,67
CP (mm)	Artêmia	9,13±0,63	8,56±0,72
	Dieta	10,58±0,56	10,74±0,61

*Média ± Desvio padrão. Não houve diferença estatística entre os tratamentos, Tukey ($p>0,05$).

** A0- Artêmia sem enriquecimento; D0- Dieta sem suplementação; A10- Artêmia enriquecida com 10 mil UI de acetato de retinol (AR) g^{-1} de cisto; D10- Dieta suplementada com 10 mil UI de AR kg^{-1} de dieta formulada.

Tabela 4. Sobrevivência e taxa de crescimento específico (TCE) de larvas de pacu submetidas a duas fases de alimentação: (I) artêmia sem - A0 e com enriquecimento de vitamina A (10.000 UI acetato de retinol g^{-1} de cisto) - A10; (II) dieta formulada sem - D0 e com suplementação de vitamina A (10.000 UI acetato de retinol kg^{-1} de deita) - D10.

Fase	Tratamento	Sobrevivência (%)	TCE
I	A0	96	0,283
	A10	94	0,274
II	D0	49,4	0,019
	D10	42,6	0,020

*Não houve diferença estatística entre os tratamentos, Tukey ($p>0,05$).

3.2. Análises esqueléticas

A incidência de anomalias esqueléticas em larvas de pacu que receberam ou não alimento suplementado com VA pode ser vista na Tabela 5. A incidência de deformidade na mandíbula ocorreu de forma semelhante em ambos tratamentos. Por outro lado, a porcentagem de anomalias na região do maxilar foi significativamente maior no tratamento sem a suplementação de VA, assim como a cifose na coluna vertebral. A lordose foi a anomalia que mais se destacou e foi, significativamente, maior para o tratamento com adição de VA.

Tabela 5. Incidência acumulada (%) de anomalias esqueléticas em larvas de pacu submetidas aos tratamentos sem (A0D0) e com (A10D10) suplementação de vitamina A (VA) (10.000 UI.kg⁻¹ de acetato de retinol), ao longo de 27 dias pós-primeira alimentação.

Tratamento	Mandíbula (%)	Maxilar (%)	Cifose (%)	Escoliose (%)	Lordose (%)	Vértebras (%)
A0D0	19,1	12,8 ^a	14,0 ^a	3,2	4,4 ^b	5,9
A10D10	18,0	3,0 ^b	2,0 ^b	3,4	23,4 ^a	2,0

* Letras diferentes entre os tratamentos (colunas) diferem entre si estatisticamente, Tukey (p<0,05).

** A0- Artêmia sem enriquecimento; D0- Dieta sem suplementação; A10- Artêmia enriquecida com 10 mil UI de acetato de retinol (AR) g⁻¹ de cisto; D10- Dieta suplementada com 10 mil UI de AR kg⁻¹ de dieta formulada.

3.3. Turnover do $\delta^{13}\text{C}$

As amostras iniciais de larvas e dos alimentos coletados durante o experimento confirmaram os sinais isotópicos de carbono-13 obtidos nas análises preliminares: a composição inicial das larvas foi de $-21,37 \pm 0,11\%$ para larvas inteiras, e $-22,52 \pm 0,27\%$ para larvas digeridas recém eclodidas. Esses sinais mudaram para $-19,71 \pm 0,11\%$ e $-21,79 \pm 0,25\%$, respectivamente, aos 3 dpe, dia imediatamente antes do início da alimentação exógena. Os sinais isotópicos da artêmia com e sem enriquecimento foram de $-16,38 \pm 0,10\%$ e $-16,33 \pm 0,07\%$, respectivamente. A dieta formulada apresentou sinal do isótopo carbono de $-25,80 \pm 0,45\%$.

Após o início da alimentação exógena verificou-se incorporação dos nutrientes do alimento vivo no tecido das larvas, por meio dos valores de $\delta^{13}\text{C}$. A incorporação isotópica do carbono-13 nas larvas íntegras (apenas evisceradas) expressou-se numa taxa de *turnover* de 0,2514 e de 0,2826 dia^{-1} nos tratamentos A0D0 e A10D10, respectivamente, com valores de meia-vida em 2,7 (A0D0) e 2,4 (A10D10) dias (Fig. 1). Após o período de transição alimentar, não houve alteração do sinal isotópico das larvas em direção ao sinal da dieta formulada ($-25,80\text{‰}$). Os patamares de equilíbrio isotópico mantiveram-se estabilizados próximos ao sinal dos náuplios de artêmia (que era de $-16,33 \pm 0,10\text{‰}$), evidenciando a baixa aceitação da dieta pelas larvas de pacu.

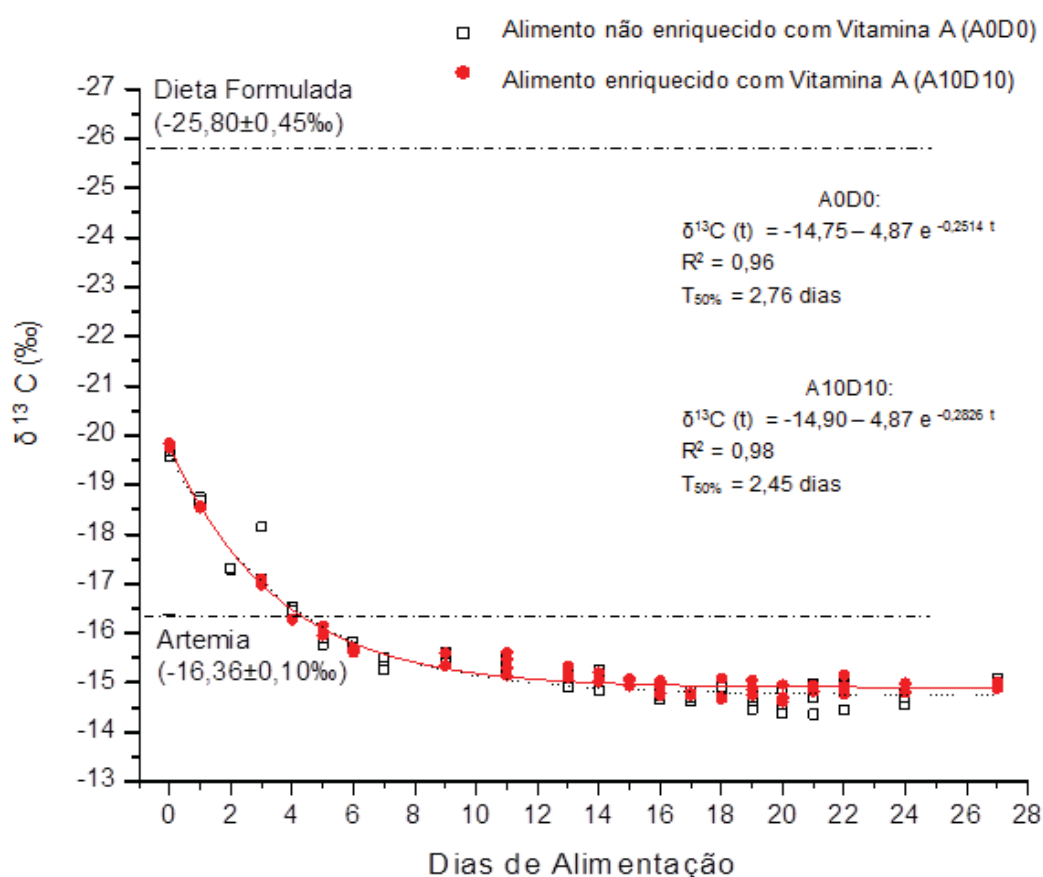


Fig. 1. $\delta^{13}\text{C}$ de larvas de pacu íntegras (larvas com tecido muscular e outros tecidos intactos), alimentadas com alimento vivo e dieta formulada sem (A0D0) e com

(A10D10) adição de vitamina A (10.000 UI de acetato de retinol) durante 27 dias de alimentação exógena (até 30 dias pós-eclosão).

A incorporação isotópica do carbono nas larvas digeridas (onde predominava o tecido ósseo) expressou-se numa taxa de *turnover* de 0,0953 e de 0,1385 dia⁻¹ nos tratamentos A0D0 e A10D10, respectivamente. Os valores de meia-vida foram de 5,00 (A0D0) e 7,27 (A10D10) dias (Fig. 2).

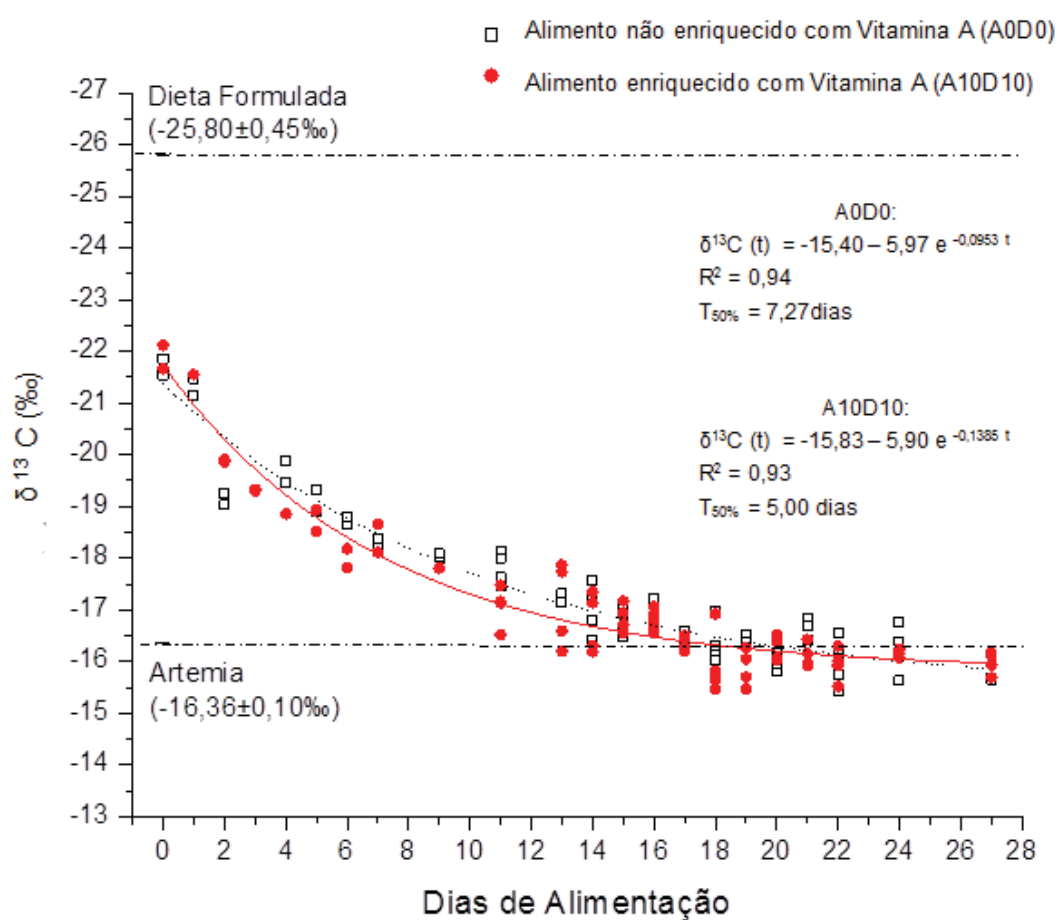


Fig. 2. $\delta^{13}\text{C}$ de larvas de pacu processadas com tripsina de pâncreas bovino para a digestão do tecido muscular (larvas com tecido muscular parcialmente digerido e predominância de tecido ósseo), que receberam alimento vivo e dieta formulada sem (A0D0) e com (A10D10) adição de vitamina A (10.000 UI de acetato de retinol), durante 27 dias de alimentação exógena (30 dias pós-eclosão).

4. Discussão

Os parâmetros de desempenho das larvas de pacu que receberam ou não suplementação com VA não diferiram entre os tratamentos. Uma hipótese a ser considerada é a de que, talvez, a suplementação de 10.000 UI kg⁻¹ de VA não tenha sido suficiente para melhorar ou induzir diferenças de desempenho das larvas de pacu. Porém, poucas são as informações sobre as exigências de VA para larvas de peixes neotropicais. Por exemplo, para os peixes de água doce de forma geral, no NRC (1993) são encontradas recomendações somente para truta e bagre africano, de níveis entre 1.000 e 3.500 UI kg⁻¹. Em outro estudo, para larvas de uma espécie de bagre sul americano, o jundiá *Rhamdia quellen*, autores apontaram a necessidade de suplementação de no mínimo 3.995 UI kg⁻¹ (Trombetta 2006). Desta forma, neste trabalho, para definir a dose de VA a ser incorporada na dieta procurou-se não extrapolar à estas recomendações e, ao mesmo tempo, manter valor próximo ao encontrado nas análises preliminares de náuplios de artêmia importada (cerca de 20.000 UI de VA kg⁻¹).

A incidência de anomalias esqueléticas foi menos acentuada no tratamento com adição de VA, com exceção para a lordose, anomalia que ocorre nas vértebras caudais, região da coluna vertebral mais susceptível a toxicidade por VA (Haga et al. 2011). Estudos com larvas de peixes marinhos, conduzidos para verificar a incidência de anomalias esqueléticas, indicam níveis de segurança abaixo de 50.000 UI kg⁻¹ de VA para se evitar tais ocorrências (Dedi et al. 1995; Fernandez et al. 2009). Porém, no presente estudo, as anomalias na maxila e cifose tiveram ocorrência significativamente maior no tratamento A0D0, talvez pela falta dessa vitamina. Há estudos que indicam que baixas doses de VA afetam ou a mandíbula ou o maxilar das larvas, enquanto altas doses afetam ambas estruturas (Fernandez et al. 2008; Haga et al. 2011). Ainda, outros autores concluem que a qualidade nutricional do alimento vivo, durante a fase de alimentação inicial, é fator determinante no aparecimento de curvaturas na coluna vertebral das larvas (Izquierdo et al. 2010; Boglione et al. 2013), o que talvez explique a ocorrência mais acentuada das anomalias na maxila e cifose no tratamento que proporcionou baixa quantidade de VA. Entretanto, o efeito dos níveis de VA sobre a incidência de

anomalias esqueléticas não pôde ser elucidado no presente trabalho, devido à variação no padrão das respostas obtidas entre os tratamentos, considerando que a comparação ocorreu apenas entre dois níveis de VA, além da baixa aceitação da dieta na segunda fase experimental.

