

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP – CAUNESP

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

**DESENVOLVIMENTO OSTEOLÓGICO DE LAMBARI-ROSA *Astyanax lacustris*
(LUTKEN 1975) (CHARACIFORMES, CHARACIDAE)**

Marcelo Joho Hiromoto

Biólogo

JABOTICABAL, SÃO PAULO

2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP – CAUNESP

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

**DESENVOLVIMENTO OSTEOLÓGICO DE LAMBARI-ROSA *Astyanax lacustris*
(LUTKEN 1975) (CHARACIFORMES, CHARACIDAE)**

Discente: Marcelo Joho Hiromoto

Orientadora: Profa. Dra. Maria Célia Portella

Co-orientadora: Profa. Dra. Rosangela Kiyoko Jomori Bonichelli

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP – CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura.

JABOTICABAL, SÃO PAULO

2021

Hiromoto, Marcelo Joho
H668 Desenvolvimento osteológico de lambari-rosa *Astyanax*
d lacustris
(Lutken 1975) (Characiformes, Characidae) / Marcelo
Joho Hiromoto. – – Jaboticabal, 2021
vi, 81 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual
Paulista, Centro de Aquicultura, 2021
Orientador: Maria Célia Portella
Banca examinadora: Fernando José Zara, Caroline
Nebo
Bibliografia

1. *Astyanax lacustris*. 2. , osteologia. 3. , larvicultura. I.
Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.31



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Centro de Aqüicultura da Unesp - CAUNESP



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Desenvolvimento osteológico de lambari-rosa *Astyanax lacustris* (Characiformes, Characidae)

AUTOR: MARCELO JOHO HIROMOTO

ORIENTADORA: MARIA CÉLIA PORTELLA

COORIENTADORA: ROSANGELA KIYOKO JOMORI BONICHELLI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em AQUICULTURA, pela Comissão Examinadora:

Prof^a. Dr^a. MARIA CÉLIA PORTELLA (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV/ UNESP, Jaboticabal-SP

Prof. Dr. FERNANDO JOSÉ ZARA (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV/ UNESP, Jaboticabal-SP

Profa. Dra. CAROLINE NEBO (Participação Virtual)
Departamento de Zootecnia / Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, UNIFESSPA, Xinguara-PA

Jaboticabal, 14 de dezembro de 2022

Centro de Aqüicultura da Unesp
Coordenação do Programa de Pós-Graduação
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 Jaboticabal SP Brasil
Tel 55 16 32032110 ramal 214 fax 55 16 32032268
pgaqui@caunesp.unesp.br www.caunesp.unesp.br

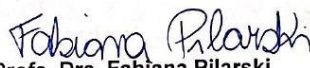
CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

DECLARAÇÃO

Declaramos que o trabalho de pesquisa intitulado "Ontogenia das brânquias de lambari rosa *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae) em diferentes salinidades", sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria Célia Portella e Certificado CEUA protocolo nº 1119/20, aprovado em reunião ordinária em 13 de fevereiro de 2020, teve o seu título alterado para "Desenvolvimento osteológico de lambari-rosa *Astyanax lacustris* (Characiformes, Characidae)".

Solicitação aprovada em reunião ordinária de 19 de agosto de 2021.

Jaboticabal, 19 de agosto de 2021.


Profa. Dra. Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	5
APOIO FINANCEIRO	6
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	8
CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS	9
Introdução geral	9
Aquicultura mundial	9
<i>Astyanax lacustris</i>	10
Larvicultura de peixes	12
Desenvolvimento esquelético em peixes	14
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
CAPÍTULO 2- DESENVOLVIMENTO ESQUELÉTICO DE LAMBARI-ROSA (<i>ASTYANAX LACUSTRIS</i>).	26
CHAPTER 2- ABSTRACT	27
INTRODUÇÃO	28
Desenvolvimento esquelético de larvas de lambari-rosa <i>Astyanax lacustris</i>	28
MATERIAL E MÉTODOS	29
Manejo alimentar	30
Condições experimentais	31
Análises esqueléticas	32
RESULTADOS	33
Desenvolvimento esquelético de lambari-rosa (<i>Astyanax lacustris</i>)	33
CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à “Universidade Estadual Paulista” por fornecer todo apoio e estrutura para minha formação.

A professora Dra. Maria Célia Portella e ao professor Dr. Dalton José Carneiro por toda orientação e aprendizagem, que com muita dedicação me auxiliaram neste trabalho.

Em especial, a Dra. Rosangela Kiyoko minha amiga e co-orientadora.

Agradeço a banca de defesa, Dr. Fernando Zara e Dra. Caroline Nebo, pela participação e contribuição para a melhoria do trabalho.

Agradeço a banca de exame de qualificação Dr. Ivã Guidini Lopes e ao Professor Dr. João Batista Kochenborger, pela análise crítica e sugestões que contribuíram muito para o trabalho.

Agradeço a toda equipe LANOA, meus amigos e companheiros de laboratório: Andressa Tellechea, Brígida Sperchi, Caio Alexandre, Denis Johansen (Lairinha), Gabriel Aguilar, Grazi Cristina, Isabela Almeida, Jesaías Ismael, Jéssica Pacheco (Bracinho fofinho), Juliano Coutinho, Laura Silva (Mexicana), Lígia Neira, Magdiel (Morena tropicana), Michelle Santos, Naiara e Rossi, Ricardo Dutra e Sara Pinho.

Aos amigos do Caunesp, Rafael Sato e Thiago Delefrate.

Aos que colaboraram com a produção deste trabalho.

Gostaria de agradecer também meus amigos por terem estado comigo nesta longa caminhada que ainda segue. Essa foi só uma etapa e agradeço pelo apoio que cada um me deu da sua maneira. Com certeza fez a diferença.

Aos funcionários da FCAV- CAUNESP, por todo auxílio na implantação e manutenção do projeto, pela confiança e amizades formadas.

Agradeço também ao corpo docente, cada um me motivou de alguma forma e a toda a família UNESP- Jaboticabal que sempre esteve presente em algum momento.

Agradeço a minha família, pelo amor, incentivo e apoio sem eles eu não chegaria em lugar algum.

APOIO FINANCEIRO

Agradeço à CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Processo nº 88882.433720/2019-01.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.



LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Classificação taxonômica do lambari-rosa <i>A. lacustris</i>	11
Figura 2. Sequência de desenvolvimento dos elementos do esqueleto em relação ao comprimento total (CT) em <i>A. lacustris</i> . Elemento em estado cartilaginoso em cor azul; elemento em ossificação na cor rosa.....	36
Figura 3. Desenvolvimento esquelético craniofacial e da nadadeira caudal do lambari-rosa (<i>A. lacustris</i>); A- Larva com 1 dpe, 2,33 mm CT; B- Larva com 3 dpe, 4,36 mm CT.....	38
Figura 4. Desenvolvimento esquelético craniofacial e da nadadeira caudal do lambari-rosa (<i>A. lacustris</i>); A- Larva com 9 dpe, 6,63 mm de CT; B- Larva com 9 dpe, 7,88mm CT.....	40
Figura 5. Desenvolvimento esquelético craniofacial, axial e apendicular do lambari-rosa (<i>A. lacustris</i>); A- Larva com 10 dpe, 8,49 mm CT.....	41
Figura 6. Desenvolvimento esquelético craniofacial, axial e apendicular de lambari-rosa (<i>A. lacustris</i>); A- Peixe com 14 dpe, 10,87 mm CT.....	43
Figura 7. Desenvolvimento esquelético craniofacial, axial e apendicular de lambari-rosa (<i>A. lacustris</i>); A- Peixe com 14 dpe, 13,46 mm CT.....	45
Figura 8. Desenvolvimento esquelético craniofacial, axial e apendicular de lambari-rosa (<i>A. lacustris</i>); A- Peixe com 18 dpe, 14,25 mm CT.....	47
Figura 9. Desenvolvimento esquelético craniofacial, axial e apendicular de lambari-rosa (<i>A. lacustris</i>); A- Peixe com 18 dpe, 15,80mm CT.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Quantidades diárias de náuplios fornecidas às larvas de lambari-rosa durante o experimento. As quantidades foram fracionadas em cinco refeições ao longo do dia (dpe, dias pós eclosão)33

Tabela 2. Valores médios, máximos e mínimos do comprimento total, comprimento padrão e altura das larvas de *A. lacustris*, desde a eclosão até o termino do período de desenvolvimento inicial, segundo a classificação de Kendall et al., (1984)35

CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS

INTRODUÇÃO GERAL

Aquicultura mundial

A população mundial vem crescendo continuamente nos últimos anos, resultando na necessidade de se produzir mais alimentos, especialmente maiores quantidades de proteínas, para suprir a demanda alimentar tanto dos seres humanos quanto dos animais. A aquicultura, sendo uma atividade multidisciplinar, abrange várias áreas de cultivos de organismos aquáticos como peixes, moluscos, crustáceos e plantas, de tal modo que se tornou uma importante fonte de produção de alimentos proteicos (FAO, 2020).

Assim, combinado com a estagnação da pesca extrativa desde os anos 80 (FAO, 2020), é consenso que a aquicultura é a única alternativa para aumentar a produção de pescados e atender a demanda crescente da população por esse tipo de proteína de alta qualidade. A aquicultura mundial vem crescendo rapidamente e contribuindo para o aumento do consumo de pescados. Em 1961 esse consumo era de 9 kg per capita e em 2018 houve aumento significativo dessa quantidade, atingindo uma média de 20,5 kg de pescados consumidos anualmente (FAO, 2020).

A Agenda 2030 proposta para os países membros das Nações Unidas estabelece 17 objetivos para o desenvolvimento sustentável (ODS). A aquicultura pode contribuir significativamente para atender a praticamente todos os objetivos, com especial relevância para os objetivos de números 2, 8, 12 e 14, que tratam da eliminação da fome, alcance da segurança alimentar e melhoria da nutrição (2); promoção do crescimento econômico sustentado, inclusivo e sustentável, emprego pleno e produtivo e trabalho decente para todos (8); garantia de padrões de consumo e produção sustentáveis (12), e conservação e uso de forma sustentável dos oceanos, mares e recursos marinhos (14) (FAO, 2017). A aquicultura desempenha um papel importante na redução da fome, no alcance da segurança alimentar, na melhoria da nutrição e na promoção do desenvolvimento sustentável. Em comparação com outros

setores, esta atividade de aquicultura atende uma produção muito maior em espaços menores (Schulter e Filho., 2017).

Astyanax lacustris

Dentro da ordem dos Characiformes, a família Characidae é amplamente distribuída, com representantes encontrados desde a região sul dos Estados Unidos até a Patagônia Argentina e a Patagônia Chilena. No entanto, a maior parte das espécies se concentra na bacia do Prata, na bacia Amazônica, nos rios guianenses e na bacia do Rio Orinoco (Fricke et al., 2020). A família Characidae é a quarta família com maior diversidade encontrada em todo o mundo, ficando atrás apenas das famílias Cyprinidae, Cichlidae e Gobiidae (Eschmeyer e Fricke, 2010).

O teleósteo *A. lacustris*, popularmente conhecido como lambari, lambari-do-rabo-amarelo ou tambiú, pertence à família Characidae, ordem Characiformes, a qual inclui mais de 100 espécies (Peres et al., 2012). Anteriormente classificado como *A. bimaculatus* (Linnaeus 1758), foi constatado que a denominação não correspondia a uma só espécie, passando a espécie encontrada no Alto Rio Paraná a ser denominada como *A. altiparanae* (Garutti e Britski, 2000). Mais recentemente, esta recebeu a nova nomenclatura de *A. lacustris* (Lütken, 1875) após revisão realizada por Lucena e Soares (2016) sobre o gênero *Astyanax*.

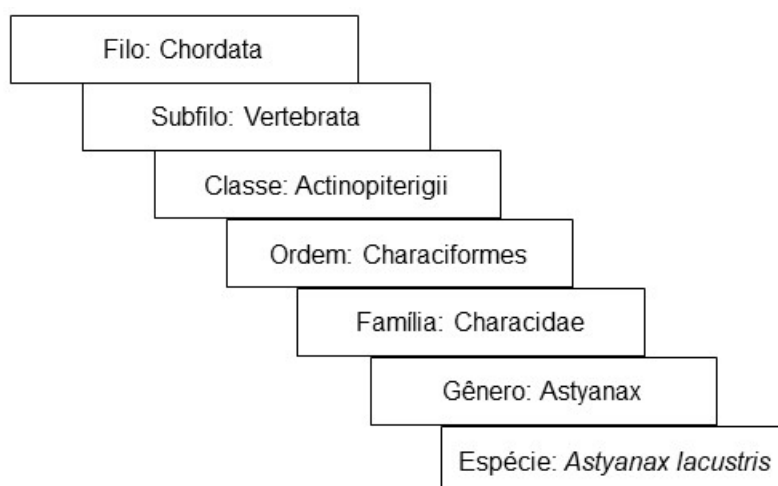


Figura 1. Classificação taxonômica do lambari-rosa *A. lacustris*.

Esta espécie é originária da bacia do alto Rio Paraná, com ampla distribuição na América do Sul, e apresenta pequeno porte, podendo chegar a 15 cm de comprimento e pesar 60g (Stevanato e Ostrensky, 2018). Externamente, tem corpo prateado com a parte ventral esbranquiçada, suas nadadeiras pélvicas, anal e caudal são levemente amareladas, e apresenta uma pequena mancha escura na nadadeira caudal (Garutti e Britiski, 2000). Alguns exemplares da espécie têm coloração rosada (lambari-rosa), constituindo uma variedade da espécie *A. lacustris* (Schwarz et al., 2018).

No Brasil, a produção de lambaris foi de 595 toneladas em 2018 e 661 toneladas em 2019, representando um aumento de 11% (IBGE 2020). Esse crescimento significativo se deve às excelentes características da espécie, como rusticidade, crescimento rápido, facilidade de reprodução e um mercado consumidor com grande aceitação (Jesus et al., 2017; Sussel, 2015). A espécie é utilizada como alimento humano na forma de petisco em bares e restaurantes e também como isca viva para a pesca esportiva, sendo produzido em escala industrial ou de subsistência (Silva et al., 2012).

O hábito alimentar do lambari é onívoro oportunista, alimentando-se de insetos, algas, pequenos crustáceos, detritos e ovos de peixes e insetos. (Rautenberg, 2016). O dimorfismo sexual da espécie é evidente, pois as fêmeas apresentam corpo mais abaulado e são maiores em relação aos machos, geralmente com forte irrigação por

vasos sanguíneos na região ventral do corpo e papila urogenital avermelhada. Já os machos são menores, com o corpo retilíneo e em seu estágio reprodutivo apresentam espículas na nadadeira anal, apresentando um toque áspero (Porto-Foresti et al., 2010).

Em piscicultura, a reprodução da espécie é realizada por indução hormonal, utilizando geralmente extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC). Nas fêmeas são aplicadas 5 mg kg⁻¹ de peso corporal, fracionadas em duas doses com intervalo de 6 horas, sendo 20% aplicados como dose preparatória e 80% na última aplicação; nos machos é aplicada dose única de 3 mg kg⁻¹, concomitante à segunda dose da fêmea (Orbolato et al., 2005). Segundo Lira et al. (2018) a desova ocorre naturalmente, em 145 horas-graus após a aplicação da segunda dose hormonal; no entanto Porto-Foresti et al. (2010), indicaram 180 a 250 horas graus a 25-28°C. Já Felizardo et al. (2012) encontraram valores de 240 a 334 horas grau a 27 ± 1°C.

Devido às características de interesse como a alta taxa de sobrevivência, gerações curtas, proles numerosas e fácil manejo em sistemas de campo e laboratorial, *A. lacustris* é uma ótima espécie para cultivo em aquicultura (Porto-Foresti, 2010).

Larvicultura de peixes

Muitas espécies de peixes passam por um período inicial de desenvolvimento larval, na qual os indivíduos possuem características diferentes dos indivíduos adultos e passam por diversas alterações morfofisiológicas e comportamentais (Leitão et al., 2011), que podem afetar sua qualidade e sobrevivência desde a eclosão até a fase de juvenil (Karahan et al., 2012).

Apesar da grande diversidade dos peixes, em geral as larvas das espécies criadas em aquicultura apresentam dois padrões de desenvolvimento inicial: o direto e o indireto. Espécies que nascem com grande quantidade de vitelo passam por longos períodos de alimentação endotrófica e conseguem desenvolver muitas de suas funções fisiológicas e morfológicas durante essa fase; esse grupo é chamado de animais *precoces*. Já as larvas que eclodem com escassa reserva vitelínica possuem uma fase curta de alimentação endotrófica. Assim, quando termina a reserva

vitelínica, os animais ainda estão com suas funções morfológicas e fisiológicas imaturas e precisam encontrar no alimento externo os nutrientes adequados para continuar seu desenvolvimento; os animais com essas características são chamadas de *altriciais* (Portella et al., 2014).

Larvas altriciais necessitam de alimentos vivos, como por exemplo zooplâncton e fitoplâncton como alimento inicial (Portella et al., 2014). Tal necessidade é devida ao seu sistema digestório rudimentar, com ausência de estômago e de atividade de várias enzimas; com isso, grande parte da digestão ocorre nas células epiteliais do intestino posterior (Portella et al., 2014). Em tal estágio de desenvolvimento, o sistema digestório na maioria dos casos é incapaz de digerir e absorver os nutrientes presentes nas dietas formuladas, ao contrário do que ocorre com os alimentos vivos. Estes apresentam diversas características favoráveis, como a natação que provoca atratividade para a presa, alto teor de água (>80%) e baixa concentração de nutrientes, sendo mais palatáveis e mais digestíveis em comparação às dietas comerciais (Conceição et al., 2010).

Os alimentos vivos mais utilizados na aquicultura são os náuplios de artêmia e os rotíferos, devido à facilidade de manuseio e possibilidade de cultivo em escala comercial (Conceição et al., 2010). As artêmias (*Artemia spp.*) apresentam um tipo de reprodução que origina cistos latentes altamente resistentes às condições ambientais adversas e podem ser mantidos viáveis por anos, sendo de fácil transporte, armazenamento e uso (Lavens e Sorgeloos, 2000). Artêmias recém eclodidas apresentam composição aproximada de 56,2% de proteína, 17,0% de lipídios, 3,6% de carboidratos e 7,6% de cinzas (García-Ortega et al., 1998)

Por outro lado, a produção de alimento-vivo é um processo caro e demanda muita mão de obra (Jomori et al., 2005; Conceição, 2010). Além disso, diversos estudos têm sido realizados buscando o desenvolvimento de dietas formuladas que possam substituir parcial ou totalmente o uso dos alimentos vivos, buscando facilitar o manejo e reduzir os custos de produção (Lazo et al., 2000; Koven et al., 2001).

Artêmias e rotíferos são organismos de água salgada, empregados inicialmente na larvicultura de peixes e camarões marinhos, mas desde a década de 90 passaram

a ser usados na larvicultura de peixes de água doce (Luz e Portella, 2002), Jomori et al., 2008; 2012; Portella et al., 2000; 2014).

As artêmias são organismos extremófilos, ou seja, altamente resistentes à amplas condições de salinidade, tolerando variações entre 3 e 300‰ (Treece, 2000). Por serem animais típicos de regiões salinas, tendem a apresentar sobrevivência reduzida em água doce. Jomori et al. (2012) verificaram que náuplios (origem INVE Aquaculture, Great Salt Lake, UT, USA) de até 24 horas pós-eclosão permaneciam ativos na coluna d'água por cerca de 2 horas após transferência para água doce, e morriam após 6 horas. Por outro lado, em água salinizada ($> 2\text{‰}$) verificaram 100% de sobrevivência durante as 24 horas de observação. Outro estudo (Beux, 2006) demonstrou que os náuplios de artêmia começaram a morrer 40 minutos após a exposição em água doce. Em água levemente salinizada ($1,7\text{‰}$), por sua vez, a mortalidade iniciou após 2 horas de exposição, mas em 5‰ apenas após 24 horas.

O lambari *A. lacustris* é uma espécie de água doce que eclode com escassa reserva vitelínica para seu desenvolvimento larval inicial, que se esgota em torno de 74 horas após a eclosão. Esse momento marca a transição da alimentação endógena para a exógena, mas pode se estender até 86 horas pós eclosão (Stevonato, 2018). Devido às suas características altriciais, as larvas de lambari têm necessidade de ingestão de alimentos vivos no início da alimentação exógena, e em sistema intensivo de produção geralmente são alimentadas com náuplios de artêmia.

Desenvolvimento esquelético em peixes

A formação das estruturas do esqueleto dos animais se dá por meio de duas formas de desenvolvimento, o processo filogenético ao longo de sua evolução e o processo ontogenético que ocorre durante a vida do animal (Prendergast, 2002).

Nos animais vertebrados é possível encontrar quatro tipos de tecidos mineralizados: tecido ósseo, tecido cartilaginoso, dentina e esmalte que são formados por células como condroblastos, condrócitos, osteoblastos, células de revestimento ósseo, osteócitos, osteoclastos, odontoblastos, ameloblasto. (Boglione et al., 2013). Durante a ontogenia, a remodelação óssea é desencadeada devido às necessidades de desenvolvimento e crescimento alométrico. Após o crescimento, ocorre a

necessidade de adaptação de crescimento corporal para proporcionar sustentação mecânica do corpo do animal (Witten e Huysseune, 2009).

Em peixes, a remodelação esquelética é adaptativa ao meio em que vivem, iniciando pelo fortalecimento das estruturas que constituem a mandíbula e a cauda, fundamentais para garantir as habilidades predatória e de natação, sendo importantes para apreensão do alimento e fuga de predadores (Portella et al., 2012; Witten e Huysseune, 2009).

Nos mamíferos, os ossos são uma fonte disponível de cálcio, assim contribuem para a homeostase mineral nos animais. Já nos peixes, no ambiente em que vivem há uma grande disponibilidade de cálcio dissolvido na água, que é facilmente absorvido pelas brânquias; assim, os ossos têm pouca importância para a disponibilidade de cálcio na homeostase (Witten e Huysseune, 2009). Os ossos dos peixes são formados por tecido mesenquimal especializado, que é vascularizado e demanda alto consumo de oxigênio (Boglione et al., 2013).

Nos teleósteos, basicamente ocorrem quatro formas de ossificação, a endocondral, pericondral, paracondral e intramembranosa. Na ossificação endocondral, primeiramente ocorre uma alteração na cartilagem hialina, com hipertrofia dos condrócitos e redução e calcificação da matriz cartilaginosa, seguida de apoptose dos condrócitos. As cavidades deixadas no processo são invadidas por capilares sanguíneos que trazem células mesenquimais, que darão origem à formação dos osteoblastos. Assim, passa a haver tecido ósseo onde antes havia cartilagem (Hall e Eckhard Witten, 2019). A formação pericondral é a mais encontrada em larvas de peixes (Witten e Huysseune, 2009), e é o modo mais comum de ossificação em teleósteos, tendo um precursor inicial (o pericôndrio) que irá se mineralizar até dar origem ao periósteo, mas agora assumindo características dos osteoblastos secretando a matriz óssea (Huysseune e Sire, 1992; Verreijdt et al., 2002). A formação paracondral se dá através da mineralização de uma cartilagem envolta por uma camada de tecido conjuntivo, onde esse tecido sofrerá modificações até a formação dos osteoblastos (Benjamin, 1989). Em peixes, a única estrutura de formação paracondral descrita é a cartilagem de Meckel, vista no salmão-do-atlântico (Benjamin, 1989). A ossificação intramembranosa se dá a partir de células mesenquimais que se diferenciam-se em osteoblastos e formam osso sem um molde

cartilagenoso primário; estruturas assim formadas são designadas ossos dérmicos ou de membrana, (Franz-Odeendaal et al., 2007). As estruturas derivadas são dentes, dentículos, ossos dérmicos cranianos, escudos, placas dérmicas pós-cranianas, escamas ganóides de polypeterídeos, escamas ganóides de lepisosteídeos, escamas elasmóides e raios das nadadeiras (Sire e Huysseune 2003).

Diversos fatores podem causar alterações no desenvolvimento celular, na cartilagem ou na sua matriz óssea durante o período da osteogênese nas larvas de peixes (Waagbo, 2006), levando a anomalias esqueléticas. As principais causas de deformidades são a baixa qualidade dos ovos, fatores genéticos, patologias ósseas, condições de criação dos animais, estresse no manejo, nutrição, hidrodinâmica, turbulência na água, condições de crescimento acelerado, regime de luz, fatores mecânicos, parasitas, toxinas, radiação, variação de salinidade, tipo de substrato, variação de temperatura, antibióticos e xenobióticos (Waagbo 2006).

Anomalias esqueléticas em peixes cultivados muitas vezes são visíveis e são consideradas como um dos problemas mais sérios na aquicultura intensiva, atingindo muitas espécies. Anomalias e deformidades esqueléticas envolvem também questões biológicas, econômicas e de bem-estar dos animais. Parte dos animais deformados consegue se desenvolver, porém com perda de desempenho e incorrendo em dificuldades para processamento desse animal na indústria. Por isso, são frequentemente descartados e destinados à produção de farinha de peixe; outra parte não consegue sobreviver, gerando prejuízos na produção (Boglione et al., 2009).

Peixes deformados também geram preocupação ética, pois os que apresentam bocas, nadadeiras ou coluna vertebral deformada têm desempenho alimentar e natatório prejudicados. Consequentemente, a redução da eficiência de alimentação afeta o desenvolvimento e crescimento do animal; portanto, peixes com deformidades severas não podem ser considerados saudáveis (Boglione et al., 2013), além da possibilidade de sentirem dor, algo de difícil percepção nos peixes.

Estudos referentes à osteologia contribuem para o entendimento da forma funcional e de como o ambiente pode modificar sua formação durante o período da ontogenia nas larvas de peixes. Estes conhecimentos são importantes ferramentas

para o conhecimento dos causadores de anomalias morfo-anatômicas em diferentes casos (Boglione et al., 2013). Diversos estudos foram realizados para descrever as características morfológicas e merísticas que diferem cada espécie em seu estágio de desenvolvimento osteológico, como, por exemplo, em *Gadus morhua* (Saele et al., 2017); *Lates calcarifer* (Kohn et al., 1996); *Sparus aurata* (Koumoundouros et al., 1997); *Solea senegalensis* (Gavaia, 2006); *Danio rerio* (Bird e Mabee, 2003); *Pagellus erythrinus* (Sfakianakis e Koumoundouros, 2004); *Centropomus undecimalis* (Wittenrich et al., 2009); *Piaractus mesopotamicus* (Lopes, 2014); *Epinephelus akaara* (Park et al., 2016); *Tridentiger obscurus* (Hwang e Lee, 2007); *Liobagrus obesus* (Seo et al., 2018); *Zebrasoma flavescens* (Burgess e Callan, 2018) e *Favonigobius gymnauchen* (Jin et al., 2021).