Uma vez que a VA exerce diversas funções no metabolismo, entre elas o desenvolvimento esquelético (Haga et al. 2002, 2011), mas os peixes não são capazes de sintetizá-la, é consenso entre os nutricionistas a necessidade de suplementação (Cahu et al. 2003; Fernandez e Gisbert 2001; Haga et al. 2011; Portella et al. 2012; Boglione et al. 2013). Porém, além da dificuldade para determinar o nível ideal a ser suplementado, uma vez que há diversos entraves metodológicos na aplicação de estudos de dose-resposta em experimentos com larvas de peixes (Conceição et al. 2010), e dificuldade em enriquecer diferencialmente o alimento vivo com níveis de VA (Negm et al. 2013, 2014), existe a dúvida de qual o momento mais importante para que essa suplementação ocorra, e qual sua influência no metabolismo de formação óssea normal. Nessas circunstâncias, utilizou-se a técnica de isótopos estáveis naturais, cujos elementos são incorporados em cada um dos tecidos conforme são assimilados pelo animal. Sendo assim, os valores isotópicos do $\delta^{13}\text{C}$ dos tecidos de larvas (íntegras e digeridas), alimentadas com náuplios de artêmia contendo ou não suplementação de VA, indicaram o processo de incorporação do carbono desse alimento nos tecidos das larvas de pacu.

Os valores de $\delta^{13}\text{C}$ das larvas, no dia zero ($-19,71\text{‰}$ e $-21,79\text{‰}$ para larvas inteiras e larvas digeridas), distinguiram-se do sinal isotópico do alimento vivo ($-16,36 \pm 0,10\text{‰}$), que também foi diferente do sinal da dieta formulada ($-25,80 \pm 0,45\text{‰}$). À medida que as larvas foram ingerindo o alimento vivo nos dias subsequentes, os sinais isotópicos dos tecidos das larvas, íntegras ou digeridas, de ambos os tratamentos (A0 e A10) aproximaram-se da composição isotópica do alimento vivo. Porém, a partir do momento em que foram oferecidos simultaneamente artêmia e dieta formulada (na transição alimentar), o sinal isotópico manteve-se no patamar, mesmo após o oferecimento exclusivo das dietas formuladas, indicando aproveitamento e assimilação muito baixos dos nutrientes do alimento inerte. Isso também pode ser confirmado a partir do crescimento insatisfatório das larvas, em

ambos os tratamentos, durante a fase de alimentação com dieta formulada, momento em que praticamente não cresceram, resultados confirmados pelas baixas taxas de crescimento específico. Com base na premissa de que o animal é aquilo que consome $\pm 1\%$ para o isótopo de carbono (DeNiro e Epstein 1978), praticamente houve apenas incorporação do carbono oriundo do alimento vivo.

A utilização de dieta formulada no início da alimentação exógena de peixes com características altriciais vem sendo um desafio, devido a imaturidade do sistema digestório das larvas (Portella e Dabrowski 2008), dificuldade em formular um alimento inerte nutricionalmente balanceado, atrativo, palatável, com densidade adequada e estabilidade na água (Menossi et al. 2012), entre outros fatores. Porém o uso de dietas inadequadas durante o desenvolvimento inicial de larvas de pacu afeta sua sobrevivência e crescimento (Jomori, 2005, Tesser et al. 2005, 2006, Mukai-Corrêa 2008, Menossi et al. 2012, Rodrigues 2012), como o verificado com a dieta utilizada no presente trabalho. Mesmo desconhecendo-se as exigências nutricionais do pacu nas fases consideradas, a dieta utilizada foi efetiva na alimentação de juvenis de pirapitinga *Piaractus brachypomus* (Palacios et al. 2006) e de *P. mesopotamicus* (Takata 2011). No entanto, para atender às necessidades do presente estudo, a caseína foi substituída por uma caseína hidrolisada livre de VA (Sigma Aldrich), cujo sabor é acentuado, entre o azedo e o umami. Essa característica pode ter reduzido a atratividade e palatabilidade das dietas, resultando em baixa ingestão. No ano seguinte, para a realização de novo experimento (Cap. 6 da presente tese), essa caseína hidrolisada livre de VA foi substituída por caseína convencional, e a taxa de ingestão e crescimento das larvas de pacu foram superiores.

Considerando amostras de larvas íntegras, observou-se que a incorporação do carbono-13 dos alimentos nos tecidos de larvas de pacu resultou em curvas exponenciais semelhantes entre os tratamentos. Por outro lado, a incorporação desse isótopo no tecido esquelético (nas larvas digeridas pela tripsina) foi diferente entre as larvas que receberam ou não a suplementação de VA. Estas diferenças isotópicas entre os grupos de larvas íntegras e digeridas podem ser explicadas pelo conjunto de tecidos que constituíram as respectivas amostras. Os tecidos apresentam diferentes taxas de *turnover* isotópico (Tieszen et al. 1983), e ao se

considerar larvas íntegras, o padrão de resposta contemplou um conjunto de tecidos (músculos, ossos, sangue, adiposidades etc.), provavelmente prevalecendo a contribuição do tecido muscular. Já em larvas submetidas à digestão pela tripsina, predominou a contribuição do tecido ósseo, e diferentes valores para a meia-vida do carbono-13 foram obtidos (2,76 e 2,45 dias nas larvas íntegras sem e com VA, e 7,27 e 5,0 dias nas larvas digeridas sem e com VA, respectivamente).

Tecidos mais ativos metabolicamente apresentam taxas de turnover do carbono mais rápidas do que os tecidos menos ativos (Tieszen et al. 1983). Por isso, uma relativa escala de tempo é atribuída ao turnover isotópico de cada tecido, que vai desde semanas para tecidos como o fígado, meses para o tecido muscular, até anos para o osso (Gaston e Suthers 2004). Esses intervalos são, porém, considerados para animais juvenis ou adultos, que já apresentam sua conformação e proporção de tecidos definidas. Em larvas de peixes, observou-se que esse tempo de incorporação foi mais acelerado, mesmo no tecido ósseo.

Esta discrepância pode ser atribuída às rápidas transformações morfofisiológicas que ocorrem durante o desenvolvimento larval (Portella e Dabrowski 2008), que envolvem formação, diferenciação e crescimento de novos órgãos e estruturas, como observado no âmbito da presente pesquisa (Cap. 2) e em outros trabalhos com larvas de pacu e outras espécies de peixes. Por exemplo, Leitão et al. (2011) observaram rápido aumento da massa muscular por processos hiperplásico e hipertrófico das fibras musculares de larvas de pacu bem alimentadas com náuplios de artêmia, e Menossi et al. (2012) verificaram que a diferenciação do sistema digestório em larvas de pacu ocorre de forma mais acelerada em larvas bem alimentadas com náuplios de artêmia do que em larvas que recebem precocemente alimento formulado.

Pelas análises isotópicas das larvas digeridas, pode-se constatar que o turnover do carbono-13 no tecido ósseo mostrou-se mais acelerado em larvas que receberam a suplementação de VA, com diferença de 2,27 dias para a meia-vida do carbono. Apesar das variações pontuais entre as repetições amostrais (causadas possivelmente pela manipulação das amostras ao digerir os tecidos), as diferenças no *turnover* do carbono entre os tratamentos podem ser relacionadas com o crescimento ósseo. O processo de ossificação das larvas de pacu ocorre até $14,5 \pm$

1,5 dpe ($7,75 \pm 0,28$ mm de CP) para o esqueleto axial; 24 ± 6 dpe ($9,54 \pm 0,74$ mm de CP) para o esqueleto craniofacial, e até 40 dpe ($19,88 \pm 0,97$ mm de CP) para algumas das estruturas do esqueleto apendicular (Cap. 2 da presente tese).

Os retinóides exercem efeito direto sobre as células do osso, promovendo a proliferação e diferenciação celular, determinando o crescimento, padronização do corpo, desenvolvimento do sistema nervoso, e esquelético (Ross et al. 2000). O processo de ossificação pode ser afetado pela falta ou excesso de VA na dieta, influenciando o desenvolvimento esquelético dos animais (Mazurais et al. 2009). Em excesso, ocorre inibição de células responsáveis pela formação óssea, os osteoblastos, e estímulo de células que realizam a reabsorção óssea, os osteoclastos (Fernandez e Gisbert 2011). Os resultados isotópicos obtidos no presente estudo podem ser indicativos que a dose de VA usada no tratamento A10D10 não foi excessiva para o pacu. Pelo contrário, a suplementação de VA mostrou-se benéfica para promover incorporação de nutrientes mais acelerada nos tecidos ósseos das larvas, comparada ao observado nos animais do tratamento A0D0.

Em síntese, por meio do estudo do *turnover* isotópico do carbono-13 no tecido ósseo, observou-se que suplementação de VA influencia o crescimento ósseo e promove desenvolvimento mais acelerado desse componente corporal, mesmo que não tenham sido observadas evidências de efeito da suplementação no peso e comprimento das larvas de pacu. Os níveis de VA estudados não foram conclusivos em relação às anomalias esqueléticas, no sentido de estabelecer teores mais apropriados para inferir sobre a falta ou o excesso deste nutriente, exigindo continuidade dos estudos. Ainda, mais estudos são necessários para a proposição de uma formulação de dieta semi-purificada que auxilie na experimentação nutricional de larvas de peixes neotrópicos.

5. Referência Bibliográfica

BOGLINO, A.; DARIAS, M. J.; ORTIZ-DELGADO, J. B.; OZCAN, F.; ESTÉVEZ, A.; ANDREE, K. B.; HONTORIA, F.; SARASQUETE, C.; GISBERT, E. Commercial products for artemia enrichment affect growth performance, digestive system maturation, ossification and incidence of skeletal in senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae. **Aquaculture**, v. 324-325, p. 290-302, 2012.

BOGLIONE, C.; GAGLIARDI, F.; SCARDI, M.; CATAUDELLA, S. Skeletal descriptors and quality assessment in larvae and post-larvae of wild-caught and hatchery-reared gilthead sea bream (*Spaurus aurata* L. 1758). **Aquaculture**, v. 192, p. 1-22, 2001.

BOGLIONE, C.; GISBERT, E.; GAVAIA, P.; WITTEN, P.E.; MOREN, M.; FONTAGNÉ, S.; KOUMOUNDOUROS, G. Skeletal anomalies in reared European fish larvae and juveniles. Part 2: main typologies, occurrences and causative factors. **Aquaculture**, v. 5, p. S121-S167, 2013.

CAHU, C.; ZAMBONINO-INFANTE, J.; TAKEUCHI, T. Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. **Aquaculture**, v. 227, p. 245-248, 2003.

CALDARA, F. R.; DUCATTI, C.; BERTO, D. A.; DENADAI, J. C.; SILVA, E. T.; ANDRADE, G. A.; GIOSSO, M. M. Glutamina e *turnover* do carbono no tecido adiposo de leitões. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 1601-1607, 2007.

CALDARA, F. R.; DUCATTI, C.; BERTO, D. A.; DENADAI, J. C.; SILVA, E. T.; GARCIA, R. G. Efeito da glutamina sobre o *turnover* do carbono ($\delta^{13}\text{C}$) de músculos e vísceras de leitões desmamados: glutamina e *turnover* de carbono tecidual. **Acta Scientiarum**, v. 30, p. 291-297, 2008.

CESTAROLLI, M.A.; PORTELLA, M.C.; ROJAS, N.E.T. Efeitos do nível de alimentação e do tipo de alimento na sobrevivência e no desempenho inicial de larvas de curimatã *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 24, p. 119-29, 1997.

CONCEIÇÃO, L. E. C.; ARAGÃO, C.; RICHARD, N.; ENGROLA, S.; GAVAIA, P.; MIRA, S. E.; DIAS, J. Avanços recentes em nutrição de larvas de peixes. **Revista Brasileira Zootecnia**, v. 38, p. 26-35, 2009.

DEDI, J.; TAKEUCHI, T.; SEIKAI, T.; WATANABE, T. Hypervitaminosis and safe levels of vitamin A for larval Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed *Artemia* nauplii. **Aquaculture**, v. 133, p. 135-146, 1995.

DeNIRO, M.J.; EPSTEIN, S. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochim. Cosmochim. Acta*, v. 42, p. 495-506, 1978.

DUCATTI, C., CARRIJO, S.A., PEZZATO, A. & MANCERA, P.F.A. Modelo teórico e experimental da reciclagem do carbono-13 em tecidos de mamíferos e aves. **Scientia Agrícola**, v. 59, p. 29-33, 2002.

DUCATTI, C.; MATSUI, E.; SALATTI, E. Fundamentos teóricos dos fatores de correção para a análise das variações relativas das razões $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ por espectrometria de massa. **Energia Nuclear Agrícola**, v.4, p. 41-58, 1982.

ESTÊVÃO, M. D., SILVA, N., REDRUELLO, B., COSTA, R., GREGÓRIO, S., CANÁRIO, A. V. M., POWER, D. M. Cellular morphology and markers of cartilage and bone in the marine teleost *Sparus auratus*. **Cell Tissue Research**, v. 343, p. 619-335, 2012.

FERNANDEZ, I.; GISBERT, E. Senegalese sole bone tissue originated from chondral ossification is more sensitive than dermal bone to high vitamin A content in enriched artemia. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 26, p. 344-349, 2010.

FERNANDEZ, I.; GISBERT, E. The effect of vitamin A on flatfish development and skeletogenesis: a review. **Aquaculture**, v. 315, p. 34-48, 2011.

FERNANDEZ, I.; PIMENTEL, M. S.; ORTIZ-DELGADO, J. B.; HONTORIA, F.; SARASQUETE, C.; ESTÉVEZ, A.; ZAMBONINO-INFANTE, J. L.; GISBERT, E. Effect of dietary vitamin A on Senegalese sole (*Solea senegalensis*) skeletogenesis and larval quality. **Aquaculture**, v. 295, p. 250-265, 2009.

FERNANDEZ, I.; HONTORIA, F.; ORTIZ-DELGADO, J.B.; KOTZAMANIS, Y.; ESTEVEZ, A.; ZAMBONINO-INFANTE, J.L. Larval performance and skeletal deformities in farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fed with graded levels of Vitamin A enriched rotifers (*Brachionus plicatilis*). **Aquaculture**, v. 283, p. 102-115, 2008.

GASTON, T. F.; SUTHERS, I. M. Spatial variation in $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ of liver, muscle and bone in a rocky reef planktivorous fish: the relative contribution of sewage. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 304, p. 17-33, 2004.

HAGA, Y.; DU, S.; SATOH, S.; KOTANI, T.; FUSHIMI, H.; TAKEUCHI, T. Analysis of the mechanism of skeletal deformity in fish larvae using a vitamin A-induced bone deformity model. **Aquaculture**, v. 315, p. 26-33, 2011.

HAGA, Y.; SUZUKI, T.; TAKEUCHI, T. Retinoic acid isomers malformations in postembryonic development of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. **Zoological Science**, v. 19, p. 1105-1112, 2002.

IZQUIERDO, S.; SOCORRO, J.; ROO, J. Studies on the appearance of skeletal anomalies in red porgy: effect of culture intensiveness, feeding habits and nutritional quality of live prey. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 26, p. 320-326, 2010.

JOMORI, R. K. **Organismos vivos e dietas secas na larvicultura do pacu, *Piaractus mesopotamicus* e o uso dos isótopos estáveis de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) como indicadores naturais da incorporação do alimento no tecido larval**. 2005. 151f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2005.