Para as análises osteológicas de larvas e juvenis geralmente são utilizados métodos considerados padrões, tais como coloração e radiografias. A diafanização, técnica de coloração diferencial para cartilagens e tecidos mineralizados (ossos), consiste em clarear os tecidos, possibilitando o estudo de estruturas internas. Juntamente com o uso de colorações específicas, a técnica é útil para o estudo de esqueletos delicados, uma vez que mantém todos os seus componentes em suas posições originais (Souza, 2002).

A fim de buscar uma melhor produtividade e bem-estar dos peixes cultivados, faz-se necessário estudar o desenvolvimento osteológico de suas larvas e juvenis de modo que as deformidades esqueléticas sejam rapidamente identificadas e seus prováveis fatores causativos sejam controlados. As informações geradas pelo estudo da esqueletogênese também auxiliam na identificação e filogenia das espécies e também no reconhecimento das características osteológicas dos peixes adultos, por meio de estudos sistemáticos aprofundados (Koumoundouros et al., 1997).

Por fim, é importante ressaltar que muitas espécies de peixes passam por mudanças morfológicas, fisiológicas e comportamentais extremas desde a fase larval até chegarem à fase de juvenil. Assim, o conhecimento osteológico detalhado ao longo da ontogenia possibilita orientar a utilização de melhores técnicas de manejo para o desenvolvimento dos peixes (Koumoundouros et al., 1997).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Benjamin, M., 1989. Hyaline-cell cartilage (chondroid) in the heads of teleosts. *Anatomy and Embryology* 179, 285–303.

Beux, L.F., Filho, E.Z., 2006. The Effect of Different Low Salinity Levels on *Artemia* sp. Nauplii Survival. *Boletim do Instituto de Pesca* 32, 73-77.

Bird, N.C., Mabee, P.M., 2003. Developmental Morphology of the Axial Skeleton of the Zebrafish, *Danio rerio* (Ostariophysi: Cyprinidae). *Dev. Dyn.* 228, 337–357.

Boglione, C., Gavaia, P., Koumoundouros, G., Gisbert, E., Moren, M., Fontagné, S., Witten, P.E., 2013. Skeletal anomalies in reared European fish larvae and juveniles. Part 1: Normal and anomalous skeletogenic processes. *Rev. Aquac.* 5, 99–120.

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, 48–60.

Burgess, A.I., Callan, C.K., 2018. Effects of supplemental wild zooplankton on prey preference, mouth gape, osteological development and survival in first feeding cultured larval yellow tang (*Zebrasoma flavescens*). *Aquaculture* 495, 738–748.

Conceição, L.E.C., Yúfera, M., Makridis, P., Morais, S., Dinis, M.T., 2010. Live feeds for early stages of fish rearing. *Aquac. Res.* 41, 613–640.

Eschmeyer, W. N., Fricke, R., Fong, J. D., & Polack, D. A. (2010). Marine fish diversity: history of knowledge and discovery (Pisces). *Zootaxa*, 2525(1), 19–50. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.2525.1.2>

FAO 2017. The 2030 Agenda and the Sustainable Development Goals: The Challenge for Aquaculture Development and Management. FAO Fisheries and Aquaculture Circular Fiaa/C1141 (En). Issn 2070-6065

FAO. 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>

Felizardo, V.O., Murgas, L.D.S., Andrade, E.S., López, P.A., Freitas, R.T.F., Ferreira, M.R., 2012. Effect of Timing of Hormonal Induction On Reproductive Activity in Lambari (*Astyanax bimaculatus*). Theriogenology 77, 1570-1574.

Franz-Odendaal, T.A., Ryan, K., Hall, B.K., 2017. Developmental and morphological variation in the teleost craniofacial skeleton reveals an unusual mode of ossification. Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution 308, 709-721.

Fricke, R. P.A Eschemeyer, W.N.; Fong, J. D. 2020 Species by Family/Subfamily ([Http://Researcharchive.Calacademy.Org/Research/Ichthyology/Catalog/Speciesbyfamily.Asp](http://Researcharchive.Calacademy.Org/Research/Ichthyology/Catalog/Speciesbyfamily.Asp)).

Garcia Ortega A., Verreth J.A.J, Coutteau P., Segner H., Huisman EA e Sorgeloos P., 1998. Biochemical and enzymatic characterization of decapsulated cysts and artemia nauplii at different stages of development. Aquaculture 161, 501-514.

Garutti, V., Britski, H.A., 2000. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto Rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. Comunicações do museu de ciência e tecnologia, PUCRS, série zoologia, Porto Alegre 13, 65-88.

Gavaia, P.J., Simes D.C., Ortiz-Delgado J.B., Viegas C.S.B., Pinto J.P., Kelsh, R.N., 2006. 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* 6, 637– 652.

Hall, B. K., & Witten, P. E. (2018). Plasticity and variation of skeletal cells and tissues and the evolutionary development of Actinopterygian fishes. In Z. Johanson, C. Underwood, & M. Richter (Eds.), *Evolution and development of fishes* (pp. 126– 143). Cambridge: Cambridge University Press.

Huysseune, A.E., Sire, J.Y., 1992. Bone and cartilage resorption in relation to tooth development in the anterior part of the mandible in cichlid fish: a light and TEM study. *Anatomical Record* 234, 1-14.

Hwang, P.P., Lee, T.H., 2007. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 148, 479-497.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2020 Produção da pecuária municipal. Rio de Janeiro: Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão.

Jesus, L.W.; Bogerd, J., Vieceli, F.M., Branco, G.S., Camargo, M.P., Cassel, M., Moreira, R. G., Yan, C. Y. I., & Borella, M. I., 2017. Gonadotropin subunits of the characiform *Astyanax altiparanae*: molecular characterization, spatiotemporal expression and their possible role on female reproductive dysfunction in captivity. *General and comparative endocrinology* 246, 150-163.

Jin, D.S., Park, J.M., Baek, J.I., Han, K.H., 2021. Osteological Development of the Larvae and Juveniles of *Favonigobius gymnauchen* (Pisces: Gobiidae). *Dev. Reprod.* 25, 33-41.

Jomori, R.K., Carneiro, D.J., Malheiros, E.B.; Portela, M.C., 2003. Growth and Survival of Pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) Juveniles Reared in Ponds or at Different Initial Larviculture Periods Indoors. *Aquaculture* 221, 277-287.

Jomori, R.K.; Carneiro, D.J.; Malheiros, E.B. & Portella, M.C., 2005. Economic evaluation of *Piaractus mesopotamicus* juvenile production in different rearing systems. *Aquaculture* 234, 175-183.

Jomori, R.K., Ducatti, C., Carneiro, D.J., Portella, M.C., 2008. 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. *Aqua. Res.* 39, 370–381.

Jomori, R.K., Luz, R.K., Portella, M.C., 2012. Effect of Salinity On Larval Rearing of Pacu, *Piaractus mesopotamicus*, A Freshwater Species. *Journal of The World Aquaculture Society* 43, 423-432.

Karahan, B., Chatain, B., Chavanne, H., Vergnet, A., Bardon, A., Haffray, P., Dupont-
Journal of animal and Environmental Research.
[Http://Dx.Doi.Org/10.34188/Bjaerv3n3-127](http://Dx.Doi.Org/10.34188/Bjaerv3n3-127).

Kohno, H., Ordonio-Aguilar, R., Ohno, A., Taki, Y., 1996. Osteological development of the feeding apparatus in early stage larvae of the seabass, *Lates calcarifer*. *Ichthyol. Res.* 43, 1-9.

Koumoundouros, G., Gagliardi, F., Divanach, P., Boglione, C., Cataudella, S., Kentouri, M., 1997. Normal and abnormal osteological development of caudal fin in *Sparus aurata* L. fry. *Aquaculture* 149, 215–226.

Koven W., Kolkovski S., Hadas E., Gamsiz K. & Tandler A., 2001. Advances in the development of microdiets for goldthead seabream, *Sparus aurata*: a review. *Aquaculture* 194, 107-121.

Lavens P. e Sorgeloos P., 2000. The history, present status and prospects of the availability of artemia cysts for aquaculture. *Aquaculture* 181, 397 - 403.

Lazo, J.P., Dinis, M.T., Holt, J.G., Faulk, C. & Arnold, C.R., 2000. Co-alimentação de dietas microparticuladas com algas: no sentido de eliminar a necessidade de zooplâncton na primeira alimentação em tambor vermelho (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture* 188, 339-351.

Leitão, N.J., Pai-Silva, M.D., Almeida, F.L.A., 2011. The Influence of Initial Feeding On Muscle Development and Growth in Pacu *Piaractus mesopotamicus* Larvae. *Aquaculture* 315, 78-85.

Lira, L.V.G.; Kuradomi, R. Y.; Souza, T.G.; Hainfellner, P.; Batlouni, S.R., 2018. *Astyanax altiparanae* ovarian maturation after spawning in water recycling systems*. *Boletim do instituto de pesca* 44, 1-10.

Lopes, T. S., Freitas, T.M., Jomori, R.K., Carneiro, D. J. & Portella, M.C. Skeletal Deformities of pacu *Piaractus mesopotamicus* larvae from a wild-caught

Lucena, C.A.S.; Soares, H.G., 2016. Review of species of the *Astyanax bimaculatus* “Caudal peduncle spot” subgroup sensu Garutti & Langeani (Characiformes, Characidae) from the rio la Plata and rio São Francisco drainages and coastal systems of southern Brazil and Uruguay. *Zootaxa* 4072, 101-125.

Luz, R.K., Portella, M.C., 2002. Larvicultura de trairão (*Hoplias lacerdae*) em água doce e água salinizada. *Rev. Bras. Zootec.* 31, 829–834.

Orbolato, T.S.; Girardi, L.; Silva, M.R.A.; Fiorini, M.P. Reprodução Induzida Do Lambari, *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus,1758). X Encontro Latino Americano De Iniciação Científica E Vi Encontro Latino Americano De Pós-Graduação – Universidade Do Vale Do Paraíba, 212–215, 2005.

Park, J.Y., Han, K.H., Cho, J.K., Myeong, J.I., Park, J.M., 2016. Early Osteological Development of Larvae and Juveniles in Red Spotted Grouper, *Epinephelus akaara* (Pisces: Serranidae) 20, 87-101.

Peres, La Bertollo, Pa Carlos Buckup, Dr Blanco, D.I., Kantek, O., 2012. Moreira-Filho Invasão, dispersão e hibridização de peixes associadas à transposição de rios: Evidências cariotípicas em *Astyanax* “ Grupo *Bimaculatus* ” (Characiformes: Characidae) Fish Biol Fish 22, 519-526.

Portella, M. C. E et al., 2014. Larval development of indigenous south american freshwater fish species, with particular reference to pacu (*Piaractus mesopotamicus*): A Review. Aquaculture 432, 402-417.

Portella, M.C., Verani, J.R., Cestarolli, M.A., 2000. Use of live and artificial diets enriched with several fatty acids sources to feed *Prochilodus scrofa* larvae and fingerlings. Effects on survival and growth. J. Aquac. Trop. 15, 45–58.

Porto-Foresti, F.; Hashimoto, D.T.; Senhorini, J.A.; Foresti, F., 2010. Hibridação Em Piscicultura: Monitoramento e perspectivas. In: Baldisserotto, B.; Gomes, L.C. (Org). Espécies nativas para piscicultura no Brasil. 2 Ed. Santa Maria: Universidade Federal De Santa Maria – UFSM 1, 589-601.

Prendergast P.J., 2002. Mechanics applied to skeletal ontogeny and phylogeny. Meccanica 37, 317–334.

Rautenberg, K.A., 2016. Hábitos alimentares de *Astyanax altiparanae* em uma microbacia neotropical. 11 F. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de pesca, Universidade Estadual De Paraná, Londrina.

Saele, Haugen, T., Karlsen, van der Meeren, T., Bæverfjord, G., Hamre, K., Ronnestad, I., Moren, M., Lie, K.K., 2017. Ossification of Atlantic cod (*Gadus morhua*) Developmental stages revisited. Aquaculture 468, 524-533.

Schulter, E.P., Filho, J.E.R.V., 2017. Evolução Da Piscicultura No Brasil: Diagnóstico e desenvolvimento da cadeia produtiva de tilápia. Inst. Pesq. Econômica Apl. - IPEA 42.

Schwarz, K.K., Cunha, B.L.L., Angelo, R.P. dos S., 2018. Morfologia intestinal e desempenho corporal de Jundiá cinza-rosa (*Rhamdia quelen*) e Lambari cinza-rosa (*Astyanax altiparanae*). Pubvet 12, 1-9.

Seo, W., Park, J., Lee, S., Yoon, S.M., Hwang, S., Han, K., 2018. Osteological development of the larvae and juvenile of bullhead torrent catfish, *Liobagrus obesus* 22, 9-18.

Sfakianakis, D.G., Koumoundouros, G., 2004. Osteological development of the vertebral column and of the fins in *Pagellus erythrinus* (L. 1758). Temperature effect on the developmental plasticity and morpho-anatomical abnormalities 232, 407-424.

Silva, D.A., Pessoa, E.K.R., Costa, S.A.G.L., Chellappa, N.T., Chellappa, S., 2012. Ecologia Reprodutiva de *Astyanax lacustris* (Osteichthyes: Characidae) na Lagoa do Piató, Assú, Rio Grande do Norte, Brasil. Biota Amaz. 2, 54-61.