JOMORI, R. K., D. J. CARNEIRO, E. B. MALHEIROS, AND M. C. PORTELLA. Growth and survival of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) juveniles reared in ponds or at different initial larviculture periods indoors. **Aquaculture**, v. 221, p. 277-287, 2003.

JOMORI, R. K.; DUCATTI, C.; CARNEIRO, D. J.; PORTELLA, M. C. Stable carbon ($\delta^{13}\text{C}$) and nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) isotopes as natural indicators of live and dry food in *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) larval tissue. **Aquaculture Research**, v. 39, p. 370-381, 2008.

LALL, P.S.; LEWIS-MCCREA, L.M. Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish-an overview. **Aquaculture**, v. 267, p. 3-19, 2007.

LEITÃO, N. J., PAI-SILVA, M. D., ALMEIDA, F. L. A., PORTELLA, M. C. The influence of initial feeding on muscle development and growth in pacu *Piaractus mesopotamicus* larvae. **Aquaculture**, v. 315, p. 78-85, 2011.

MAZURAS, D.; NOMIKI, G.; DARIAS, M. J.; CHRISTODOULOPOULOU, S.; CAHU, C. L.; ZAMBONINO-INFANTE, J. L.; KOUMOUNDOUROS, G. Optimal levels of dietary vitamin a for reduced deformity incidence during development of european sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) depend on malformation type. **Aquaculture**, v. 294, p. 262-270, 2009.

MENOSSE, O. C. C.; TAKATA, R.; SANCHES-AMAYA, M. I.; FREITAS, T. M.; YÚFERA, M.; PORTELLA, M. C. Alimentação inicial de pacu com dieta microencapsulada produzida experimentalmente e sua relação com o crescimento e estruturas do sistema digestório. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, p. 1-10, 2012.

MUKAI-CORRÊA, R. **Produção de micropartículas por gelificação iônica para alimentação de larvas de peixes: Estudos em Sistema-Modelo com inclusão de micropartículas lipídicas ou emulsão lipídica e Teste in vivo**. Tese de Doutorado em Alimentos e Nutrição. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil. 2008.

NEGM, R.; COBCROFT, J.M.; BROWN, M.R.; NOWAK, B.F.; BATTAGLENE, S. C. The effects of dietary vitamin A in rotifers on the performance and skeletal abnormality of striped trumpeter *Latris lineata* larvae and post larvae. **Aquaculture**, v. 404-405, p. 106-115, 2013.

NEGM, R.; COBCROFT, J.M.; BROWN, M.R.; NOWAK, B.F.; BATTAGLENE, S. C. Performance and skeletal abnormality of striped trumpeter *Latris lineata* larvae and post larvae fed vitamin A enriched *Artemia*. **Aquaculture**, v. 422-423, p. 115-123, 2014.

NRC (NATIONAL RESEARCH COUNCIL). **Nutrients requerimentsof fish**. Washington: National Academy. Washington, EUA. 1993.

PALACIOS, M. E., DABROWSKI, K., ANN, M., ABIADO, G., LEE K. J. Effects of Diets Formulated with Native Peruvian Plants on Growth and Feeding Efficiency of Red Pacu (*Piaractus brachypomus*) Juveniles. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 37, p. 246-255, 2006.

PORTELLA, M. C.; DABROWSKI, K. Diets, physiology, biochemistry and digestive tract development of freshwater fish larvae. In: Cyrino, J.E.P.; Bureau, D.; Kapoor, B.G. (Eds). **Feeding and Digestive Functions in Fishes**, Science Publisher, Academic Press, New Hampshire, EUA, 2008, p. 227-279.

PORTELLA, M. C.; VERANI, J. R.; CESTAROLLI, M. A. Use of live and artificial diets enriched with several fatty acid sources to feed *Prochilodus scrofa* larvae and fingerlings. 1. Effects on survival and growth. **Journal of Aquaculture in the Tropics**, v. 15, p. 45-58, 2000.

PORTELLA, M.C.; TAKATA, R.; LEITÃO, N. J.; LOPES, T. S. Alimentação e Nutrição de Larvas. In: Débora M. Fracalossi e José Eurico P. Cyrino (Eds). **NUTRIAQUA: Nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira**. Ministério da Pesca e Aquicultura, Florianópolis, SC, Brasil, 2012, p. 185-216.

POTTHOFF, T. Clearing and staining techniques. In: H.G. Moser, W.J. Richards, D.M. Cohen, M.P. Fahay, A.W. Kendall Jr. and S.L. Richardson (Eds). **Ontogeny and Systematics of Fishes**. American Society of Ichthyologists and Herpetologists. Special publication, 1984, p. 35-37.

RODRIGUES, J.B; LEITÃO, N.J.; KOJIMA, J.T.; TAKATA, R.; PORTELLA, M.C.; GROSSO, C.R.F. Development of microcapsules containing *Lactobacillus acidophilus* to feed fish larvae. **Anais World Aquaculture Society**. Natal, RN, Brazil. 2011.

ROSS, S.A.; CAFFERY, P.J.; DRAGUER, U.C.; DE LUCA, L.M. Retinoids in embryonal development. **Physiological Reviews** 80: 1021– 1054, 2000.

TAKATA, R. **Dietas desbalanceadas em aminoácidos indispensáveis e a adoção de estratégias na utilização de nutrientes para o pacu, *Piaractus mesopotamicus***. Tese de Doutorado. Centro de Aquicultura da Unesp. Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, SP, Brasil. 2011.

TAKEUCHI, T.; DEDI, J.; HAGA, Y.; SEIDAI, T.; WATANABE, T. Effect of vitamin A compounds on bone deformity in larval Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Aquaculture**, v. 169, p. 155-165, 1998.

TAYLOR, W. An enzyme method of clearing and staining small vertebrates. **Proceedings of the United States Natural Museum**, v. 122, p. 1-17, 1967.

TESSER, M. B.; CARNEIRO, D. J.; PORTELLA, M. C. Co-feeding of pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg 1887) larvae with *Artemia* nauplii and microencapsulated diet. **Journal Applied Aquaculture**, v. 17, p. 47-49, 2006.

TESSER, M.B.; CARNEIRO, D.J.; PORTELLA, M.C. Co-feeding of pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg 1887) larvae with *Artemia* nauplii and microencapsulated diet. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 17, p. 47-49, 2005.

TIESZEN, L. L.; BOUTTON, T. W.; TESDAHL, K. G.; SLADE, N. A. Fractionation and turnover of stable carbon isotopes in animal tissues: Implications for $\delta^{13}\text{C}$ analysis of diet. **Oecologia**, v. 57, p. 32-37, 1983.

TROMBETTA, C.G.; RADÜNZ NETO, J.; LAZZARI, R. Suplementação vitamínica no desenvolvimento de larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*). **Ciência agrotécnica**, v. 30, p. 1224-1229, 2006.

WATANABE, T. **Fish Nutrition and Mariculture**. JICA Textbook - The general aquaculture course. 1988.

ZUANON, J.A.S., PEZZATO, A.C. & DUCATTI, C. Muscle $\delta^{13}\text{C}$ change in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): effects of growth and carbon turnover. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 145, p. 101-107, 2006.

CAPÍTULO 6- Efeito da vitamina A na incidência de anormalidades esqueléticas em larvas de pacu

Resumo

A vitamina A (VA) possui papel central na formação esquelética de larvas de peixes, pois participa da diferenciação, crescimento e desenvolvimento de células e tecidos na fase de embriogênese. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da VA na incidência de anormalidades esqueléticas em larvas de pacu em um experimento desenvolvido em duas fases. Na Fase I foram aplicados dois tratamentos: A₀, náuplios de artêmia e A₅₀ (náuplios de artêmia enriquecidos com 50.000 UI de acetato de retinol, AR), com oito repetições, distribuídos em 16 tanques de 100L (15 larvas/L). Na Fase II, as larvas de cada um dos tratamentos da primeira fase foram redistribuídas em 32 tanques de 50L e passaram a receber quatro dietas formuladas suplementadas ou não com vitamina A: D₀, D₃₀, D₆₀ e D₁₂₀ (0; 30.000; 60.000 e 120.000 UI de AR.kg⁻¹ de dieta, respectivamente), com quatro repetições. A transição do alimento vivo para o alimento formulado foi realizado de forma gradativa por três dias, até a supressão total de alimento vivo. Ao final das duas fases as larvas foram contadas para taxa de sobrevivência, e uma amostra foi avaliada para desempenho e incidência de anomalias esqueléticas. Os resultados indicam que o tratamento que melhor atendeu aos parâmetros avaliados foi o A₀D₃₀ e que, no conjunto das anomalias esqueléticas, esse mostrou-se mais distante da incidência geral, com indícios de que níveis menores de VA são mais agravantes na fase inicial de desenvolvimento, enquanto níveis maiores em estágios posteriores.

Palavras-chave: Anomalias esqueléticas, hipervitaminose A, déficit de vitamina A, metabolismo ósseo.

1. Introdução

Anormalidades esqueléticas têm sido problema para criação de muitas espécies de peixes, pois afetam o crescimento, desenvolvimento e sobrevivência, bem como o valor final de produção (Boglione et al. 2001). Um dos fatores causadores de anomalias é a nutrição, pois tem papel fundamental durante as fases iniciais de desenvolvimento larval (Takeuchi 2001; Cahu et al. 2003; Lall e Lewis-

McCrea 2007). Entre os nutrientes com maior efeito sobre o metabolismo ósseo estão os minerais (cálcio e fósforo) e as vitaminas (A, C e D), que, quando deficientes ou em excessos na dieta, podem levar à incidência de anormalidades esqueléticas (Lall e Lewis-McCrea 2007; Boglione et al. 2003).

Muitos trabalhos enfatizam o papel dos componentes da dieta nos estágios larvais avaliando as necessidades nutricionais, utilizando parâmetros indiretos de crescimento e sobrevivência (Cahu et al. 2003). Porém, pesquisas recentes têm buscado respostas mais específicas que permitam também avaliar a qualidade larval.

Durante o desenvolvimento larval dos peixes ocorre a esqueletogênese, um complexo processo biológico que tem início na embriogênese e continua até a completa formação do peixe, no estágio juvenil. Nesse processo, diferentes células atuam, como os: osteoblastos, condrócitos, osteócitos e osteoclastos (Fernandez e Gisbert 2010).

A vitamina A (VA) desempenha papel fundamental no desenvolvimento ósseo e em outras funções, como visão, reprodução e manutenção (Haga et al. 2002). Suas fontes podem ser de diferentes origens, vegetal (carotenoides) e animal (ésteres de retinol), porém as taxas de conversão variam de acordo com o precursor presente na dieta (Takeuchi 1998). Ingredientes utilizados em dietas para peixes são ricos em VA, como os óleos e farinhas de peixes (Lall e Parazo 1995) e náuplios de artêmia, alimento vivo comumente utilizado durante a alimentação inicial das larvas. O processo de enriquecimento dos náuplios, principalmente com a utilização de ácidos graxos essenciais, que são oferecidos aos náuplios antes de eles serem ofertados às larvas, pode resultar em altas concentrações de VA nestes organismos (Takeuchi 1998; Cahu et al. 2003).

Mais especificamente, a VA regula a esqueletogênese e desenvolvimento cartilaginoso dos peixes, por meio do controle da função dos condrócitos e maturação e proliferação dos osteoclastos. Os osteoclastos estão envolvidos na reabsorção óssea, que quando estimulada pela hipervitaminose A atrasa a produção da matriz óssea, acelerando o desenvolvimento de estruturas esqueléticas pela mineralização precoce (Vasan e Lash 1975), que, por sua vez, pode levar à má formação óssea (Dedi et al. 1995). Entre as regiões mais afetadas pela

mineralização precoce estão a coluna vertebral, que pode manifestar anomalias esqueléticas como curvaturas (lordose, escoliose e cifose), compressão e fusão de vértebras (Dedi et al. 1995, Takeuchi et al. 1995; Haga et al. 2011); e a cabeça (mandíbula) (Haga et al. 2003; Haga et al. 2011).

As informações sobre os níveis de inclusão de VA na dieta são pouco conclusivas. O NRC (1993) recomenda para diferentes espécies níveis entre 1.000 e 3.500 UI kg⁻¹, enquanto estudos com *Paralichthys olivaceus* indicam que doses menores que 50.000 UI kg⁻¹ de dieta previne ocorrência de anomalias esqueléticas (Dedi et al. 1995). Para *Dicentrarchus labrax* melhor desempenho e menor incidência de anormalidades são observadas quando se utiliza doses entre 9.402 e 20.755 UI kg⁻¹ (Mazurais et al. 2009) e 89.350 UI kg⁻¹ para a mesma espécie em outro estudo (Villeneuve et al. 2005), justificado pelas diferenças devido à qualidade entre as desovas desta espécie. Ou seja, o nível seguro de VA pode ser variável de acordo com a espécie e para uma mesma espécie.

O efeito da VA no desenvolvimento e esqueletogênese de peixes tem sido estudado principalmente em peixes marinhos, como *Paralichthys olivaceus* (Takeuchi 1995, Dedi et al. 1995, Haga et al. 2002, 2003); *Pagrus pagrus* (Izquierdo et al., 2010); *Hippoglossus hippoglossus* (Lewis-McCrea e Lall 2010); *Solea senegalensis* (Fernandez e Gisbert 2010, Darias et al. 2012); *Dicentrarchus labrax* (Mazurais et al. 2009). Porém, há escassez de informações para larvas de peixes de água doce, em especial as espécies neotropicais, como o *Piaractus mesopotamicus*, conhecido como pacu.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar a influência da suplementação de VA no desempenho e incidência de anomalias esqueléticas em larvas de pacu alimentadas com náuplios de artêmia enriquecidos ou não com VA e, posteriormente, com dietas formuladas contendo diferentes níveis de suplementação.

2. Material e métodos

2.1. Obtenção das larvas e tratamentos

O experimento foi realizado no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos (LANOA) do Centro de Aquicultura da UNESP, Jaboticabal, SP, no

período de janeiro a março de 2013. Doze mil e oitocentas larvas de pacu recém-eclodidas, obtidas por reprodução induzida, foram aclimatadas em 16 tanques de 100 L (8 larvas L^{-1}), dotados de renovação contínua de água (cerca de 20 vezes o volume por dia) e aeração constante. As larvas foram expostas ao fotoperíodo natural, garantido pela iluminação do laboratório.

O experimento foi dividido em duas fases: a primeira foi constituída por dois tratamentos, com oito repetições. Larvas com seis dias de vida e iniciando a alimentação exógena receberam somente alimento vivo (náuplios de artêmia), por 25 dias em quantidades crescentes (Jomori et al. 2003). Durante esse período, um tratamento (oito tanques) recebeu náuplios enriquecidos com 50.000 UI de acetato de retinol (AR) g^{-1} de cisto (Sigma Aldrich) - A_{50} (Conforme descrito no tópico 2.1 do Cap. 5), e o outro recebeu náuplios sem enriquecimento - A_0 .