Sire J-Y, Huysseune A (2003) Formation of dermal skeletal and dentary tissues in fish: a comparative and evolutionary approach. Biological Reviews 78: 219– 249.

Souza, A. M. 2002. Diafanização. In: Auricchio, P. & M. G. Salomão. Técnicas de coleta e preparação de vertebrados para fins científicos e didáticos. Instituto Pau Brasil de História Natural, 219 – 226

Stevanato, D.J., Ostrensky, A., 2018. Ontogenetic Development of Tetra *Astyanax lacustris* (Characiformes: Characidae). Neotropical Ichthyology 16, 1-1.

Sussel, F.R., 2015. Lambari: Pequeno no Tamanho, Grande no Potencial. Panorama da Aquicultura 25, 50-53.

Treece, G.D., 2000 Artemia Production For Marine Larval Fish Culture. Srac: Southern Regional. Aquaculture Center, Publication No 702. Verreijdt, L., Vandervennet, E., Sire J-Y., Huysseune A., 2002. Developmental differences between cranial bones in the

zebra- fish (*Danio rerio*): some preliminary light and TEM observations. *Connective Tissue Research* 43, 109-112.

Waagbo, R., 2006. Feeding and disease resistance in fish. In: Mosenthin R, Zenek J, Zebrowska T (eds) *Biology of Nutrition in Growing Animals*, 387-415.

Witten, P.E., Huysseune, A., 2009. A comparative view on mechanisms and functions of skeletal remodeling in teleost fish, with special emphasis on osteoclasts and their function. *Biol. Rev.* 84, 315-346.

Wittenrich, M.L., Rhody, N.R., Turingan, R.G., Main, K.L., 2009. Coupling osteological development of the feeding apparatus with feeding performance in common snook, *Centropomus undecimalis*, larvae: Identifying morphological constraints to feeding. *Aquaculture* 294, 221–227.

CAPÍTULO 2- DESENVOLVIMENTO ESQUELÉTICO DE LAMBARI-ROSA (*ASTYANAX LACUSTRIS*).

Resumo- O desenvolvimento osteológico de lambari-rosa *A. lacustris* desde o momento de eclosão das larvas até se tornarem juvenis foi analisado, de modo a gerar informações para futuras avaliações de deformidades esqueléticas e investigação sistemática filogenética. As larvas foram obtidas por meio da reprodução de matrizes obtidas da piscicultura Jomar – Buritizal, SP e acondicionadas em temperatura média de $28,1 \pm 0,5$ ° C, e salinidade de 2,0 ‰. Foram realizadas coletas periódicas de 20 larvas nos dias 1, 3, 5, 7, 9, 10, 14, 18 e 21 pós-eclosão dpe (dias pós eclosão) e as larvas foram analisadas por meio do processo de diafanização e dupla coloração (azul de Alcian e vermelho de alizarina). As larvas recém eclodidas (2,33 mm comprimento total, CT) não apresentam nenhum tipo de calcificação, apresentando apenas formação condroide. A primeira estrutura observada a iniciar a mineralização foi o parassenoide, em larva medindo 2,6 mm CT. Com 6,63 mm CT, aos 9 dpe, se iniciou o aparecimento dos primeiros pontos de mineralização na região cefálica, nas estruturas do dentário, otólitos, subopérculo e opérculo. Posteriormente, verificou-se ossificação dos primeiros seis centros vertebrais aos 8,49 mm CT. Quando as larvas atingiram 13,46 mm CT, ocorreu a ossificação da pré-maxila, maxila, dentário, ângulo articular, retro articular e arcos branquiais e nadadeiras anal e caudal. Com 15,8 mm CT, ocorreu ossificação total das regiões apendicular e axial, mas os animais ainda estavam em processo final de ossificação da região crânio-facial.

Palavras-chave: *Astyanax lacustris*, osteologia, larvicultura, diafanização.

CHAPTER 2- SKELETAL DEVELOPMENT OF PINK LAMBARI (*ASTYANAX LACUSTRIS*).

Abstract- We observed the osteological development of pink lambari *A. lacustris* from the moment of hatching to juvenile in order to generate data for the assessment of skeletal deformities and systematic phylogenetic investigation. The larvae were acquired by breeding broodstock obtained from the Jomar fish farm – Buritizal, SP. The larvae were stored at average temperature of 28.1 ± 0.5 ° C, and salinity of 2.0 ‰. Periodically, 20 larvae were collected on days 1, 3, 5, 7, 9, 10, 14, 18 and 21 post-hatching dpe. They were analyzed by clearing and double staining (Alcian blue and alizarin red). The newly hatched larvae (2.33 mm total length, CT) did not show calcificated structures, having only chondroid formation. The first structure to initiate mineralization was the parassensory in larva measuring 2.6 mm CT. With 6.63 mm CT the beginning of the first points of mineralization began in the cephalic region, in the first structures, from the beginning, otoliths, suboperculum and operculum.

Afterwards, there was observed ossification of the first six vertebral centers in larvae 8.49 mm CT. With 6.63 mm CT, at 9 dpe, the first mineralization points began to appear in the cephalic region, in the dentary structures, otoliths, suboperculum and operculum. Later, there was ossification of the first six vertebral centers at 8.49 mm CT. When the larvae reached 13.46 mm CT, there was ossification of the premaxilla, maxilla, dentary, articular angle, retro articular and branchial arches, and in the anal and caudal fins. At 15.8 mm CT, there was total ossification of the appendicular and axial regions, but the animals were still in the final process of ossification of the craniofacial region.

Keywords: *Astyanax lacustris*, osteology, larviculture, diaphanization.

INTRODUÇÃO

Desenvolvimento esquelético de larvas de lambari-rosa *Astyanax lacustris*

Atualmente a aquicultura é responsável pelo fornecimento de 52% dos peixes destinados para consumo humano no mundo. De acordo com os dados da FAO, em 2018 foram produzidas 82,1 milhões de toneladas de pescado em sistemas aquícolas, sendo a América do Sul a quarta região com maior produção com cerca de 2,69 milhões de toneladas, das quais o Brasil foi responsável pela produção de aproximadamente 50% (FAO, 2020).

No Brasil, a maior parte da produção de pescado é feita em água doce (Valenti et al., 2021). Dentre as espécies produzidas, uma que tem atraído a atenção recente dos produtores é o lambari *A. lacustris*, pois possui características favoráveis que despertaram interesse para produção comercial. A produção desta espécie foi de 595 toneladas em 2018 e 661 toneladas em 2019, o que representa um aumento de 11% (IBGE, 2020). Esse incremento significativo se deve às excelentes características da espécie, como rusticidade, crescimento rápido, reprodução e um mercado comercial com grande aceitação (Jesus et al., 2016), demonstrando que o lambari apresenta potencial produtivo e considerada promissor para a aquicultura sul-americana (Valladão et al., 2016).

A intensificação dos sistemas de produção de peixes vem se tornando uma realidade no Brasil, tanto pela demanda de pescados pelo mercado consumidor, quanto pela necessidade constante de juvenis. A larvicultura intensiva é uma das alternativas que possibilita alcançar maior disponibilidade de juvenis e redução do custo de produção (Jomori et al., 2003). Contudo, a incidência de anomalias esqueléticas na larvicultura intensiva também tem se intensificado, sendo um dos problemas relatados na aquicultura, atingindo várias espécies sob os aspectos biológicos, econômicos e de bem-estar dos animais. Parte dos animais deformados consegue se desenvolver mesmo com perdas de desempenho, mas outra parte morre e deve ser removida, gerando prejuízos na produção (Boglione et al., 2009).

Os animais no presente estudo foram classificados quanto ao grau de desenvolvimento larval segundo Kendall et al. (1984). Essa classificação é dividida em quatro fases de desenvolvimento, a primeira sendo a fase vitelina compreendido entre a eclosão até o início da alimentação exógena, a segunda fase de pré flexão da notocorda com o aparecimentos das estruturas que darão suporte a nadadeira caudal, a terceira é a fase de flexão que se caracteriza pelo início da flexão da notocorda até a formação dos raios das nadadeira dorsal e anal, a quarta fase é pós flexão, que se caracteriza pela completa flexão da notocorda, aparecimento do botão da nadadeira pélvica e início da segmentação dos raios das nadadeiras dorsal e anal, até a completa formação dos raios da nadadeira peitoral, absorção da nadadeira embrionária e o aparecimento das escamas. A partir de então o peixe passa a ser considerado juvenil.

Estudos referentes à osteologia de larvas de peixes contribuem para o entendimento de sua forma funcional e de como o ambiente pode modificar sua formação durante o período da ontogenia. Estes conhecimentos são importantes ferramentas para se saber os fatores causadores de anomalias morfo-anatômicas em diferentes casos (Boglione et al., 2013). Nesse sentido, a fim de buscar melhorar a produtividade de peixes na aquicultura, é necessário estudar o desenvolvimento osteológico de larvas e juvenis, de modo que as deformidades esqueléticas sejam identificadas logo no início do desenvolvimento e que possibilite o controle. Além disso, as informações sobre esqueletogênese auxiliam para a identificação das espécies e também para o reconhecimento das características osteológicas dos peixes adultos, por meio de estudos sistemáticos e aprofundados (Koumoundouros et al., 1997 e Park et al., 2015).

O objetivo deste trabalho foi descrever o desenvolvimento esquelético de larvas de lambari-rosa *A. lacustris* do momento da eclosão até o estágio de juvenil.

MATERIAL E MÉTODOS

Matrizes de lambari-rosa *A. lacustris* foram adquiridas da piscicultura Jomar em Buritizal, SP, e encaminhadas ao laboratório de reprodução de peixes do Centro de Aquicultura da Unesp, Campus de Jaboticabal, SP. Ao chegarem, os animais foram

inicialmente aclimatados durante 30 minutos para estabilização dos peixes frente às condições físicas e químicas do novo ambiente.

As larvas de lambari-rosa foram obtidas por meio de reprodução de 150 animais (50 fêmeas e 100 machos). Foram feitas induções hormonais por aplicação de extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC). As fêmeas receberam duas doses com intervalo de 6 horas, sendo 1 mg kg^{-1} como dose preparatória (primeira dose) e 4 mg kg^{-1} na segunda aplicação; os machos receberam apenas uma dose de 3 mg kg^{-1} de peso corporal concomitante à segunda dose das fêmeas. As desovas ocorreram naturalmente, e logo após os ovos foram alocados em uma incubadora onde permaneceram até que grande parte dos ovos tivessem eclodido. As larvas então foram separadas, contadas manualmente e distribuídas nas unidades experimentais.

As unidades experimentais consistiram de 10 aquários de vidro de 30 litros cada, em sistema de recirculação de água. O sistema de recirculação era composto pelos 10 aquários interligados e um sistema de filtragem, formado por um tanque de polietileno de 130 litros, filtragem mecânica através de manta acrílica, filtragem biológica por meio de mídias biológicas (Bio Rings), filtragem ultravioleta e aeração contínua. A água dos aquários foi levemente salinizada com 2‰ de NaCl. No tanque de 130 L foi instalado um aquecedor e termostato para manutenção da temperatura da água ao redor de $28,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$. As larvas foram estocadas na densidade de 20 larvas L^{-1} , totalizando 600 larvas por aquário.

A idade das larvas é apresentada em dias pós-eclosão (dpe) e a nomenclatura das fases de desenvolvimento segue o proposto por Kendall et al. (1984). O período larval é considerado entre a eclosão e a perda completa dos caracteres larvais. Nesse período, ocorrem as principais mudanças morfofisiológicas e diferenciação de novas estruturas, como a formação e pigmentação das nadadeiras. Um dos principais eventos para caracterizar as fases do período larval é o desenvolvimento da notocorda posterior da nadadeira caudal e a dorsiflexão da notocorda. Assim o período larval pode ser facilmente subdividido em fase de larva vitelínica, pré-flexão, flexão e pós-flexão.

Manejo alimentar

As larvas foram alimentadas cinco vezes ao dia com náuplios de artêmia (HIGH5 Inve) recém eclodidos em solução salina 35‰, a 30°C. Após a eclosão das artêmias, uma amostra de náuplios foi avaliada segundo Jomori (1999) para estimativa do número de náuplios e cálculo dos volumes necessários para a alimentação das larvas em cada refeição (Tabela 1). As quantidades estabelecidas foram baseadas em protocolos desenvolvidos para larvas de pacu (Jomori, 1999; Jomori, 2005) adaptados para larvas de lambari pela Dra. R.K. Jomori, no Laboratório de Aquicultura da Faculdade de Ituverava, Dr. Francisco Maeda - FAFRAM/ FE.

Após 30 minutos da última alimentação diária os aquários foram sifonados removendo 20 % da água para a remoção de sujeiras e sobras da alimentação, em seguida a água dos aquários foram adicionadas novamente com salinidade de 2‰.

Tabela 1. Quantidades diárias de náuplios fornecidas às larvas de lambari-rosa durante o experimento. As quantidades foram fracionadas em cinco refeições ao longo do dia (dpe, dias pós eclosão).

DPE	Náuplios Larva ⁻¹
1	50
2	75
3	100
6 - 7	150
8 -10	300
11 - 12	600
13	900
14	1000
15	1200
16	1500
17	1800
18	2100
19	2400
20	2700
21	3000

Condições experimentais

O monitoramento da qualidade da água foi feito diariamente às 9 horas da manhã durante todo o experimento. Os seguintes parâmetros foram aferidos com o auxílio de uma sonda multiparâmetro Horiba (U-50 Multiparameter Water Quality Checker): Temperatura ($^{\circ}\text{C}$), pH, oxigênio dissolvido (mg L^{-1}), condutividade (ms cm^{-1}) e salinidade (‰). A amônia (ppt) e o nitrito (ppt) foram aferidos por meio de kits Labcon (Alcon). Os valores médios aferidos foram: $28,57 \pm 1,12$ $^{\circ}\text{C}$; $7,24 \pm 0,27$ de pH, $3,99 \pm 0,52$ ms cm^{-1} de condutividade elétrica, $5,92 \pm 1,07$ mg L^{-1} de oxigênio dissolvido; $76,46 \pm 12,31$ % de saturação e $2,15 \pm 0,20$ ppt de salinidade.

Análises esqueléticas

Foram amostrados 20 animais em diferentes fases de desenvolvimento nos dias 1, 3, 5, 7, 9, 10, 14, 18 e 21 pós eclosão (dpe). Os animais foram eutanasiados com solução alcoólica de cloridrato de benzocaína a $0,25 \text{ g.L}^{-1}$, e fixados em solução de paraformaldeído 4% tamponado em solução tampão de fosfato de sódio 0,2 M, em pH 7,2, por 24 horas.

Posteriormente, os animais foram transferidos para álcool 70°, onde permaneceram até o início da desidratação com álcool 95° por um período de 24 horas. Em seguida, iniciou-se a coloração da cartilagem com solução composta por 30 % de ácido acético glacial, 70% de álcool absoluto, e $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ Azul de Alcian, por um período de 4h.

Após a primeira coloração, foi feita neutralização em solução saturada de borato de sódio durante 12h. Em seguida, foi realizada a digestão do material, que foi imerso em solução de 65% de água deionizada + 35% de solução saturada de borato de sódio + tripsina $0,3 \text{ g L}^{-1}$. Quando os animais estavam 60% mais claros, iniciou-se a etapa de coloração óssea, por meio de solução de hidróxido de potássio 1% com $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de vermelho de alizarina, onde permaneceram por 12 horas.

Após a segunda coloração, seguiu-se a etapa de preservação, quando o material passou por sucessivas concentrações de hidróxido de potássio com glicerina: Glicerina I (30% glicerina + 70% solução de hidróxido de potássio 1%); Glicerina II (60% glicerina + 40 % de solução de hidróxido de potássio 1%); Glicerina III (glicerina 100%). O referido processo foi modificado de Potthoff (1984).

Para avaliação biométrica das larvas, foram considerados o comprimento total (CT, da ponta do focinho ao final da nadadeira embrionária ou da nadadeira caudal), comprimento notocordal (CN, da ponta do focinho ao final da notocorda), comprimento padrão (CP, da ponta do focinho à base do uróstilo) e altura (Alt). Para isso, foi utilizado um estereoscópio (Olympus SZX7) acoplado ao software analisador de imagens CellSens Standard. Estas amostras foram utilizadas para a descrição da osteogênese de lambari-rosa, com ênfase nas estruturas dos esqueletos craniofacial, axial e apendicular.

RESULTADOS

Os valores médios, máximos e mínimos, das variáveis biométricas das larvas de lambari-rosa em cada fase de desenvolvimento larval estão mostradas na Tabela 2.

A fase mais longa até a flexão da notocorda foi a fase de pré-flexão, que se estendeu por 7 dias.

Tabela 2. Valores médios, máximos e mínimos do comprimento total, comprimento notocordal ou padrão e altura das larvas de *A. lacustris*, desde a eclosão até o término do período de desenvolvimento inicial, segundo a classificação de Kendall et al., (1984).

Estágio	Dpe		Comprimento total (mm)	Comprimento notocordal* ou padrão** (mm)	Altura (mm)
Vitelino *	1	Média	3,02 ± 0,71	2,77 ± 0,64	0,46 ± 0,10
		Máximo	3,70	3,40	0,61
		Mínimo	2,07	1,89	0,34
Pré-Flexão*	3 - 10	Média	4,63 ± 2,01	4,32 ± 1,89	0,66 ± 0,33
		Máximo	10,81	10,16	1,75
		Mínimo	1,95	1,81	0,22
Flexão**	9 - 14	Média	7,69 ± 1,11	6,92 ± 0,79	1,16 ± 0,37
		Máximo	9,66	8,10	1,70
		Mínimo	6,26	5,90	0,63
Pós-Flexão**	14 - 21	Média	13,59 ± 3,06	10,62 ± 2,43	3,46 ± 0,91
		Máximo	20,25	15,89	5,42
		Mínimo	7,69	5,98	2,14

A sequência de mineralização dos elementos do esqueleto das larvas em relação ao comprimento total está apresentada na Fig. 2. A primeira estrutura a apresentar ossificação é o parassenoide, seguido do pré opérculo, dentário, opérculo e otólito, os últimos são o supraoccipital e a nadadeira peitoral.

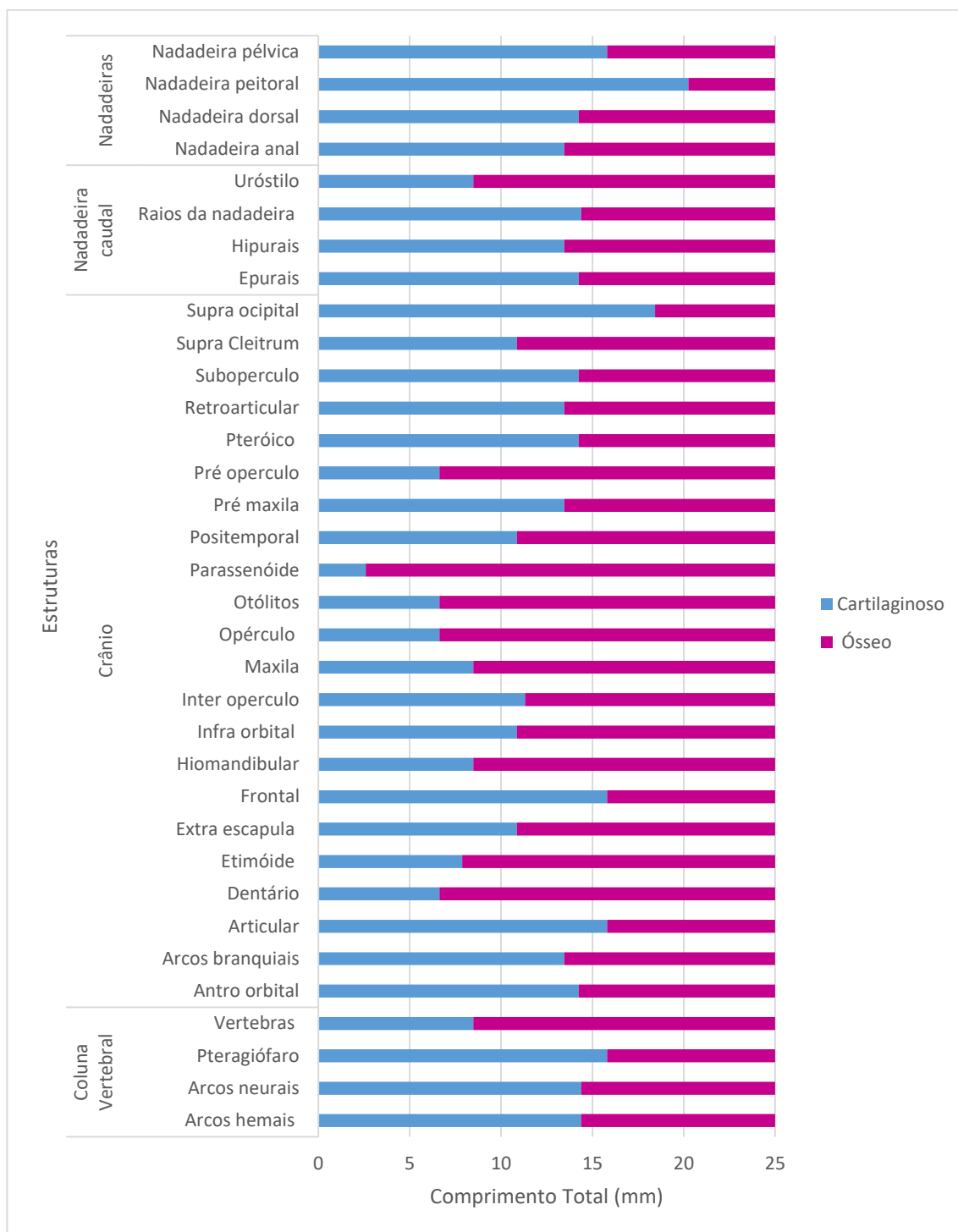


Figura 2. Sequência de desenvolvimento dos os elementos do esqueleto em relação ao comprimento total (CT) durante o desenvolvimento inicial de *A. lacustris*. Elemento em estado cartilaginoso em cor azul; elemento em ossificação na cor rosa.

Desenvolvimento esquelético de lambari-rosa *Astyanax lacustris*

Logo após a eclosão, a larva de *A. lacustris* com 1 dpe medindo 2,33 mm CT, 2,17 mm CN e 0,37 mm Alt, apresenta na *fase larval vitelina*, demonstrando postura distendida, ausência de nadadeiras derivadas e pouca pigmentação, mas já apresenta moldes cartilaginosos formados, que proporcionam alguma rigidez e sustentação para o animal, saco vitelino, notocorda, uróstilo e nadadeira embrionária ao redor da maior parte do tronco (Figs. 3 A e A₂). O esqueleto craniofacial da larva vitelina é ainda cartilaginoso, mas já se observa a abertura da boca (Fig. 3 A₁) e ausência de flexão da parte posterior da notocorda (Fig. 3 A₂).

Larva com 3 dpe, medindo 4,36 mm de CT, 4,12mm CN e 0,61 mm Alt, entra na *fase de pré-flexão* apresentando ainda estruturas cartilaginosas. Na região craniofacial destacam-se as estruturas dentárias e pré-maxila, enquanto na região axial nota-se a notocorda e uróstilo. Constituindo o esqueleto apendicular, destacam-se a nadadeira peitoral e hipurais, embora ainda persistam partes da nadadeira embrionária (Fig. 3 B). Ainda na fase de pré-flexão, é possível observar no esqueleto craniofacial das larvas de lambari-rosa a transformação da boca, passando de posição ventral para terminal, destacando-se a maxila, cartilagem Meckel, cartilagens basibrânquiais e placa etmóide, (Fig. 3 B₁). O esqueleto axial é formado por notocorda com estruturas cartilaginosas, apresentando a parte terminal ainda distendida e início da mineralização do primeiro osso, o parassênóide (Fig. 3). A menor larva observada com aparecimento de mineralização apresentava 2,6 mm CT, sendo o parassênóide o primeiro osso a sofrer ossificação. A nadadeira embrionária apresenta-se reduzida. Observa-se também o início da formação das cartilagens hipurais (Hip) na nadadeira caudal (Fig. 3B e B₂).

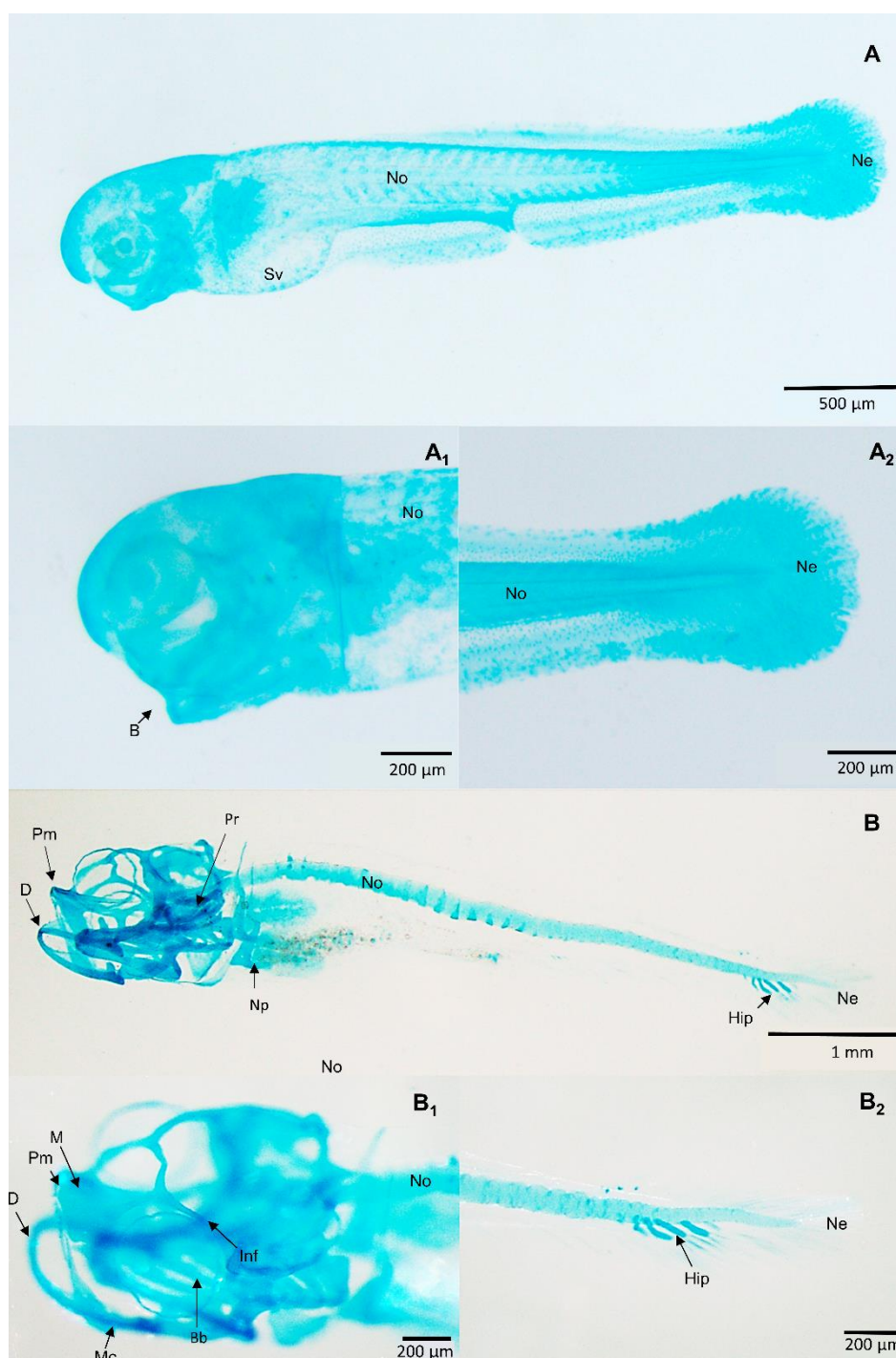


Figura 3. Desenvolvimento esquelético craniofacial e da nadadeira caudal do lambari-rosa *A. lacustris*; **A-** Larva com 1 dpe, 2,33 mm CT; **B-** Larva com 3 dpe, 4,36 mm CT; B = boca; Bb = basibranquial; Cv= coluna vertebral; D = dentário; Hip = hipurais; Inf = infraorbital; M = maxila; Mc = cartilagem de Meckel; Ne = nadadeira embrionária; No = notocorda; Np = nadadeira peitoral; Pm = pré-maxila; Pr = Parassenoide; Sv= saco vitelino; Ur = uróstilo. Notar as estruturas do molde cartilaginoso corados em azul pelo azul de Alcian e estruturas ósseas mineralizadas coradas em púrpura pelo Vermelho de Alizarina.