Para a segunda fase do experimento, as larvas remanescentes de cada tratamento foram contadas, avaliadas e redistribuídas nos tanques previamente lavados e higienizados, na densidade de duas larvas L^{-1} . No início dessa fase, passaram pelo processo de transição alimentar gradativa, com oferecimento conjunto de náuplios de artêmia e alimento formulado (Tabela 1) por três dias, até a supressão total de náuplios. As larvas de cada tratamento da primeira fase (A_0 e A_{50}) receberam dieta formulada contendo diferentes doses de VA: D_0 , D_{30} , D_{60} e D_{120} (correspondendo a 0, 30.000, 60.000 e 120.000 UI de AR kg^{-1} de dieta, respectivamente), conforme esquema apresentado na Figura 1.

Tabela 1. Dieta formulada semipurificada para larvas de pacu, de acordo com Palacios et al. (2006), com adaptações. Para cada tratamento foi adicionado acetato de retinol (UI kg⁻¹) nas doses preconizadas.

INGREDIENTES	g kg ⁻¹
Caseína ¹	420
Gelatina ²	70
Dextrina ³	238
Celulose ultrafina ⁴	60
Hidrolisado de peixe ⁵	100
Lecitina de soja ⁶	30
Enriquecimento ⁷	22
Óleo de soja ⁸	30
Óleo de girassol ⁹	30
Total	1kg

¹ Sigma Aldrich; ² Dinâmica; ³ Dinâmica; ⁴ Rhostr; ⁵; ⁶ Pantec; ⁷ Premix formulado especialmente pela empresa Amicil SA para ser livre de vitamina A. Composição: 600.000 UI de vitamina D3; 30.000 mg de vitamina E; 3.000 mg de vitamina K3; 4.000 mg de vitamina B1; 4.000 mg de vitamina B2; 3.500 mg de vitamina B6; 8.000 mcg de vitamina B12; 60.000 mg de vitamina C; 20.000 mg ácido nicotínico; 10.000 mg de panteonato de cálcio; 200 mg de biotina; 1.200 mg de ácido fólico; 5.000 mg de antioxidante OxyNil; 3.500 mg de sulfato de cobre; 20.000 mg de sulfato de ferro; 10.000 mg de sulfato de manganês; 24.000 mg de sulfato de zinco; 160 mg de cálcio; 100 mg de sódio, 80 mg de cobalto; 25.000 mg de inositol e 100.000 mg de cloreto de colina; ⁸Lisa; ⁹Lisa

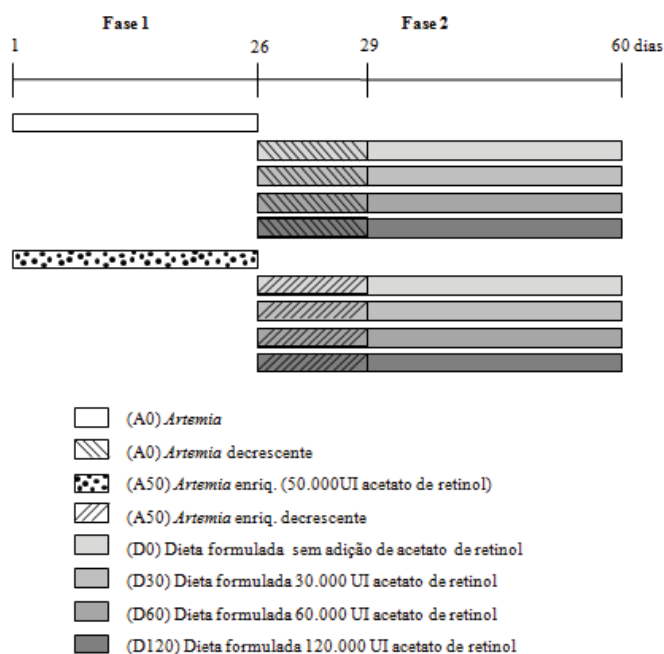


Fig. 1. Fluxograma do experimento: 1-25 dppa (dias pós-primeira alimentação): alimento vivo enriquecido (A₅₀) ou não (A₀); 26-28 dppa: transição alimentar gradual

para dietas com quatro níveis de vitamina A (D_0 , D_{30} , D_{60} e D_{120}), e alimentação exclusiva com as dietas formuladas até 60 dppa.

A análise da composição dos alimentos oferecidos para as larvas no decorrer do período experimental pode ser vista na Tabela 2. Os teores de matéria seca, fibra bruta e extrato etéreo foram determinados como descritos em AOAC (1995). A proteína bruta foi determinada por combustão de Dumas em analisador de nitrogênio (LECO FP-528 LC), seguindo o procedimento descrito por Etheridge et al. (1998). A energia bruta foi realizada por combustão da amostra em bomba calorimétrica, e a análise de VA foi realizada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC), no laboratório de Análises Clínicas LABTEC, Hortolândia, São Paulo.

Tabela 2. Composição centesimal (g kg^{-1}) dos alimentos oferecidos às larvas de pacu durante o experimento: náuplios de artêmia sem (A_0) e com enriquecimento (acetato de retinol, UI g^{-1} de cisto) (A_{50} ;) e dietas formuladas com quatro níveis de vitamina A (acetato de retinol, UI kg^{-1}) (D_0 , D_{30} , D_{60} e D_{120}).

Alimento	Umidade (%)	Proteína Bruta (%)	Energia Bruta (kcal kg^{-1})	Extrato Etéreo (%)	Fibra Bruta (%)	Matéria Mineral (%)	Extrato não Nitrogenado (%)	Vitamina A (UI kg^{-1})	
								Esperado	Encontrado
A_0	85,90	59,38	4650,5	6,50	6,59	9,94	5,89	0*	20.204,4**
A_{50}	85,63	58,46	4482,4	5,46	6,03	9,94	7,67	50.000*	1.115.239,0**
D_0	5,37	47,90	4888,5	8,83	5,41	3,46	29,03	0	470,8
D_{30}	5,47	47,37	4870,2	9,05	5,07	3,37	29,67	30.000	47.210,1
D_{60}	5,84	47,72	4880,7	8,65	4,32	3,43	30,04	60.000	59.630,6
D_{120}	5,05	48,06	4920,1	8,87	4,93	3,35	29,74	120.000	173.720,5

* UI g^{-1} de cisto;

** UI g^{-1} de peso seco.

As larvas receberam o alimento vivo fracionado em seis arraçoamentos diários, e o formulado em cinco. Durante o experimento, os detritos acumulados no fundo dos tanques foram removidos diariamente por sifonamento, as eventuais larvas mortas foram removidas e contabilizadas, e os parâmetros da água foram mensurados, permanecendo em: temperatura a $29,0 \pm 1,1^\circ\text{C}$, oxigênio dissolvido a

$5,17 \pm 0,39 \mu\text{g L}^{-1}$, amônia, nitrito e nitrato em torno de $76,56 \pm 16,30 \mu\text{g L}^{-1}$, $0,99 \pm 0,63 \mu\text{g L}^{-1}$ e $125,35 \pm 7,85 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

2.2. Desempenho zootécnico

Para acompanhar o crescimento na primeira fase, 10 larvas de cada tanque foram coletadas aos 5, 10, 15, 20 e 25 dias pós-primeira alimentação (dppa), eutanasiadas por aprofundamento de anestesia (benzocaína a 0,02%), e fixadas para mensuração do peso úmido, comprimento total (CT) e padrão (CP). Ainda, terminada essa fase, as larvas foram contadas para determinação da taxa de sobrevivência.

Durante a segunda fase, 10 larvas de cada tanque foram coletadas aos 32, 39, 46 e 60 dppa, eutanasiadas, e fixadas para posterior determinação do crescimento (peso, CT e CP). Além disso, todas as larvas foram contadas para avaliação de sobrevivência aos 46 e 60 dppa.

2.3. Anomalias esqueléticas

Ao final da primeira fase, 5% das larvas de cada tanque (80 larvas) foram amostradas, enquanto, na segunda fase, aos 46 e 60 dppa, 10% das larvas de cada tanque (40 larvas) foram coletadas para determinação da incidência de anomalias esqueléticas. Ainda, amostras de cada tratamento, ao final de cada fase, foram coletadas para avaliação da expressão de genes ligados ao metabolismo da VA (RAR, RXR) e o gene de referência 18S (Almeida et al. 2010).

As amostras coletadas foram coradas com azul de alcian e vermelho de alizarina (Potthoff 1984; Darias et al. 2010) para distinção de osso e cartilagem. Juvenis de pacu, com 60 dppa foram congelados e radiografados (Amplitude 26 kv, voltagem 600 mA e tempo de 500 ms) (Koumoundouros et al. 2000).

A incidência de anomalias esqueléticas durante as duas fases experimentais foi avaliada de acordo com o proposto por Boglione et al. (2001). Todas as larvas amostradas foram avaliadas para verificar a presença (1) ou ausência (0) de anormalidades nas regiões da cabeça: mandíbula inferior (MI), mandíbula superior (MS); coluna vertebral: cifose (C), escoliose (E), lordose (L), vértebras anormais (V), que podem ser achatadas (VA) ou fusionadas (VF); e nadadeiras: dorsal (ND), anal

(NA) e caudal (NC). As estruturas foram avaliadas quando essas se encontravam completamente ossificadas. Assim, as amostras da primeira fase não foram avaliadas quanto à incidência de anormalidades nas nadadeiras, pois nem todas as larvas amostradas apresentavam-se com o processo de ossificação completo.

2.4. Análise molecular

2.4.1. Extração e Quantificação do RNA, Análise da Qualidade e Transcrição Reversa

Amostras de pool de larvas (aproximadamente 50 mg) foram coletadas para extração do RNA total com reagente TRIzol® (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), conforme instruções do fabricante. As amostras congeladas foram homogeneizadas com o homogeneizador de tecidos (IKA UltraTurrax/T-25) em 1 mL de TRIzol/50-100 mg de tecido. A solução resultante foi cuidadosamente transferida para um tubo de 1,5 mL e incubada durante 5 minutos à temperatura ambiente, para permitir a completa dissociação dos complexos núcleo-proteicos. Após esse período, foram acrescentados 0,2 mL de clorofórmio e homogeneizado vigorosamente, incubando, na sequência, por 3 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, o material foi centrifugado a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa formada após a centrifugação do material foi separada e o RNA precipitado por intermédio da incubação com 0,5 mL de álcool isopropílico durante 10 minutos à temperatura ambiente. O material foi novamente centrifugado a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C e o sedimento de RNA formado foi lavado com 1 mL de etanol 75%, para nova centrifugação a 7500 x g por 5 minutos a 4°C e remoção cuidadosa do sobrenadante. Após a remoção do excesso de líquido do fundo do tubo, o pellet de RNA foi dissolvido em água-DEPC (água deionizada tratada com Dietilpirocarbonato (DEPC) 0,01% - SIGMA), incubado por 10 minutos a 60°C (para a inativação de qualquer possível resíduo de RNase) e, finalmente, armazenado à -80°C.

O RNA total extraído foi analisado em espectrofotômetro do tipo NanoVue™ Plus (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA), a 260 e 280 nm de absorbância (A). O cálculo da razão entre A260 e A280 forneceu estimativa da qualidade da extração e

pureza do RNA (foram utilizadas somente amostras com razão igual ou superior a 1.8).

A integridade do RNA total extraído foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,5%. A agarose foi dissolvida em tampão TBE 1X (89 mM Tris base, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA) e acrescida do corante GelRed® (Biotium, Hayward, CA, USA). Uma alíquota do RNA total (1 µL), misturada com 5 µL do tampão de aplicação Orange-G, foi aplicada no gel e submetida à corrida eletroforética a 120 V por cerca de 1 hora. O gel de agarose foi corado após a corrida, utilizando-se o SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Os géis foram fotografados sob luz ultravioleta e a integridade do RNA total extraído foi confirmada pela presença das bandas referente ao RNA ribossomal 18S. Ainda, as amostras de RNA foram submetidas a tratamento com DNase, uma enzima que é capaz de degradar todo o DNA genômico contaminante.

Conforme as instruções do protocolo DNase I - Amplification Grade (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), 2 µg do RNA total de cada amostra destinado à reação de transcrição reversa foi transferido para um microtubo estéril, onde foram adicionados 2 µL de 10X DNase I Reaction Buffer, 2 µL de DNase I Amp Grade (1 U/µL) e água-DEPC (tratada com Dietilpirocarbonato-DEPC 0,01% - SIGMA®) na quantidade suficiente para completar 20 µL de solução. Essa solução permaneceu à temperatura ambiente durante 15 minutos e, em seguida, foi acrescida de 2 µL de EDTA (25 mM) e incubada a 65°C por 10 minutos, para a total inativação da enzima DNase I. O tratamento de 2 µg de RNA total com DNase I gerou 22 µL de solução final usada para Transcrição Reversa (RT).

O RNA foi imediatamente transformado em molécula de DNA complementar (cDNA), que possui maior estabilidade e não está sujeito à ação de RNases. A reação de RT foi realizada utilizando-se o High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), onde 2 µg do RNA total tratado com DNase I (22 µL de solução) foram acrescidos de 10 µL de tampão de RT (10X RT Buffer), 4 µL de dNTPs (25X), 10 µL de Random Primers (10X), 5 µL de enzima RT, MultiScribe RT (50 unidades/µL), 2,5 µL de inibidor de ribonuclease recombinante RNaseOUT (40 unidades/µL), e o volume final da reação ajustado para 100 µL com água ultrapura livre de DNase/RNase. Cada amostra foi incubada

a 25°C por 10 minutos, e então a 42°C por 2 horas. Os produtos da reação de RT foram armazenados a -20°C e utilizados nas reações de PCR.

2.4.2. Padronização da PCR Tradicional

Os produtos da reação de RT foram submetidos à reação de PCR, onde 1,0 µL de cada cDNA foi adicionado a 0,5 µL de cada primer, *forward* e *reverse* (10 µM), 0,5 µL de água ultrapura e 22,5 µL de Platinum® PCR Supermix (22 U/mL de Platinum® Taq DNA Polymerase, 22 mM Tris-HCl pH 8,4, 55 mM KCl, 1,65 mM MgCl₂, 220 µM dNTPs - Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), em um volume final de 25 µL de solução.

Os *primers* para RARα e RXRα foram desenhados a partir das sequências parciais desses genes em *Paralichthys olivaceus* e *Danio rerio*, respectivamente (Números de Acesso: AB0737821 e NM-001161551.2), publicadas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/nucleotide). Como referência, por não apresentar variação significativa para os receptores nos diferentes tratamentos a serem analisados, foi utilizado o gene RNA ribossomal 18S (rRNA 18S) nas amostras de pacu, descrito por Almeida et al. (2010) (número de acesso: FJ686692).

Todos os produtos da reação de PCR foram verificados por sequenciamento nucleotídico no ABI 377 Automated DNA Sequencer (Applied Biosystems, USA), utilizando-se os procedimentos do BigDye® Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As sequências nucleotídicas parciais obtidas foram analisadas por meio da ferramenta BLASTn (Altschul et al., 1990), disponível no site do *National Center for Biotechnology Information* – NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), para comparar os fragmentos amplificados com aqueles de outros peixes teleósteos publicados.