Larva com 9 dpe, medindo 6,63 mm CT, 6,23 mm CN e 1,12mm Alt, ainda se apresenta na *fase de pré-flexão*, embora outras estruturas estejam mais diferenciadas e desenvolvidas, como dentário, pré-maxila, basibranquial, opercular e subopérculo no esqueleto cranial (Figs.4 A e A₁). No esqueleto axial, verifica-se início da formação das vértebras, ainda cartilaginosas, região terminal da notocorda (uróstilo) ainda distendida, hipurais mais desenvolvidos e nadadeira caudal e peitorais já diferenciadas e cartilaginosas (Figs.4 A e A₂). Nessa fase pode-se observar o aparecimento dos primeiros pontos de mineralização na região craniofacial, no dentário, otólitos, subopérculo e opérculo (Fig. 4 A₁). Outras estruturas estão diferenciadas, mas ainda cartilaginosas, tais como a pré-maxila, cartilagem de Meckel, maxila, trabecular, basibranquial e infraorbital (Fig. 4 A₁).

Outra larva de lambari-rosa com 9 dpe, medindo 7,88 mm CT, 6,83 mm CN e 1,21 mm Alt, ainda está em *fase de pré-flexão*, mas demonstra avanço de desenvolvimento das estruturas esqueléticas, principalmente do esqueleto apendicular, com formações cartilaginosas da nadadeira dorsal, anal e caudal (Fig. 4 B), que apresenta os hipurais mais desenvolvidos (Fig. 4 B₂). Observa-se também nessa larva o início da mineralização do esqueleto axial, na parte proximal da coluna vertebral (Fig. 4 B₁). Além das estruturas anteriormente descritas no crânio, nessa fase observa-se também a placa etmoide (Fig. 4 B₁).

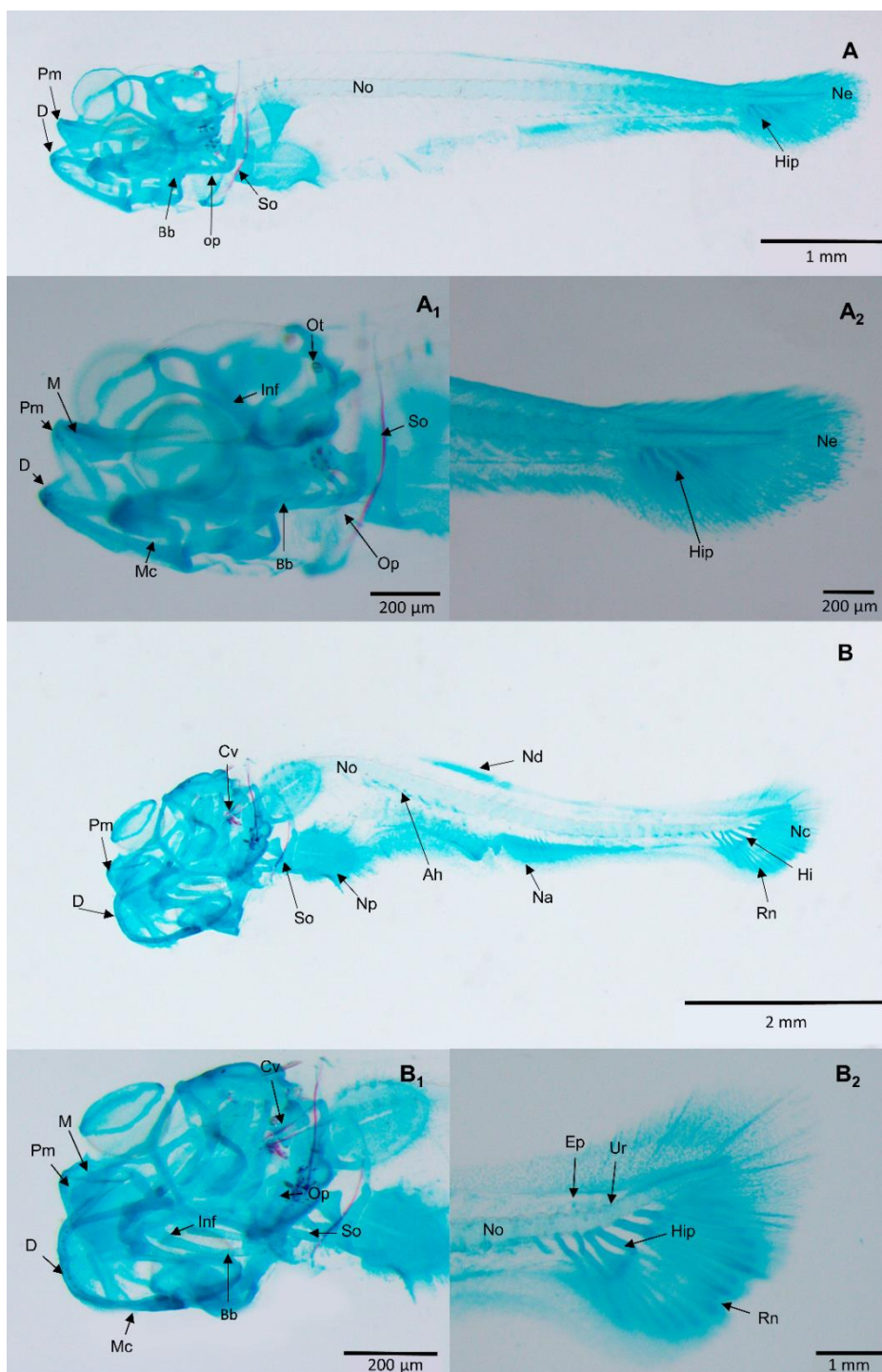


Figura 4. Desenvolvimento esquelético craniofacial e da nadadeira caudal do lambari-rosa *A. lacustris*; **A-** Larva com 9 dpe, 6,63 mm de CT; **B-** Larva com 9 dpe, 7,88 mm CT; Ah = arcos hemais; Bb = basibrânquial; Cv = coluna vertebral; D = dentário; Ep = epurais; Hio= hiomandibular; Hip = hipurais; Inf = infraorbital; M = maxila; Mc = cartilagem de Mackel; Nd = nadadeira dorsal; Ne = nadadeira embrionária; No = notocorda; Np = nadadeira peitoral; Op = opérculo; Ot = otólitos; Pm = pré-maxila; Rn = raios da nadadeira; So = subopérculo; Ur = uróstilo; Notar as estruturas do molde cartilaginoso

corados em azul pelo azul de Alcian e estruturas ósseas mineralizadas coradas em púrpura pelo vermelho de alizarina.

Larva de lambari aos 10 dpe, com 8,49 mm CT, 7,30 mm CP e 1,55 mm Alt, apresenta na *fase de flexão* da notocorda (Fig. 5 A). Na região craniofacial, as estruturas da maxila, dentário e hiomandibular apresentam mineralização mais avançada, notada pela intensificação da coloração por vermelho de alizarina (Fig. 5 A₁). No esqueleto axial, verifica-se intenso processo de calcificação da região proximal da coluna, com as primeiras seis vértebras cervicais intensamente coradas, e primeira evidência da diferenciação dos espinhos hemais e neurais (Fig. 5 A₁). A nadadeira caudal apresenta hipurais e epurais totalmente formados, porém cartilagosos, assim como raios diferenciados e uróstilo totalmente flexionado (Fig. 5 A₂).

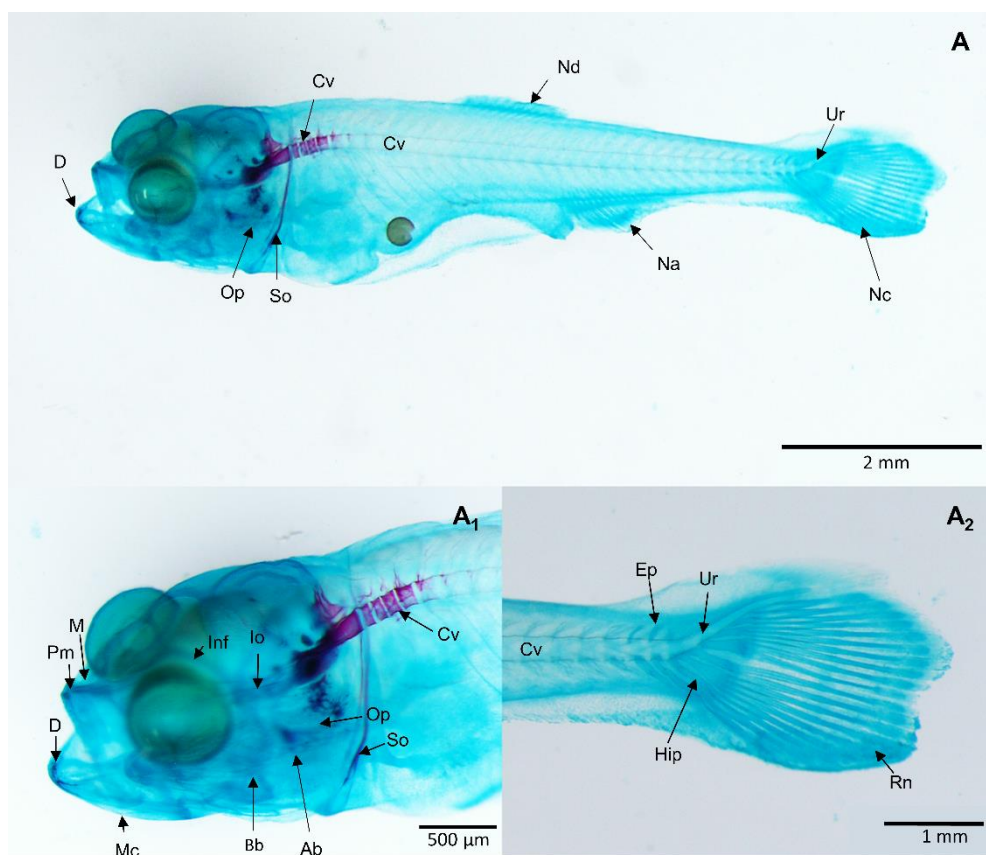


Figura 5. Desenvolvimento esquelético craniofacial, axial e apendicular do lambari-rosa *A. lacustris*; **A**- Larva com 10 dpe, 8,49 mm CT; Ab = arco branquial; Bb = basibrânquial; Cv = coluna vertebral; D = dentário; Ep = epurais; Hip = hipurais; Inf = infraorbital; Io = intra-opérculo; M = maxila; Mc = cartilagem

de Meckel; Na = nadadeira anal; Nc = nadadeira caudal; Nd = nadadeira dorsal; O = opérculo; Op = opérculo; Pm = pré-maxila; Rn = raios da nadadeira; So = subopérculo). Notar as estruturas do molde cartilaginoso corados em azul pelo azul de Alcian e estruturas ósseas mineralizadas coradas em púrpura pelo vermelho de alizarina.

Larva de lambari-rosa aos 14 dpe, com 10,87 mm de CT, 9,46 mm CP e 2,8 mm Alt apresenta na *fase final de flexão* da notocorda (Fig. 6 A₂), demonstrando mineralização na região craniofacial nas estruturas hiomandibular. O esqueleto axial apresenta mineralização em todas as vértebras da coluna, com o uróstilo iniciando sua calcificação sendo levemente corado pelo vermelho de alizarina (Fig.6 A e A₁). No esqueleto apendicular, os raios da nadadeira anal estão parcialmente formados, mas ainda cartilaginosos; já na nadadeira dorsal ocorre a formação completa das estruturas cartilaginosas, prontas para iniciar o processo de mineralização pericondral (Figs.6 A₂, A₃ e A₄).