As sequências parciais obtidas para os receptores RARα e RXRα foram utilizadas para desenhar os respectivos *primers* da PCR quantitativa (qPCR), utilizando-se o software Primer Express® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) (Tabela 3).

Tabela 3. Sequência dos *primers* utilizados na qPCR para pacu, *Piaractus mesopotamicus*.

Receptores	Primer	Sequencia (5'-3')
RAR α	Forward	CCATGACCTTTTCGGATGGT
	Reverse	GCCGGCATTATGCATCTGA
RXR α	Forward	CCCTGGACGATCAGGTCATT
	Reverse	GAAGCGATGAGCAGCTCGTT

2.4.3 PCR quantitativa e expressão gênica relativa

Para normalização dos dados de expressão gênica quantitativa foi utilizado como referência passiva o gene do RNA ribossomal 18S (rRNA 18S), após análises estatísticas comparativas que demonstraram este ser um gene estável entre os grupos.

A análise das eficiências de amplificação dos *primers* foi feita mediante análise da curva-padrão (CP), composta por uma série de sete diluições, a partir de uma solução inicial que continha cDNA das amostras musculares de todos os animais. Para que o método de quantificação relativa do Ct Comparativo (ΔCt) pudesse ser usado, foi necessário fazer sua validação, determinando se a eficiência de amplificação dos genes alvo é similar à eficiência de amplificação do gene endógeno (*User Bulletin #2*, Applied Biosystems, 2001). Os valores de Ct, obtidos a partir das CPs para cada um desses genes, foram utilizados para construir gráficos representando, no eixo y, o valor de ΔCt (onde $\Delta Ct = Ct_{\text{gene alvo}} - Ct_{\text{gene de referência}}$) e, no eixo x, o valor do *log* das concentrações de cDNA utilizado nas diluições (dados não apresentados). Como o valor da inclinação da reta estava entre os valores de -0.1 e 0.1 para todos os genes, o método do ΔCt pôde ser utilizado.

A PCR quantitativa foi realizada para os receptores RAR α e RXR α , utilizando o Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), conforme instruções do fabricante, com 2 μL do produto da RT (equivalente a 40 ng de RNA total), 12,5 μL de Power SYBR[®] Green Mix (2,5X), *primers forward* e *reverse* (400 nM) e água-DEPC suficiente para um volume final de 25 μL de solução. As reações para cada gene foram realizadas em triplicata no Sistema *QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System* (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Ao término de cada PCR, foi realizada a análise da curva de dissociação dos fragmentos amplificados, permitindo avaliar a especificidade de cada conjunto de

primers utilizado. Os valores de expressão gênica relativa da RAR α e RXR α foram obtidos mediante quantificação pelo Método do Ct Comparativo (Livak & Schmittgen 2001), após validação do mesmo e normalização pelo controle endógeno de menor variação entre os grupos, o gene do RNA ribossomal 18S.

2.5. Análise estatística

Os delineamentos experimentais foram em DIC, considerando, na primeira fase, dois tratamentos com alimento vivo (A_0 e A_{50}), com oito repetições cada. Na segunda fase, o experimento foi conduzido em esquema fatorial (2×4), considerando dois tipos de alimentação inicial (A_{50} e A_0) e quatro dietas com diferentes níveis de VA (D_0 , D_{30} , D_{60} e D_{120}), com quatro repetições para cada tratamento. Os dados de desempenho foram analisados pela análise de variância paramétrica (ANOVA), com parcela subdividida no tempo para os dados da primeira fase. Quando verificadas diferenças estatísticas, as médias foram comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5%, utilizando o software SAS 9.1, SAS Institute, Cary, NC, USA. Ainda, para análise de incidência de anormalidades esqueléticas nas duas fases experimentais foi utilizada estatística multivariada, por meio de análise de correspondência, no software Statistica 7.0.

3. Resultados

3.1. Desempenho zootécnico

A taxa de sobrevivência na primeira fase foi de $67,8 \pm 12,4\%$ para A_0 e de $70,3 \pm 12,5$ para A_{50} , estatisticamente semelhantes. As médias de peso, CT e CP, avaliadas ao longo do tempo em cada tratamento, encontram-se na Tabela 4. Os tratamentos não resultaram em diferenças significativas para os parâmetros avaliados ($P=0,8743$; $0,7724$; $0,5940$; respectivamente). Porém, houve diferenças ao longo do tempo, com as larvas alcançando $71,34 \pm 7,24$ e $76,10 \pm 15,71$ mg de peso ao final de 25 dppa, para A_0 e A_{50} respectivamente ($P<0,0001$).

Tabela 4. Peso, comprimento total (CT) e comprimento padrão (CP) de larvas de pacu na primeira fase experimental (5 a 25 dias pós-primeira alimentação, dppa), alimentados com náuplios de artêmia enriquecidos (50.000 UI kg⁻¹ de acetato de retinol, A₅₀) ou não (A₀) com vitamina A.

Trat.		Dppa				
		5	10	15	20	25
Peso (mg)	A ₀	2,60±0,40 ^{Ae}	12,13±2,08 ^{Ad}	27,42±4,93 ^{Ac}	59,90±6,77 ^{Ab}	71,34±7,24 ^{Aa}
	A ₅₀	1,97±0,32 ^{Ae}	12,5±3,16 ^{Ad}	30,47±9,15 ^{Ac}	53,55±12,41 ^{Ab}	76,10±15,71 ^{Aa}
CT (mm)	A ₀	6,92±0,26 ^{Ae}	10,89±0,70 ^{Ad}	12,32±1,03 ^{Ac}	16,53±0,77 ^{Ab}	17,19±0,34 ^{Aa}
	A ₅₀	6,50±0,29 ^{Ae}	10,82±0,70 ^{Ad}	12,71±1,39 ^{Ac}	15,65±1,00 ^{Ab}	17,52±0,59 ^{Aa}
CP (mm)	A ₀	6,30±0,26 ^{Ae}	9,68±0,69 ^{Ad}	10,27±0,57 ^{Ac}	13,94±0,31 ^{Ab}	14,14±0,52 ^{Aa}
	A ₅₀	5,96±0,26 ^{Ae}	9,42±0,47 ^{Ad}	10,71±1,03 ^{Ac}	14,67±3,67 ^{Ab}	14,31±0,40 ^{Aa}

*Mesma letra maiúscula para coluna e minúscula para linha em cada parâmetro indica ausência de diferença estatística (teste de Tukey, P>0,05).

As taxas de sobrevivência da segunda fase, aos 46 e 60 dppa, podem ser vistas na Tabela 5. Não houve diferença estatística aos 46 dppa, e aos 60 dppa, os dois últimos tratamentos apresentaram diferenças estatísticas em relação aos demais. Desta forma, durante a segunda fase, as taxas de sobrevivência mantiveram-se elevadas para a maioria dos tratamentos, mostrando boa aceitabilidade da dieta pelas larvas, com exceção apenas dos tratamentos A₀D₆₀, A₅₀D₆₀ e A₅₀D₁₂₀, com destaque para A₅₀D₆₀, cuja queda foi de 38,8% entre as duas avaliações. Não houve diferença entre as médias de peso, CT e CP entre os tratamentos aos 32 (P=0,9751; 0,8123 e 0,6980), 39 (P=0,8521; 0,8126 e 0,7450) e 46 dppa (P=0,8127; 0,8450 e 0,7230; respectivamente). O crescimento ao longo desta fase, para cada tratamento, pode ser observado na Figura 2.

Tabela 5. Taxa de sobrevivência de larvas de pacu aos 46 e 60 dias pós-primeira alimentação (dppa, que receberam náuplios de artêmia sem (A_0) e com enriquecimento de 50 mil UI g^{-1} de vitamina A (A_{50}) na primeira fase, passando para dietas suplementadas com 0, 30, 60 e 120 mil UI kg^{-1} de vitamina A (D_0 , D_{30} , D_{60} e D_{120} , respectivamente).

Tratamentos	Sobrevivência (%)	
	46 dppa	60 dppa
A_0D_0	86,9±14,4	98,5±9,5 ^a
A_0D_{30}	92,5±6,4	86,0±2,1 ^a
A_0D_{60}	95,4±4,0	80,0±11,2 ^a
A_0D_{120}	92,5±3,9	95,0±2,1 ^a
$A_{50}D_0$	78,9±8,4	96,0±7,4 ^a
$A_{50}D_{30}$	91,8±5,2	97,5±11,1 ^a
$A_{50}D_{60}$	85,8±8,1	47,0±14,9 ^b
$A_{50}D_{120}$	91,1±6,2	63,0±12,7 ^b

*Letras diferentes para linha indicam que houve diferença estatística entre os tratamentos (teste de Tukey, $P < 0,05$).

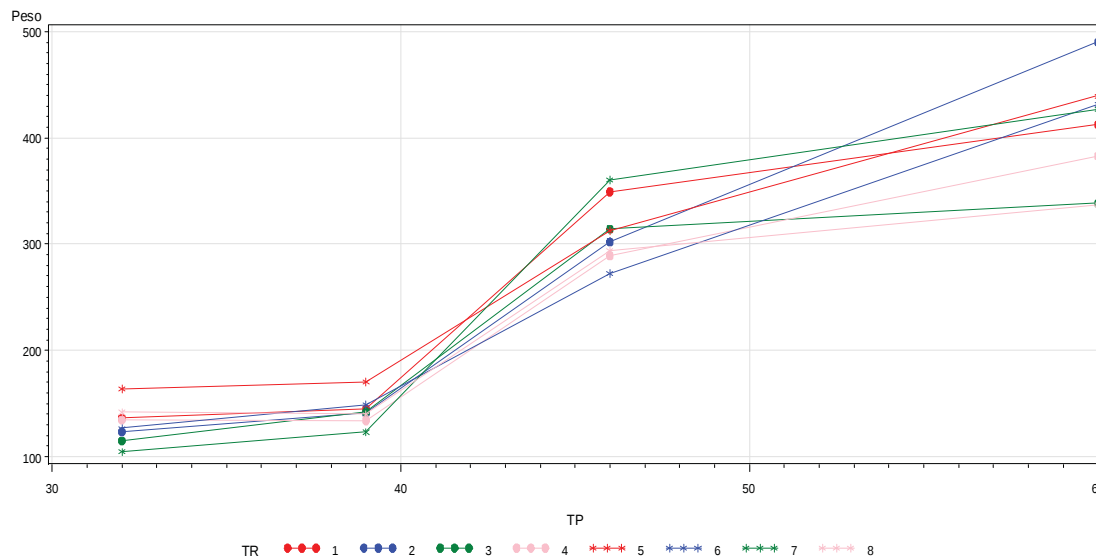


Fig. 2. Peso (mg) das larvas de pacu ao longo do tempo (TP) na segunda fase experimental, aos 32, 39, 46 e 60 dias pós-primeira alimentação (dppa), quando receberam dietas com diferentes níveis de vitamina A: legenda de 1 a 8 para A_0D_0 , A_0D_{30} , A_0D_{60} , A_0D_{120} , $A_{50}D_0$, $A_{50}D_{30}$, $A_{50}D_{60}$ e $A_{50}D_{120}$, respectivamente.

Ao final do período experimental (60 dppa), não houve diferença estatística para CT e CP entre os tratamentos ($P=0,8931$ e $0,7111$, respectivamente). Porém houve interação para peso entre os tratamentos que receberam alimento vivo (artêmia) sem (A_0) e com enriquecimento (A_{50}) ($P=0,0310$). O tratamento A_0D_{30} foi significativamente melhor, seguido pelo A_0D_0 , que por sua vez não diferiu dos tratamentos A_0D_{60} e A_0D_{120} . Os demais tratamentos não diferiram entre si, apenas pode-se notar que o $A_{50}D_{30}$ foi estatisticamente inferior ao A_0D_{30} (Tabela 6).

Tabela 6. Peso de larvas de pacu aos 60 dias pós-primeira alimentação (dppa, que receberam náuplios de artêmia sem (A_0) e com enriquecimento de 50 mil UI g^{-1} de vitamina A (A_{50}) na primeira fase, passando para dietas suplementadas com 0, 30, 60 e 120 mil UI kg^{-1} de vitamina A (D_0 , D_{30} , D_{60} e D_{120} , respectivamente).

Dieta formulada	Artêmia	
	A_0	A_{50}
D_0	414,73±28,99 ^{ABa}	408,27±38,26 ^{Aa}
D_{30}	500,93±53,33 ^{Aa}	395,31±35,21 ^{Ab}
D_{60}	335,10±30,78 ^{Ba}	386,54±68,52 ^{Aa}
D_{120}	387,70±46,62 ^{Ba}	352,09±6,62 ^{Aa}

*Letras diferentes, maiúscula para coluna e minúscula para linha, indicam que houve diferença estatística entre os tratamentos (teste de Tukey, $P<0,05$).

3.2. Anomalias esqueléticas

As principais anomalias esqueléticas observadas nas larvas e juvenis de pacu foram nos pterigióforos da nadadeira dorsal (Figura 3.1), mandíbula inferior e superior (Figuras 3.2, 3.3 e 3.4), nas vértebras e raios da nadadeira caudal (Figuras 3.5, 3.6 e 3.7), na presença de achatamento ou fusão das vértebras da coluna (Figuras 3.8 e 3.9) e ausência de raios na nadadeira anal (Figuras 3.10).

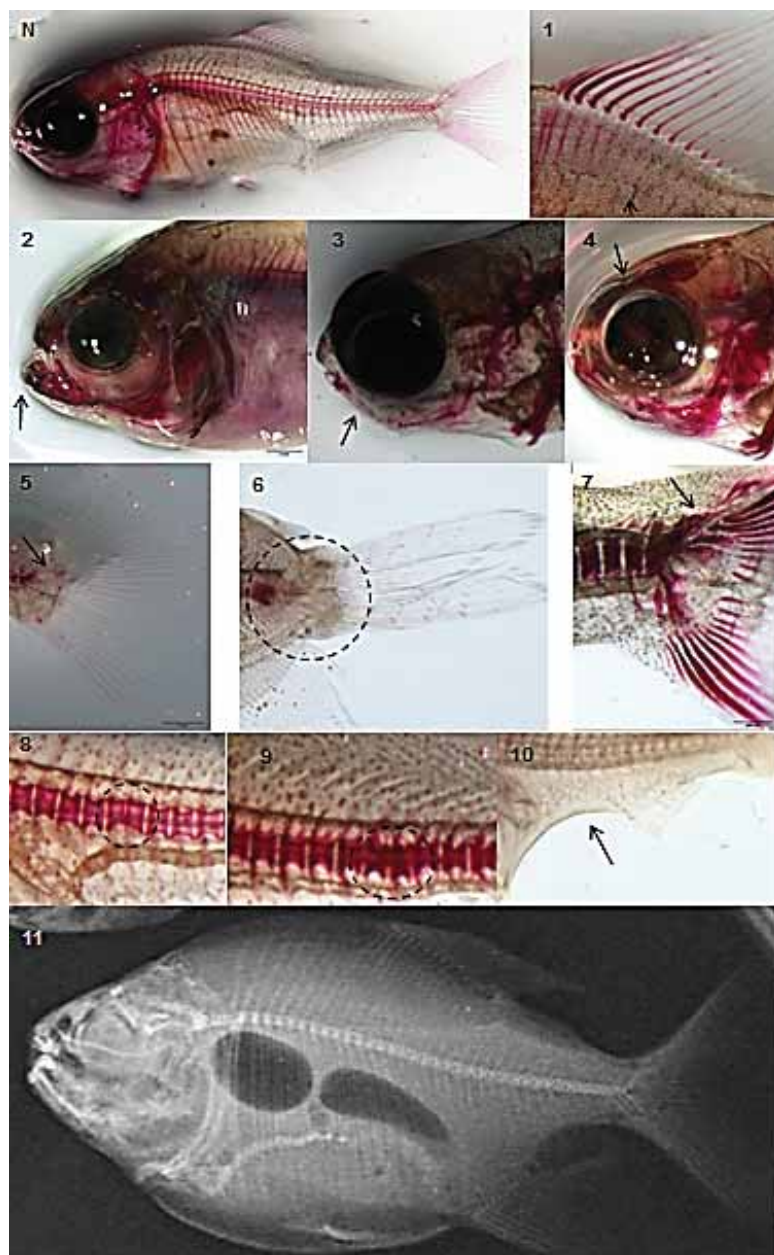


Fig. 3. Principais anomalias esqueléticas observadas em larvas (amostras coradas) e juvenil (raio-X) de pacu. Larva (N) e juvenil (11) normais, e anomalias em: 1- Pterigióforos da nadadeira dorsal; 2- Mandíbula inferior (prognata); 3- Mandíbula inferior; 4- Mandíbula superior (achatada); 5- Nadadeira caudal (trifurcada); 6- Complexo caudal; 7- Uróstilo; 8- Vértebra (fusionada); 9- Vértebra (achatada); 10- Nadadeira anal.

O mapeamento da distribuição dos tratamentos experimentais das duas fases em relação à incidência das anomalias esqueléticas mostra-se por meio da análise exploratória dos dados. Pela análise de correspondência é possível observar a disposição de cada tratamento, que segue padrões de normalidade de acordo com a distância do eixo central. As anomalias esqueléticas observadas estão definidas pelo espaço dos dois primeiros eixos correspondentes (Autovalor 1 e Autovalor 2, que constituem juntos, no mínimo, 60% da variância geral dos dados) nas Figuras 4, 5 e 6.

Na primeira fase experimental, verifica-se claramente a diferença no posicionamento dos dois tratamentos (A_0 e A_{50}) em relação à incidência de anomalias (Figura 4). Larvas alimentadas com náuplios de artêmia sem enriquecimento (A_0) apresentam-se principalmente no lado esquerdo, e relacionaram-se com as anomalias dos tipos MI, MS e L (mandíbula inferior, mandíbula superior e lordose, respectivamente), embora algumas repetições apresentaram tendência às anomalias C e V (cifose e vértebras). Diferentemente, as larvas alimentadas com náuplios de artêmia enriquecidos com VA se posicionam nos quadrantes opostos, mostrando-se mais distantes das anomalias esqueléticas em geral, e entre as anormalidades mais próximas estão as dos tipos E e V (escoliose e vértebras).

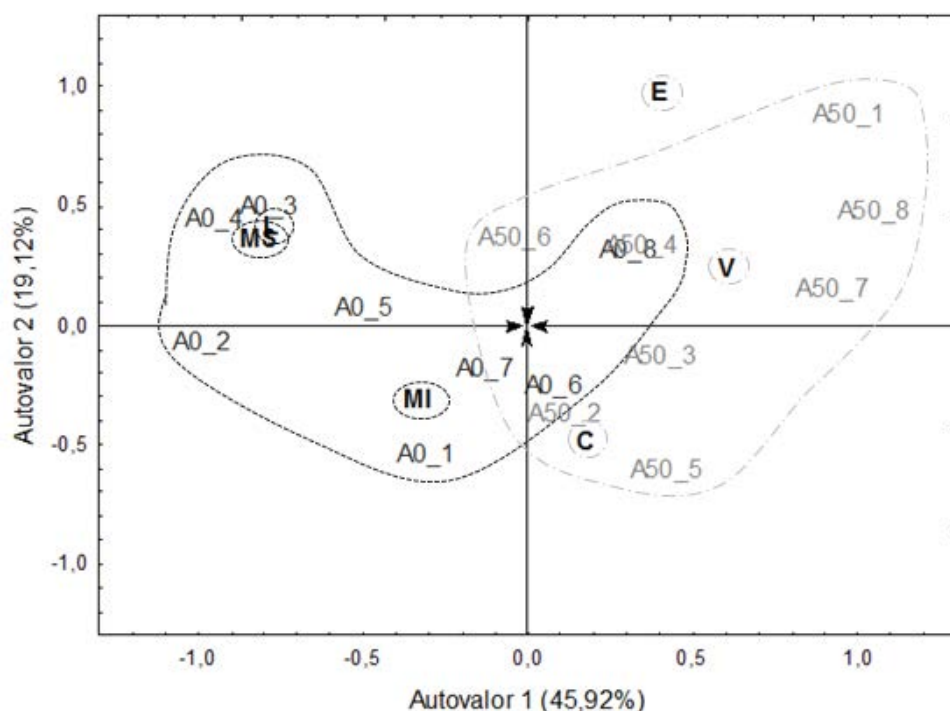


Fig. 4. Distribuição dos tratamentos experimentais, larvas de pacu alimentadas com náuplios de artêmia sem (A0) e com (A50) enriquecimento de vitamina A, em relação à incidência de anomalias esqueléticas observadas ao final de 25 dias pós-alimentação. (MI) mandíbula inferior, (MS) mandíbula superior, (C) cifose, (E) escoliose, (L) lordose e (V) vértebras.

Na segunda fase, aos 46 dppa, todos os tipos de anomalias esqueléticas estudadas foram observados nos animais e os dois grupos experimentais (ou seja, as larvas que receberam na primeira fase náuplios enriquecidos ou não com VA) manifestaram pelo menos um dos tipos de anomalias (Figura 5). A anormalidade com menor incidência foi a nadadeira dorsal, seguido pela cifose. O tratamento que apresentou maior incidência de anomalias esqueléticas foi o $A_{50}D_0$, por sua proximidade ao eixo central. Ainda, a incidência de anomalias esqueléticas de acordo com a região afetada aos 46 dppa, para cada tratamento pode ser vista na Tabela 7, sendo que a região mais afetada foi a cabeça, no tratamento A_0D_0 (MI), seguida pela coluna vertebral, nos tratamentos A_0D_0 (E) e A_0D_{30} (VF), e nadadeiras, nos tratamentos $A_{50}D_{120}$ (ND) e A_0D_0 (NA).

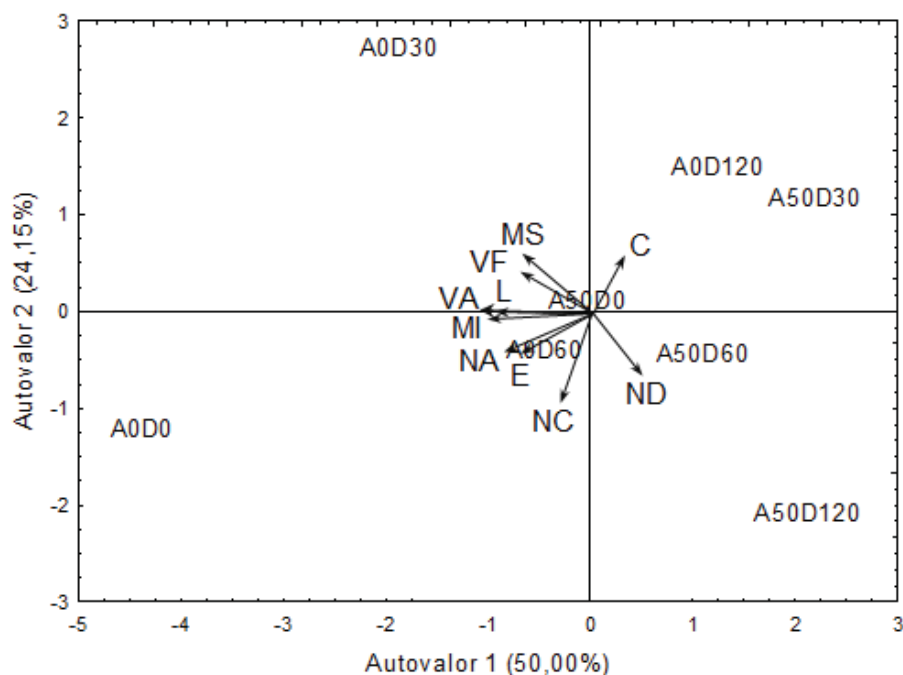


Fig. 5. Distribuição dos tratamentos experimentais constituídos por larvas de pacu alimentadas com dietas contendo níveis de inclusão de vitamina A, em relação à incidência de anomalias esqueléticas observadas ao final de 46 dias pós-primeira-alimentação. A₀ e A₅₀: tratamentos da primeira fase do experimento (5 a 25 dppa) que, na sequência, receberam as dietas D₀, D₃₀, D₆₀, D₁₂₀, com inclusões de vitamina A em 0, 30, 60 e 120 mil UI de acetato de retinol kg⁻¹ de dieta, respectivamente. MI-mandíbula inferior, MS-mandíbula superior, C-cifose, E-escoliose, L-lordose e VA-vértebras achatadas, VF-vértebras fusionadas, ND-nadadeira dorsal, NA-nadadeira anal e NC-nadadeira caudal.

Tabela 7. Porcentagem de incidência de anomalias esqueléticas de acordo com a região do esqueleto de larvas de pacu, em cada tratamento com níveis de vitamina A, ao final de 46 dppa.

Tratamentos	Cabeça	Coluna vertebral	Nadadeiras ímpares
A ₀ D ₀	25,0±20,8 ^a	17,5±17,3 ^a	7,5±7,0 ^a
A ₀ D ₃₀	20,0±19,3 ^b	17,5±20,1 ^a	0 ^c
A ₀ D ₆₀	12,5±11,1 ^c	8,8±11,6 ^{ab}	2,5±2,9 ^c
A ₀ D ₁₂₀	10,0±7,3 ^c	6,3±10,4 ^{ab}	1,25±2,5 ^c
A ₅₀ D ₀	8,8±9,8 ^c	11,3±14,0 ^a	3,8±4,8 ^b
A ₅₀ D ₃₀	5±7,3 ^c	6,25±2,5 ^b	1,25±2,5 ^c
A ₅₀ D ₆₀	8,8±7,7 ^c	3,8±5,4 ^b	5,0±7,9 ^b
A ₅₀ D ₁₂₀	6,3±4,8 ^c	3,8±7,5 ^b	10,0±17,0 ^a
Média±DP	12,1±7,0	9,4±5,6	3,9±3,4

*Mesma letra para coluna indica ausência de diferença estatística (teste de Tukey, P>0,05).

**A₀ e A₅₀: tratamentos da primeira fase do experimento (5 a 25 dppa) que, na sequência, receberam as dietas D₀, D₃₀, D₆₀, D₁₂₀, com suplementação de 0, 30, 60 e 120 mil UI de acetato de retinol Kg⁻¹ de dieta, respectivamente.

Ao fim da segunda fase, em todos os tratamentos observou-se que as larvas continuaram manifestando pelo menos um tipo de anomalia esquelética. Porém, algumas foram registradas como ausentes (E, VF, ND, NA e NC) por, não ter se manifestado de fato, ou devido a possível limitação da técnica utilizada (raio X) para avaliar os animais que, neste estágio, já alcançavam a metamorfose (Figura 6). De forma geral, os tratamentos com alimentação inicial enriquecida foram os que se apresentaram mais próximos às anomalias, assim como os tratamentos A₀D₆₀ e A₀D₁₂₀, no quadrante das anomalias do tipo lordose e na mandíbula superior. Os tratamentos A₀D₀ e A₀D₃₀ foram os que menos se correlacionaram com anomalias.

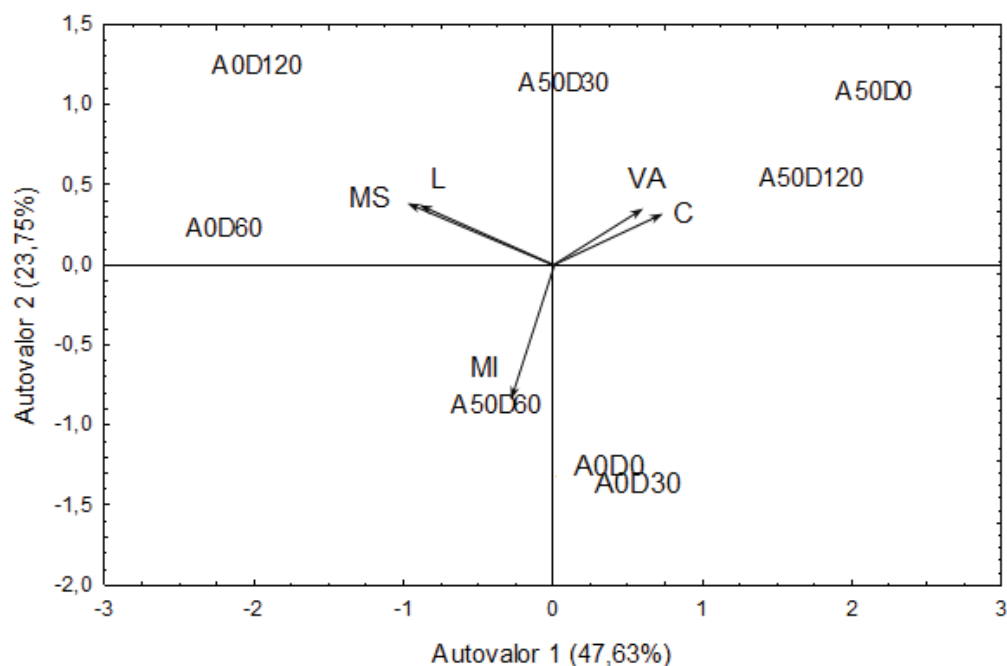


Fig. 6. Distribuição dos tratamentos experimentais constituídos por larvas de pacu alimentadas com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de vitamina A, em relação à incidência de anomalias esqueléticas observadas ao final de 60 dias pós-alimentação. A₀ e A₅₀: tratamentos da primeira fase do experimento (5 a 25 dpa) que, na sequência, receberam as dietas D₀, D₃₀, D₆₀, D₁₂₀, com inclusões de vitamina A em 0, 30, 60 e 120 mil UI de acetato de retinol, respectivamente. (MI) mandíbula inferior, (MS) mandíbula superior, (C) cifose, (E) escoliose, (L) lordose e (V) vértebras.