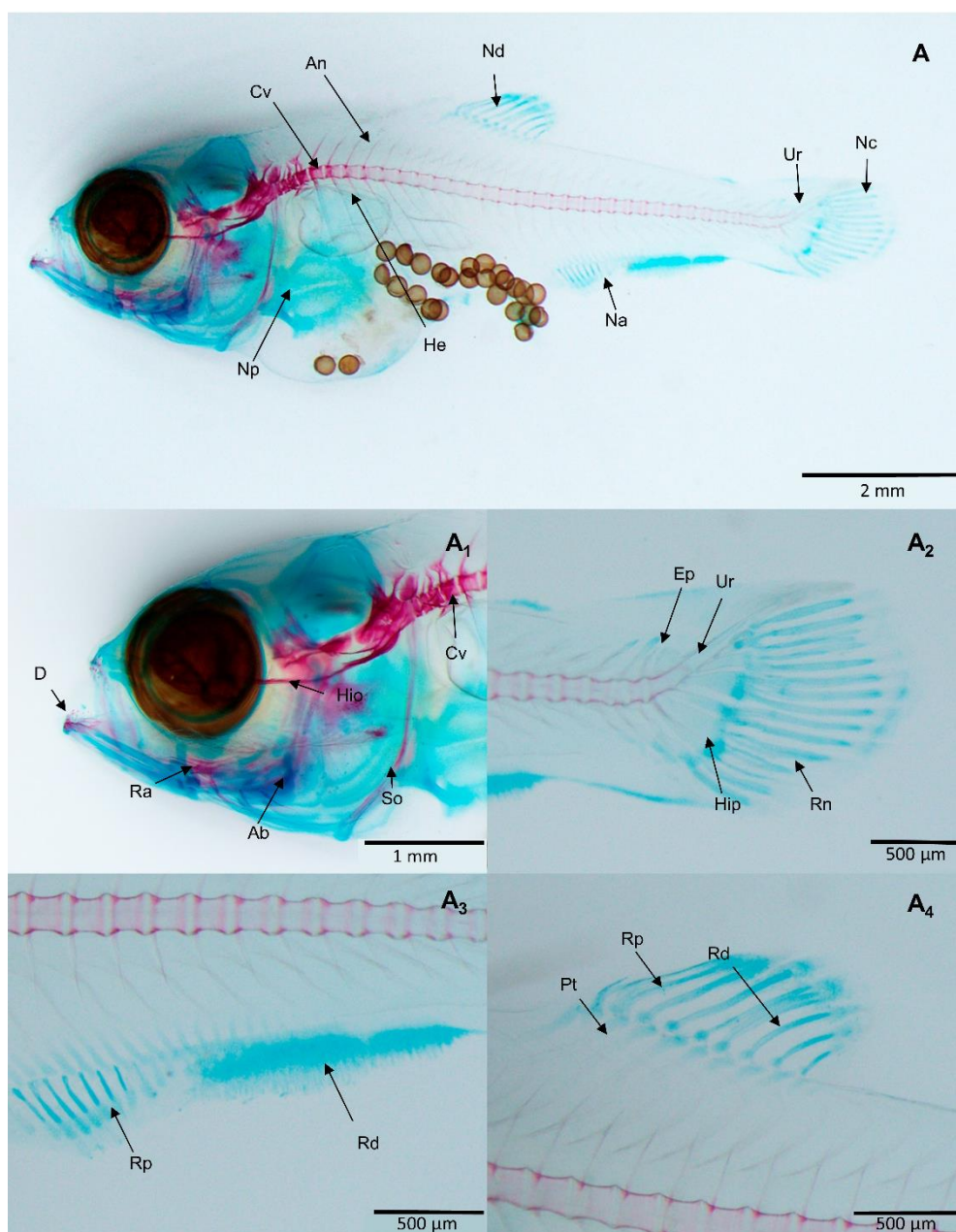


Figura 6. Desenvolvimento esquelético craniofacial, axial e apendicular de lambari-rosa *A. lacustris*; **A-** Peixe com 14 dpe medindo 10,87 mm CT; Ab = arcos branquiais; An = arcos neurais; Cv = coluna vertebral; D = dentário; He = arcos hemais; Hio = hiomandibular; Na = nadadeira anal; Na = nadadeira anal; Nc = nadadeira caudal; Np = nadadeira peitoral; Pt = pterigióforo; Ra = retroartícula; Rd = raios distais; Rp = raios proximais; So = suboperculo; Ur = uróstilo. Notar as estruturas do molde cartilaginoso corados em azul pelo azul de Alcian e estruturas ósseas mineralizadas coradas em púrpura pelo vermelho de alizarina.

Lambari-rosa aos 14 dpe, medindo 13,46 mm CT, 10,40 mm CP e 3,20 mm Alt, está na *fase de pós-flexão* (Fig. 7 A₂). No esqueleto craniofacial, a região do aparato bucal apresenta forte coloração de vermelho de alizarina mostrando intensa mineralização dos tecidos das estruturas da pré-maxila, maxila, dentário, ângulo articular, retro articular e arcos branquiais (Fig. 7 A, A₁). A coluna vertebral está totalmente mineralizada, sendo a calcificação mais intensa nas partes proximais e distais, ou seja, iniciando nas extremidades em direção ao centro. No esqueleto apendicular, a nadadeira caudal inicia a mineralização dos hipurais e se estende para a parte proximal dos raios. Na Figura 7, A₂ observa-se os hipurais, epurais intensamente corados e a progressão da mineralização dos raios da nadadeira caudal do sentido proximal para distal, notado pela coloração púrpura na parte óssea e azul na cartilagem. Na nadadeira anal se inicia a mineralização dos primeiros raios proximais (Fig. 7 A₃) e na nadadeira dorsal os pterigiófaros cartilaginosos estão totalmente formados (Fig. 7 A₂, A₃ e A₄).

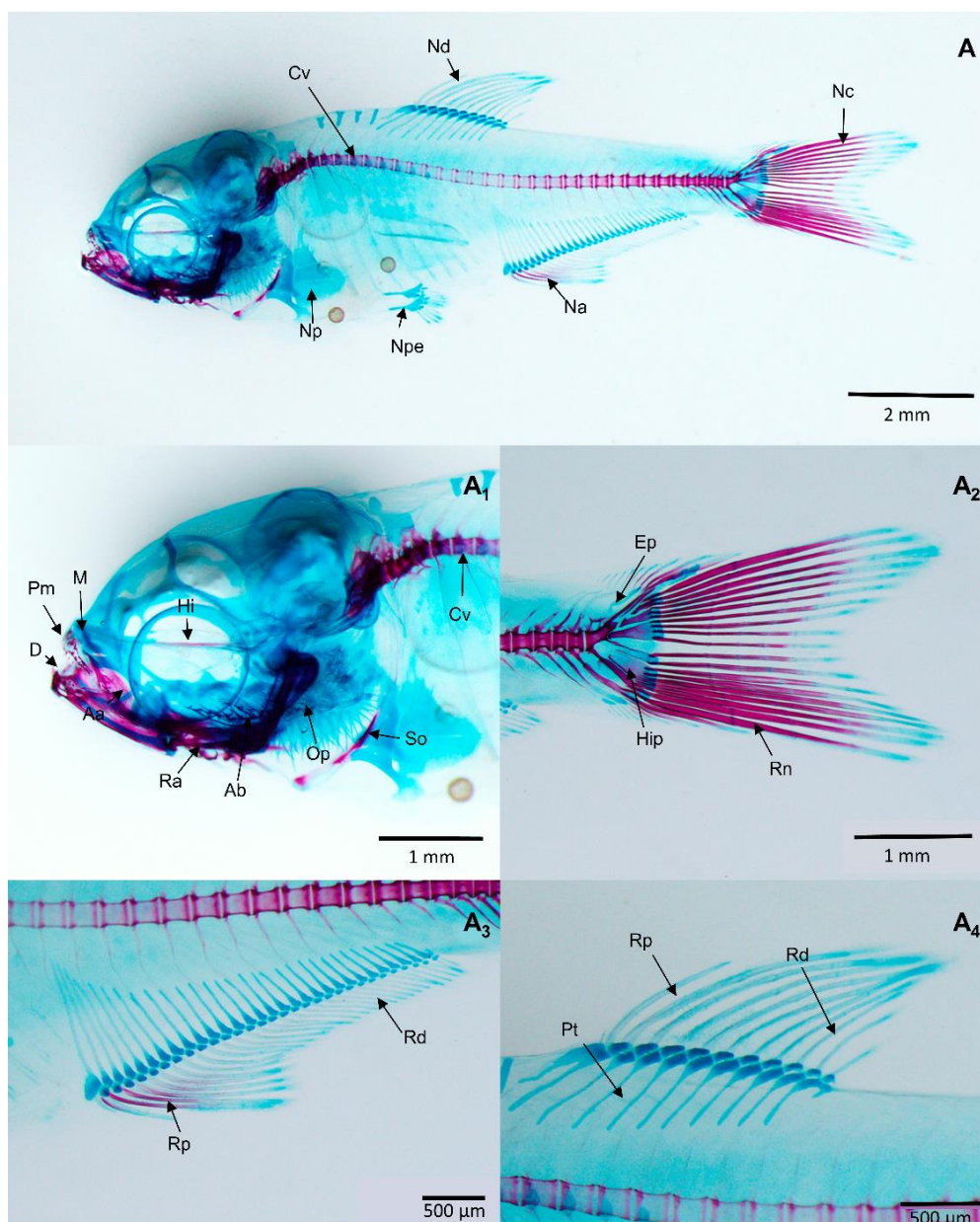


Figura 7. Desenvolvimento esquelético craniofacial, axial e apendicular de lambari-rosa *A. lacustris*; **A-** Peixe com 14 dpe, 13,46 mm CT; Ab =arcos branquiais; Cv = coluna vertebral; Cv = coluna vertebral; D = dentário; Ep = epurais; Hi= hiomandibular; Hip = hipurais; M = maxila; Na = nadadeira anal; Nc = nadadeira caudal; Nd = nadadeira dorsal; Np = nadadeira peitoral; Npe = nadadeira pélvica; Op =opérculo Pm = pré-maxila; Pt = pterigiófaros; Ra = retroarticular; Rd = raios distais; Rn = raios da nadadeira; Rp = raios proximais; So = subopérculo. Notar as estruturas do molde cartilaginoso corados em azul pelo azul de Alcian e estruturas ósseas mineralizadas coradas em púrpura pelo vermelho de alizarina.

Lambari-rosa aos 18 dpe, medindo 14,25 mm CT, 11,00 mm CP e 3,65 mm Alt, apresenta em *fase de pós flexão* (Fig. 8 A₂). O esqueleto craniofacial demonstra estruturas em processo avançado de mineralização na região bucal se estendendo na parte inferior e frontal. Na Figura. 8 A₁, destacam-se os ossos antroocipital, pré-maxila, maxila, dentário, retro articular, pré-opérculo, subopérculo, opérculo, antro-orbital, arcos branquiais e pterótico. O esqueleto axial apresenta intensa coloração por vermelho de alizarina ao longo de toda a coluna vertebral, sendo visível o processo de mineralização dos espinhos neurais e hemais no sentido proximal-distal (Fig. 8 A). A nadadeira pélvica apresenta mudança de coloração de azul com pontos vermelhos indicando o início de mineralização. A nadadeira caudal apresenta os raios totalmente mineralizados (Fig. 8 A₂). A nadadeira anal apresenta coloração de vermelho de alizarina na maioria dos raios proximais e mediais, já na parte distal ocorre a coloração do azul indicando que a região ainda é cartilaginosa (Fig. 8 A₃). A nadadeira dorsal apresenta raios mineralizados, mas seus pterigiófaros ainda apresentam a coloração azul de Alcian indicando que estão cartilaginosos (Fig. 8 A₄).