A incidência de anomalias esqueléticas em cada região do esqueleto de juvenis de pacu ao fim do período experimental (60 dppa), nos tratamentos com diferentes níveis de VA, pode ser vista na Tabela 8. A região mais afetada continuou sendo a cabeça, com considerável aumento em relação ao verificado aos 46 dppa, seguida pela coluna vertebral, sendo que não foram observadas anomalias nas nadadeiras ímpares.

Tabela 8. Porcentagem de incidência de anomalias esqueléticas de acordo com a região do esqueleto de larvas de pacu, em cada tratamento com níveis de vitamina A, ao final de 60 dppa.

Tratamentos	Cabeça	Coluna vertebral
A ₀ D ₀	20±18,3 ^b	0 ^c
A ₀ D ₃₀	20±14,1 ^b	0 ^c
A ₀ D ₆₀	40±11,5 ^a	10±11,5 ^b
A ₀ D ₁₂₀	30±11,5 ^{ab}	10±8,2 ^b
A ₅₀ D ₀	10±11,5 ^c	20±16,3 ^a
A ₅₀ D ₃₀	10±8,2 ^c	0 ^c
A ₅₀ D ₆₀	30±8,2 ^{ab}	0 ^c
A ₅₀ D ₁₂₀	10±11,5 ^c	20±23,1 ^a
Média	21,3±11,3	7,5±8,9

*Mesma letra para coluna indica ausência de diferença estatística (teste de Tukey, P>0,05).

**A₀ e A₅₀: tratamentos da primeira fase do experimento (5 a 25 dppa) que, na sequência, receberam as dietas D₀, D₃₀, D₆₀, D₁₂₀, com suplementação de 0, 30, 60 e 120 mil UI de acetato de retinol kg⁻¹ de dieta, respectivamente.

3.4. Análises moleculares

Não houve diferença na expressão do RARα (P=0,9581) e RXRα (P=0,2345) entre os tratamentos da primeira fase (A₀ e A₅₀), pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. Da mesma forma, na fase 2 também não foram evidenciadas diferenças estatísticas para o RARα (P=0,7370) e RXRα (0,3670), entre os níveis de VA.

4. Discussão

O desempenho de crescimento larval obtido neste estudo, em ambas fases de alimentação é considerado satisfatório quando comparado a outros resultados experimentais com larvas de pacu nas mesmas fases de desenvolvimento (Tesser et al. 2005; Jomori et al. 2008; Leitão et al. 2011; Menossi et al. 2012). Apesar do desempenho satisfatório, não houve diferença entre os tratamentos com e sem enriquecimento de VA na primeira fase. Isso pode estar relacionado ao fato dos náuplios de artêmia, mesmo sem enriquecimento (A₀), terem apresentado níveis de VA em torno de 20 mil UI g⁻¹ de peso seco, o que pode ter atendido às exigências

das larvas de pacu. Por outro lado, o tratamento que utilizou acetato de retinol para enriquecimento da artêmia (A_{50}) aumentou 55 vezes a quantidade de VA (cerca de 1 milhão UI g^{-1} de peso seco) em relação à artêmia não enriquecida. Mesmo assim, esse valor elevado não comprometeu o crescimento das larvas.

A VA utilizada nos procedimentos de enriquecimento/suplementação de dietas pode ser de diferentes formas: carotenoides (vegetal), ésteres de retinol (sintético) ou xantinas (animal). Cada uma destas formas é assimilada de maneira diferente pelos alimentos vivos, sejam eles náuplios de artêmia ou rotíferos, comumente utilizados na alimentação de larvas. O acetato de retinol, assim como o palmitato de retinol, são ésteres de retinol, e são as formas mais recomendadas para utilização na alimentação inicial das larvas, porque são menos tóxicas (Takeuchi et al. 1998; Fernandez e Gisbert 2011; Negm et al. 2013). Takeuchi et al. (1998) avaliaram diferentes fontes de VA, e os náuplios de artêmia enriquecidos com acetato de retinol (Wako) foram os que apresentaram maior quantidade de VA. Essa fonte foi também a que resultou em menor toxicidade às larvas, em comparação aos outros precursores: retinol (purity 80-83%, Sigma), palmitato de retinol (Nippon Roche), e *all-trans* ácido retinóico (pureza 97%, Wako), mesmo em menores quantidades de VA. Isso foi atribuído à baixa habilidade desse organismo zooplancônico em metabolizar o acetato de retinol. Ou seja, o efeito da VA do alimento, no desempenho e esqueletogênese das larvas, depende mais da forma de VA inclusa na dieta do que do conteúdo total de VA presente no alimento (Boglione et al. 2013). Sendo assim, apesar da quantidade de VA no alimento vivo enriquecido oferecido às larvas de pacu, aparentemente não ocorreu toxicidade, por se tratar do acetato de retinol como precursor.

Em relação às anomalias esqueléticas na primeira fase, observou-se que os peixes do tratamento A_0 se destacaram para anomalias na região da cabeça, assim como visto para larvas de *Sparus aurata*, em que anomalias na mandíbula e maxila ocorreram quando não houve suplementação de VA (Fernandez et al. 2008). Por outro lado, os animais do tratamento A_{50} apresentaram mais anomalias na coluna vertebral (cifose, escoliose e vértebras anormais), possivelmente por ser região mais susceptível à toxicidade pela VA (Haga et al. 2011).

De forma geral, os retinóides são assimilados pelas larvas por complexo metabolismo que envolve alto número de proteínas transportadoras e enzimas, que controlam a absorção, transporte, acúmulo e conversão das formas ativas (Boglione et al. 2013). Ainda, duas classes de receptores transmitem a atividade do ácido retinóico, são eles o receptor do ácido retinóico (RAR) e retinóides X receptor (RXR), que pertencem a superfamília de receptores da grande categoria dos fatores de transcrição. Assim, o ácido retinóico pode controlar, direta ou indiretamente, a transcrição de mais de 300 genes, pela regulação direta da expressão gênica, através da exibição de um elemento-resposta do ácido retinóico do promotor gênico, ou através da cascata de sinalização (Boglione et al. 2013). Analisando a expressão do RAR α e RXR α no tecido de larvas de pacu que receberam ambos tratamento (A₀ e A₅₀), não foram observadas diferenças na expressão destes receptores. Desta forma podem ser levantadas duas hipóteses: o acetato de retinol, como precursor de VA, pode não ter sido assimilado pelas larvas de pacu como esperado, ou as larvas controlam a absorção da VA ao nível intestinal, prevenindo o acúmulo excessivo nas células alvo, como visto para larvas de *Solea senegalensis* (Fernandez et al. 2012).

Estudos vêm utilizando dietas semi-purificadas para o pacu (Tesser et al. 2005) e espécies semelhantes como o tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Hernandez et al. 1995) e pirapitinga (*P. brachypomus*) (Vasquez-Torres et al. 2002; Palacios et al. 2006). Tais estudos indicaram que dietas a base de caseína resultaram em crescimento e taxa de conversão satisfatórios. Desta forma, optou-se por utilizar uma dieta semi-purificada a base de caseína-gelatina para conseguir controlar os níveis de VA mais próximos do esperado, principalmente no tratamento D₀. A utilização prévia de uma fonte de caseína livre de vitamina A (Sigma-Aldrich) resultou em aceitação muito baixa da dieta formulada, com consequências negativas para o crescimento das larvas (Lopes et al., Capítulo 5 da presente Tese). Dessa forma, optou-se pela caseína convencional (Sigma-Aldrich), e a aceitação e ingestão foram satisfatórias, comprovadas pelo crescimento demonstrado pelas larvas.

Após a transição alimentar do alimento vivo para dietas com níveis de suplementação de VA, o desempenho das larvas foi acompanhado periodicamente, porém as larvas não apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos. Por outro lado, ao final de 60 dppa, houve diferença entre o peso alcançado pelas larvas,

sendo que os tratamentos que receberam alimento inicial sem enriquecimento foram melhores, com destaque para o tratamento A₀D₃₀. Uma vez que a dieta sem suplementação de VA apresentou apenas 470 UI kg⁻¹ de dieta (equivalente a 0,0017 mg g⁻¹ de dieta), e as com suplementação chegaram a 47, 59 e 170 mil UI kg⁻¹, respectivamente (que equivalem a 0,0178; 0,0224; e 0,0646 mg g⁻¹ de dieta), podemos sugerir que o tratamento A₀D₃₀ foi o que melhor atendeu às exigências das larvas de pacu. Entretanto, mesmo o menor nível utilizado não pode ser considerado como hipovitaminose A, pois esta condição se caracteriza por baixo crescimento e ossos anormais, além de anorexia, prejuízo visual, queratinização do tecido epitelial e hemorragias na base das nadadeiras (Boglione et al. 2013), características que não foram evidenciadas nos juvenis de pacu. Estudos sobre VA se concentram, na maioria, em hipervitaminose A, que, por sua vez, está associada com fígado e baço inchados, anemia, crescimento anormal, lesões na pele, queratinização epitelial, hiperplasia da cartilagem da cabeça e ossos anormais, principalmente curvaturas na coluna e fusão de vértebras (Halver 2002; Boglione et al. 2013). Devido à dificuldade em garantir níveis distintos de VA no alimento vivo, principalmente se for necessário reduzir a quantidade de VA presente para simular hipovitaminose (Boglione et al. 2013), tem-se utilizado dietas formuladas para investigar o efeito do déficit desta vitamina. Larvas de *Dicentrarchus labrax* alimentadas com 0,011 mg g⁻¹ de dieta apresentaram moderada incidência de anomalias esqueléticas (Villeneuve et al. 2005), diferente do ocorrido para larvas de pacu, mesmo a dieta possuindo um menor nível de VA (0,0017 mg g⁻¹).

Os tratamentos nos quais as larvas receberam náuplios enriquecidos com VA (A₅₀) e, na sequência, dietas suplementadas (D₃₀, D₆₀ e D₁₂₀), posicionaram-se mais próximos das anomalias esqueléticas ao final de 60 dppa. Da mesma forma, larvas do tratamento A₀ seguidos dos maiores níveis de VA na dieta (D₆₀ e D₁₂₀), apresentaram as maiores ocorrências de lordose (L) e anomalia na mandíbula superior (MS). Por outro lado, o tratamento com menor nível de VA (A₀D₀) apresentou maior incidência de anomalias nas regiões da cabeça, coluna vertebral e nas nadadeiras ímpares (para estas últimas anomalias, atrás apenas do tratamento A₅₀D₁₂₀), aos 46 dppa. Associando esses resultados ao crescimento dos animais, nos tratamentos onde foram observadas as maiores incidências de anomalias, as

médias de peso foram praticamente menores (395,3; 386,5; 352,1; 335,1 e 387,7mg, respectivamente). O tratamento A₀D₀ apresentou valor intermediário (408,3 mg) e o tratamento A₀D₃₀ o maior peso (500,9 mg). Esses resultados são coerentes aos observados por Lopes et al. (2014), que relataram correlação entre os parâmetros de crescimento e a incidência de anomalias esqueléticas em larvas de pacu. Outros autores (Mazurais et al. 2009) também observaram que níveis intermediários de VA proporcionaram melhor desempenho de larvas de *Dicentrarchus labrax*, em relação ao controle (zero) e níveis maiores, devido ao aparecimento de anomalias na região da cabeça nesses tratamentos.

De forma geral, os resultados sugerem que os níveis menores de VA agravaram a incidência de anomalias nas fases mais iniciais, enquanto que, nos níveis maiores, as anomalias continuaram sendo observadas ao longo do crescimento; porém isso só poderia ser, de fato, conclusivo se fosse prologado o período de alimentação com altos níveis de VA, pois estudos indicam que a sensibilidade a VA depende do tempo de exposição de acordo com o metabolismo de cada espécie (Fernandez et al. 2008; 2009; 2010). As anomalias foram verificadas com maior frequência nas fases iniciais de desenvolvimento, período em que as exigências de vitaminas são ainda mais elevadas, devido a alta taxa de crescimento e metabolismo, em relação a fase de juvenil (Boglione et al. 2013). Koumoundouros et al. (1997; 2010) demonstraram que anomalias na mandíbula e nadadeira caudal se desenvolvem principalmente em estágios iniciais de ontogenia (e.g. estágio larval com saco vitelínico).

Especificamente na região da cabeça, a incidência de anomalias também foi registrada ao longo do tempo nos tratamentos com menores teores de VA (A₀D₀ e A₀D₃₀) e não apenas nos de suplementações mais elevadas. Níveis menores de VA resultaram em maior incidência de anomalias na mandíbula inferior de larvas de *D. labrax* (Villeneuve et al. 2005; Mazurais et al. 2009). Em contraste, Villeneuve et al. (2005) mostraram que também o excesso de VA, resultou em aumento das anomalias esqueléticas, principalmente na maxila (MS).

Da mesma forma como ocorreu para a primeira fase experimental, não foram verificadas diferenças para expressão de RAR α e RXR α entre os tratamentos com diferentes níveis de VA. Isso pode ter ocorrido, pois estes receptores possuem

afinidade de acordo com o precursor de VA, como visto para larvas do linguado japonês *Paralichthys olivaceus* (Haga et al. 2002, 2003), o que pode não ter ocorrido com a utilização do acetato de retinol. Além disso, para cada um dos receptores RAR e RXR estão presentes subtipos diferentes (α , β , e γ) (Fernandez et al. 2011), e cada um desses expressa anomalias em uma região diferente do esqueleto (e.g. RAR γ com a escoliose) (Haga et al. 2011). O subtipo α analisado pode não ter tido correlação com as anomalias encontradas para larvas de pacu.

De forma geral, muitos estudos têm sido desenvolvidos com a utilização de diferentes níveis de VA, principalmente para peixes marinhos, com o intuito de elucidar sua influência sobre o desempenho e incidência de anomalias esqueléticas (Dedi et al. 1995; Takeuchi et al. 1998; Haga et al. 2002, 2003; Moren et al. 2004; Hernandez et al. 2006; Martinez et al. 2007; Fernandez et al. 2008, 2009; Mazurais et al. 2009; Lewis-McCrea e Lall 2010; Haga et al. 2011; Darias et al. 2012; Negm et al. 2013, 2014). Porém, os resultados são variáveis entre os estudos. Isso ocorre devido, não só a utilização de diferentes espécies, mas também as diferenças metodológicas adotadas, que vão desde o precursor de VA utilizado (acetato de retinol, palmitato de retinol, etc), o tipo de alimento oferecido (rotíferos, náuplios de artêmia, microdietas), fases de desenvolvimento, qualidade do lote, entre muitos outros fatores. Com isso, as comparações tornam-se mais difíceis principalmente para as espécies mais distantes filogeneticamente, como o pacu.

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que o tratamento que melhor atendeu aos parâmetros avaliados foi o A₀D₃₀ e que, no conjunto das anomalias investigadas, esse também mostrou-se mais distante da incidência geral, com indícios de que níveis menores de VA são mais agravantes na fase inicial de desenvolvimento, enquanto níveis maiores tendem a afetar também animais em estágios posteriores, se expostos a um prolongado período de alimentação. No entanto, a resposta específica do efeito da dose-resposta dos níveis de VA no desempenho e anormalidades esqueléticas em larvas de pacu, não ficaram ainda bem esclarecidas com a utilização do acetato de retinol. Isso porque pode-se observar interação entre as respostas causadas pelo enriquecimento dos náuplios, níveis de suplementação, com os tipos de anomalias ocorridas, em tempo e incidência. Assim, os resultados nos permite concluir que a VA exerce influência

sobre o desenvolvimento do pacu, e mais estudos devem ser feitos para determinar os efeitos da suplementação de VA, assim como a fonte de VA a ser utilizada e seus níveis, de acordo com as fases de desenvolvimento, tipo de alimentação e de anomalia a ser investigada.

5. Referência bibliográfica

ALMEIDA, F. L. A.; PESSOTTI, N. S.; PINHAL, D. Quantitative expression of myogenic regulatory factors MyoD and myogenin in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) skeletal muscle during growth. **Micron**, v. 41, p. 997–1004, 2010.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official Methods of Analysis**. 16.ed. AOAC, Washington, DC. 1995.

BOGLIONE, C.; GAGLIARDI, F.; SCARDI, M.; CATAUDELLA, S. Skeletal descriptors and quality assessment in larvae and post-larvae of wild-caught and hatchery-reared gilthead sea bream (*Spaurus aurata* L. 1758). **Aquaculture**, v. 192, p. 1-22, 2001.

BOGLIONE, C.; GISBERT, E.; GAVAIA, P.; WITTEN, P.E.; MOREN, M.; FONTAGNÉ, S.; KOUMOUNDOUROS, G. Skeletal anomalies in reared European fish larvae and juveniles. Part 2: main typologies, occurrences and causative factors. **Aquaculture**, v. 5, p. S121-S167, 2013.

CAHU, C.; ZAMBONINO-INFANTE, J.; TAKEUCHI, T. Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. **Aquaculture**, v. 227, p. 245-248, 2003.

DARIAS, M. J.; LAN CHOW WING, O.; CAHU, C.; ZAMBONINO-INFANTE, J. L.; MAZURAS, D. Double staining protocol for developing European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 26, p. 280-285, 2010.

DARIAS, M.J.; BOGLINO, A.; MANCHADO, M.; ORTIZ-DELGADO, J.B.; ESTEVEZ, A.; ANDREE, K.B.; GISBERT, E. Molecular regulation of both dietary vitamin A and fatty acid absorption and metabolism associated with larval morphogenesis of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v.161, p.130-139, 2012.

DEDI, J.; TAKEUCHI, T.; SEIKAI, T.; WATANABE, T. Hypervitaminosis and safe levels of vitamin A for larval Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed Artemia nauplii. **Aquaculture**, v. 133, p. 135-146, 1995.

ETHERIDGE, D.M.; STEELE, L.P.; LANGENFELDS, R.L.; FRANCEY, R.J.; BARNOLA, J.-M.; MORGAN, V.I. Historical CO₂ records from the Law Dome DE08, DE08-2, and DSS ice cores. In Trends: **A Compendium of Data on Global**

Change. Carbon Dioxide Information Analysis Center, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tenn., U.S.A. 1998.

FERNANDEZ, I.; GISBERT, E. Senegalese sole bone tissue originated from chondral ossification is more sensitive than dermal bone to high vitamin A content in enriched artemia. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 26, p. 344-349, 2010.

FERNANDEZ, I.; GISBERT, E. The effect of vitamin A on flatfish development and skeletogenesis: a review. **Aquaculture**, v. 315, p. 34-48, 2011.

FERNANDEZ, I.; HONTORIA, F.; ORTIZ-DELGADO, J.B.; KOTZAMANIS, Y.; ESTEVEZ, A.; ZAMBONINO-INFANTE, J.L. Larval performance and skeletal deformities in farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fed with graded levels of Vitamin A enriched rotifers (*Brachionus plicatilis*). **Aquaculture**, v. 283, p. 102-115, 2008.

FERNANDEZ, I.; ORTIZ-DELGADO, J. B.; SARASQUETE, C.; GISBERT, E. Vitamin A effects on vertebral bone tissue homeostasis in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles. **Journal of Applied Ichthyology**, v.28, p. 410-426, 2012.

FERNANDEZ, I.; PIMENTEL, M. S.; ORTIZ-DELGADO, J. B.; HONTORIA, F.; SARASQUETE, C.; ESTÉVEZ, A.; ZAMBONINO-INFANTE, J. L.; GISBERT, E. Effect of dietary vitamin A on Senegalese sole (*Solea senegalensis*) skeletogenesis and larval quality. **Aquaculture**, v. 295, p. 250-265, 2009.

HAGA, Y.; DU, S.; SATOH, S.; KOTANI, T.; FUSHIMI, H.; TAKEUCHI, T. Analysis of the mechanism of skeletal deformity in fish larvae using a vitamin A-induced bone deformity model. **Aquaculture**, v. 315, p. 26-33, 2011.

HAGA, Y.; SUZUKI, T.; KAGECHIKA, H.; TAKEUCHI, T. A retinoic acid receptor-selective agonist causes jaw deformity in the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. **Aquaculture**, v. 221, p. 381-392, 2003.

HAGA, Y.; SUZUKI, T.; TAKEUCHI, T. Retinoic acid isomers malformations in postembryonic development of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. **Zoological Science**, v. 19, p. 1105-1112, 2002.

HALVER, J.E.; HARDY, R.W. **Fish Nutrition**, 3rd. Academic Press Inc., San Diego, CA. p.182-259, 2002.

HERNANDEZ, M., TAKEUCHI, T. & WATANABE, T. Effect of dietary energy sources on the utilization of protein by *Colossoma macropomum* fingerlings. **Fisheries Science**, v.61, p.507-511, 1995.

HERNÁNDEZ-H, L.H., TESHIMA, S., KOSHIO, S., ISHIKAWA, M., GALLARDO-CIGARROA, F.J., ALAM, M.S., UYAN, O. Effects of vitamin A palmitate, beta-carotene and retinoic acid on the growth and incidence of deformities in larvae of red sea bream *Chrysophrys major*. **Cience Marine**, v.32, p.195-204, 2006.

IZQUIERDO, S.; SOCORRO, J.; ROO, J. Studies on the appearance of skeletal anomalies in red porgy: effect of culture intensiveness, feeding habits and nutritional quality of live prey. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 26, p. 320-326, 2010.

JOMORI, R. K.; DUCATTI, C.; CARNEIRO, D. J.; PORTELLA, M. C. Stable carbon ($\delta^{13}\text{C}$) and nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) isotopes as natural indicators of live and dry food in *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) larval tissue. **Aquaculture Research**, v. 39, p. 370-381, 2008.

KOUMOUNDOUROS, G.; DIVANACH, P.; SAVAKI, A.; KENTOURI, M. Effects of three preservation methods on the evolution of swimbladder radiographic appearance in sea bass and sea bream juveniles. **Aquaculture**, v. 182, p. 17-25, 2000.

KOUMOUNDOUROS, G.; GAGLIARDI, F.; DIVANACH, P.; BOGLIONE, C.; CATAUDELLA, S.; KENTOURI, M. Normal and abnormal osteological development of caudal fin in *Sparus aurata* L. fry. **Aquaculture**, v. 149, p. 215-226, 1997.

LALL, S. P.; LEWIS-MCCREA, L. M. Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish - An overview. **Aquaculture**, v. 267, p. 3-19, 2007.

LALL, S.P.; PARAZO, M.P. Vitamins in fish and shellfish. In: Ruiter, A. (Ed.). **Fish and Fishery Products**. CAB International, Oxon, UK, p. 157-186. 1995.

LEITÃO, N. J., PAI-SILVA, M. D., ALMEIDA, F. L. A., PORTELLA, M. C. The influence of initial feeding on muscle development and growth in pacu *Piaractus mesopotamicus* larvae. **Aquaculture**, v. 315, p. 78-85, 2011.

LEWIS-MCCREA, L. M.; LALL, S. P. Effects of phosphorus and vitamin C deficiency, vitamin A toxicity, and lipid peroxidation on skeletal abnormalities in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). **Journal of Applied Ichthyology**, v.26, p.334-343, 2010.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2\Delta\Delta\text{C(T)}$ Method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LOPES, T. S.; FREITAS, T. M.; JOMORI, R. K.; CARNEIRO, D. J.; PORTELLA, M.C. SKELETAL. Anomalies of pacu *piaractus mesopotamicus* larvae from a wild-caught broodstock. **Journal of World Aquaculture Society**, v. 45, p. 15-27, 2014.

MARTINEZ, G.M.; BARON,M.P.; BOLKER, J.A. Skeletal and pigmentation defects following retinoic acid exposure in larval summer flounder, *Paralichthys dentatus*. **Journal of World Aquaculture Society**, v.38, p.353-366, 2007.

MAZURAS, D.; NOMIKI, G.; DARIAS, M. J.; CHRISTODOULOPOULOU, S.; CAHU, C. L.; ZAMBONINO-INFANTE, J. L.; KOUMOUNDOUROS, G. Optimal levels of dietary vitamin a for reduced deformity incidence during development of european sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) depend on malformation type. **Aquaculture**, v. 294, p. 262-270, 2009.

MENOSSE, O. C. C.; TAKATA, R.; SANCHES-AMAYA, M. I.; FREITAS, T. M.; YÚFERA, M.; PORTELLA, M. C. Alimentação inicial de pacu com dieta microencapsulada produzida experimentalmente e sua relação com o crescimento e estruturas do sistema digestório. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, p. 1-10, 2012.

MOREN, M.; OPSTAD, I.; HAMRE, K. A comparison of retinol, retinal and retinyl ester concentrations in larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) fed *Artemia* or zooplankton. **Aquaculture Nutrition**, v.10, p.253–259, 2004.

NEGM, R.; COBCROFT, J.M.; BROWN, M.R.; NOWAK, B.F.; BATTAGLENE, S. C. The effects of dietary vitamin A in rotifers on the performance and skeletal abnormality of striped trumpeter *Latris lineata* larvae and post larvae. **Aquaculture**, v. 404-405, p. 106-115, 2013.

NEGM, R.; COBCROFT, J.M.; BROWN, M.R.; NOWAK, B.F.; BATTAGLENE, S. C. Performance and skeletal abnormality of striped trumpeter *Latris lineata* larvae and post larvae fed vitamin A enriched *Artemia*. **Aquaculture**, v. 422-423, p. 115-123, 2014.

NRC (NATIONAL RESEARCH COUNCIL). **Nutrients requerimentsof fish**. Washington: National Academy. Washington, EUA. 1993.

PALACIOS, M. E., DABROWSKI, K., ANN, M., ABIADO, G., LEE K. J. Effects of Diets Formulated with Native Peruvian Plants on Growth and Feeding Efficiency of Red Pacu (*Piaractus brachypomus*) Juveniles. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 37, p. 246–255, 2006.

POTTHOFF, T. Clearing and staining techniques. In: H.G. Moser, W.J. Richards, D.M. Cohen, M.P. Fahay, A.W. Kendall Jr. and S.L. Richardson, (Eds). **Ontogeny and Systematics of Fishes**. American Society of Ichthyologists and Herpetologists. Special publication, p. 35-37, 1984.

TAKEUCHI, T. A review of feed development for early life stages of marine finfish in Japan. **Aquaculture**, v. 200, p. 203-222, 2001.

TAKEUCHI, T.; DEDI, J.; EBISAWA, C.; WATANABE, T.; SEIKAI, T.; HOSOYA, K.; NAKAZOE, J. The effect of β -carotene and vitamin A enriched *artemia* nauplii on the malformation and color abnormality of larval japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Fisheries Science**, v. 61, p. 141-148, 1995.

TAKEUCHI, T.; DEDI, J.; HAGA, Y.; SEIDAI, T.; WATANABE, T. Effect of vitamin A compounds on bone deformity in larval japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Aquaculture**, v. 169, p. 155-165, 1998.

TESSER, M.B.; CARNEIRO, D.J.; PORTELLA, M.C. Co-feeding of pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg 1887) larvae with *Artemia* nauplii and microencapsulated diet. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 17, p. 47-49, 2005.

TESSER, M.B.; CARNEIRO, D.J.; PORTELLA, M.C. Co-feeding of pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg 1887) larvae with *Artemia* nauplii and microencapsulated diet. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 17, p. 47-49, 2005.

VASAN, N.S.; LASH, J.W. Chondrocyte metabolism as affected by vitamin A. **Calcify Tissue Research**, v.19, p. 99–107, 1975.

VASQUEZ-TORRES, W.; FILHO, M.P.; ARIAS-CASTELLANOS, J.A. Studies for composition of semipurified reference diet for nutritional requirements evaluation of juvenile pirapitinga *Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1818). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, p.283–292, 2002.

VILLENEUVE, L., GISBERT, E., LE GALL, M.M., CAHU, C.L., ZAMBONINO-INFANTE, J.L. Expression and localization of some retinoid receptors during European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae development. *Aquaculture*, v. 242, p. 537–551, 2004.

VILLENEUVE, L.; GISBERT, E.; LE DELLIOU, H.; CAHU, C.L.; ZAMBONINO-INFANTE, J.L. Dietary levels of all-trans retinol affect retinoid nuclear receptor expression and skeletal development in European sea bass larvae. **Journal Nutrition**, v. 93, p. 791–801, 2005.

CONCLUSÕES GERAIS

A partir dos resultados obtidos podemos concluir que:

- ✓ A descrição do processo de ossificação normal é importante e pode ser utilizado como ferramenta para a compreensão do aparecimento de anomalias esqueléticas em larvas de pacu e auxiliar a padronização de parâmetros de qualidade larval;
- ✓ Há anomalias esqueléticas nos diferentes estágios larvais de pacu de origem selvagem, que comprometem o desenvolvimento e comportamento de larvas prejudicando o crescimento;
- ✓ Há variações no crescimento e na incidência de anomalias esqueléticas ao longo do desenvolvimento de larvas de cativeiro, influenciado, provavelmente, pelas características genéticas destas populações;
- ✓ A suplementação de vitamina A influencia o crescimento ósseo e promove o desenvolvimento mais acelerado desse tecido, apesar de não serem observadas diferenças no desempenho e na frequência de anomalias esqueléticas em larvas de pacu.
- ✓ A vitamina A exerce influência sobre o desenvolvimento esquelético do pacu, sendo que as larvas que receberam níveis menores desta vitamina apresentam mais anomalias esqueléticas na fase inicial de desenvolvimento, enquanto níveis maiores tendem a afetar também animais em estágios posteriores. Ainda, mais estudos devem ser feitos para elucidar a complexidade dos efeitos da vitamina A: níveis de suplementação; fonte a ser utilizada; fases de desenvolvimento; tipo de alimentação; e tipos de anomalias esqueléticas.