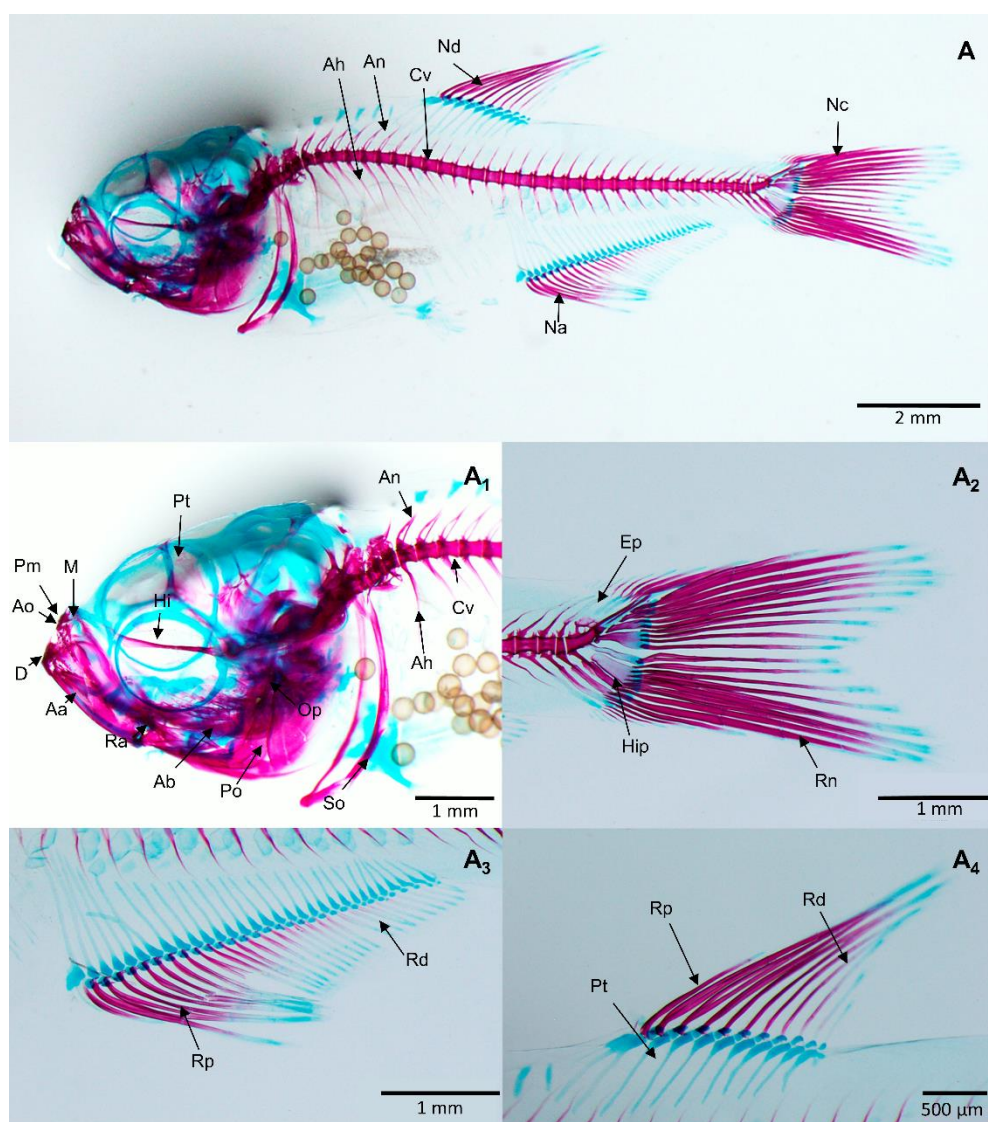


Figura 8. Desenvolvimento esquelético craniofacial, axial e apendicular de lambari-rosa *A. lacustris*; **A-** Peixe com 18 dpe, 14,25 mm CT; Aa = ângulo articular; Ab = arcos branquiais; Ah = arcos hemais; Ao = antroocipital; Cv = coluna vertebral; D = dentário; Ep = epurais; Hip = hipurais; M = maxila; Na = nadadeira anal; Na = nadadeira anal; Nc = nadadeira caudal; Nd = nadadeira dorsal; Op = opérculo; Pm = pré-maxila; Po = pré-opérculo; Pt = pteragiófaro; Ra = retroarticular; Rd = raios distais; Rn = raios da nadadeira; Rp = raios proximais; So = suboperculo. Notar as estruturas do molde cartilaginoso corados em azul pelo azul de Alcian e estruturas ósseas mineralizadas coradas em púrpura pelo vermelho de alizarina.

Lambari-rosa aos 18 dpe, medindo 15,80 mm CT, 12,18 mm CP e 4,30 mm Alt em *fase de pós-flexão* (Fig. 9 A₂) já apresenta características de juvenis, ou seja, é possível visualizar as características morfológicas e merísticas de um animal adulto, inclusive presença de escamas (Fig. 9 A). A maioria dos ossos que constituem o esqueleto craniofacial está mineralizada, como a maxila, premaxila, antro-orbital, dentário, hiomandibular, anguloarticular, retroarticular, pré-opérculo, subopérculo, opérculo, arcos branquiais, parietal, pterótico e frontal (Fig. 9 A₁). O esqueleto axial apresenta coluna vertebral mineralizada com espinhos neurais e hemais se estendendo em direção dorsal e ventral, respectivamente (Fig. 9 A). O esqueleto apendicular apresenta a nadadeira caudal com todas as estruturas ossificadas (Fig. 9 A₂). A nadadeira anal apresenta todos os raios e pterigiríofaros anais mineralizados (Fig. 9 A₃). Na nadadeira dorsal é possível visualizar todos os raios mineralizados e a mineralização dos pterigiríofaros (Fig. 9 A₄).

A ossificação esquelética de lambari-rosa é completa quando atingem cerca de 20,25 mm CT com 21 dias pós eclosão.

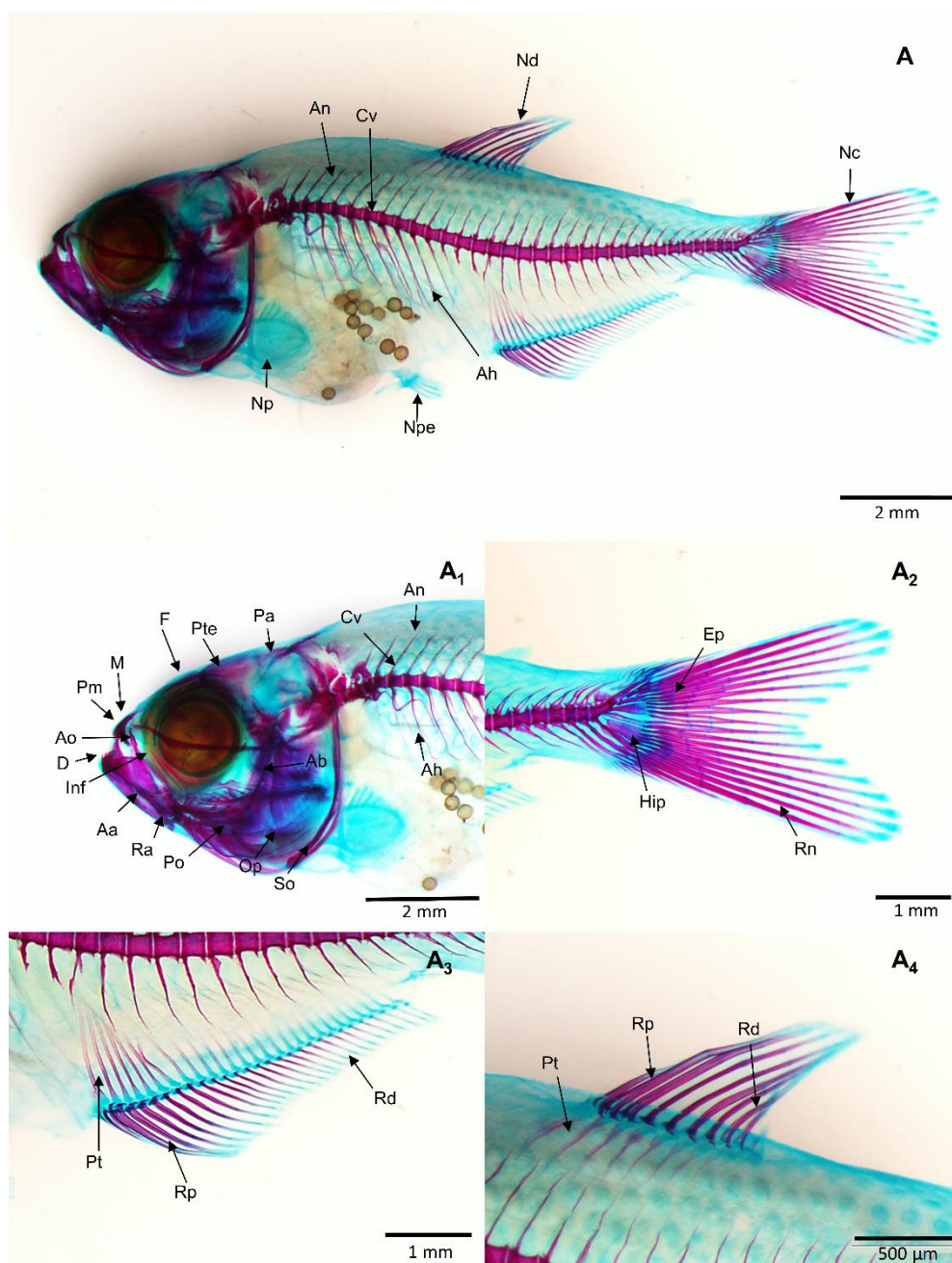


Figura 9. Desenvolvimento esquelético craniofacial, axial e apendicular de lambari-rosa *A. lacustris*; **A-** Peixe com 18 Dpe medindo 15,80mm CT; Aa = ângulo articular; Ab = arco branquial; Ah = arcos hemais; An = arcos neurais; Ao = antro orbital; Cv = coluna vertebral; D = dentário; Ep = epurais; F = frontal; Hio = hiomandibular; Hip = hipurais; Inf = infraorbital; M = maxila; Na = nadaeira anal; Nc = nadadeira caudal; Np = nadadeira peitoral; Npe = nadadeira pélvica; Op = opérculo; Pa = parietal; Pm = pré-maxila; Po = pré-opérculo; Pte = pteróico; Ra = retroarticular; Rd = raios distais; Rn = raios da nadadeira; Rp = raios proximais; So = subopérculo. Notar as estruturas do molde cartilaginoso corados em azul pelo azul de Alcian e estruturas ósseas mineralizadas coradas em púrpura pelo vermelho de alizarina.

DISCUSSÃO

Os animais foram classificados no presente estudo de acordo com os estágios de desenvolvimento proposto por Kendall et al. (1984), em que o período larval é dividido em quatro fases de desenvolvimento: vitelino; pré-flexão; flexão e pós-flexão. Esta classificação considera o período larval desde a eclosão até a formação final das escamas e nadadeiras, sendo seguido pela fase de juvenil, que se estende até que atinja a maturidade sexual.

Considerando a temperatura média da água de $28,57 \pm 0,43^{\circ}\text{C}$, as diferentes fases de desenvolvimento de *A. lacustris* foram registradas quando as larvas atingiram os seguintes valores de comprimento total e intervalos de tempo: *fase vitelina* no 1 dpe, medindo $3,02 \pm 0,71$ mm; *fase de pré-flexão* entre 3 a 10 dpe, medindo $4,63 \pm 2,01$ mm; *fase de flexão* de 9 a 14 dpe, medindo $7,69 \pm 1,11$ mm e *fase de pós-flexão* de 14 a 21 dpe, medindo $13,18 \pm 2,62$ mm. Stevonato et al. (2018) estudaram *A. lacustris* segundo a fase de desenvolvimento durante a ontogenia em temperatura de 25°C , e observaram a fase vitelínica entre 0-26 horas pós eclosão (hpe), pré-flexão 27-230 hpe, flexão 231-314 hpe e pós-flexão aos 315 a 542 hpe, períodos de desenvolvimentos próximos aos encontrados no presente estudo.

O desenvolvimento inicial dos peixes é caracterizado por marcantes alterações morfológicas e fisiológicas em diversos sistemas orgânicos (Zambonino Infante e Cahu, 2001). Dentre elas, destaca-se a remodelação condroide e óssea que é desencadeada durante a esqueletogênese. Assim, durante o desenvolvimento inicial as larvas passam por transformações profundas até se tornarem juvenis (Koumoundouros et al., 1997).

Diversos fatores abióticos podem alterar a velocidade de desenvolvimento das espécies de peixes (Waagbo, 2006), impossibilitando uma análise temporal comparativa. Por esse motivo, o desenvolvimento osteológico do presente estudo foi feito em relação ao comprimento total dos indivíduos, com o aparecimento inicial, caracterizando o ponto do desenvolvimento das estruturas ósseas.

Entre os Ostariophysi, o conhecimento sobre a sequência geral de ossificação em peixes neotropicais de água doce é bem escasso. Os poucos estudos abrangentes disponíveis são com os ciprinídeos *Danio rerio* (Cubbage e Mabee, 1996; Bird e

Mabee, 2003) e *Cyprinus carpio* (Kuzir et al., 2020) characidae *Salminus brasiliensis* (Mattox et al., 2014). Por outro lado, existem mais estudos com peixes marinhos de produção como *Sparus aurata* (Koumoundouros et al., 1997); *Epinephelus akaara* (Park et al., 2016), *Liobagrus obesus* (Seo et al., 2018) e *Trident goby* (Hawang et al., 2018), devido à alta incidência de deformidades esqueléticas em peixes de água salgada, na fase de larvicultura (Cahu et al., 2003)

O grau de mineralização da matriz óssea é variável e depende do tipo de osso acelular ou celular, estilo de vida de natação ativa ou pouco ativa e da natureza do ambiente aquático em que os peixes habitam, água do mar ou água doce (Meunier e Huysseune, 1992; Sfakianakis et al., 2011; Dean e Shahar, 2012).

As larvas de *A. lacustris* recém eclodidas até atingirem 2,6 mm de CT, não apresentam qualquer tipo de ossificação neste período. Esse achado é amplamente relatado na literatura com outras espécies de peixes altriciais, cujas larvas não apresentaram nas estruturas mineralizadas ao nascer, como em *Danio rerio* (Cubbage et al., 1996); *Salminus brasiliensis* (Mattox et al., 2014); *Sparus aurata* (Koumoundouros et al., 1997); *Epinephelus akaara* (Park et al., 2016), *Liobagrus obesus* (Seo et al., 2018), *Trident goby* (Hawang et al., 2018). Entretanto, em espécies precoces, como em alguns salmonídeos, a ossificação das estruturas do crânio e das nadadeiras iniciam a mineralização antes da eclosão (Park et al., 2016).

A primeira estrutura esquelética a apresentar mineralização no *A. lacustris* foi o parassenóide, osso da base do crânio, em larvas medindo 2,60 mm CT. A mineralização precoce dessa estrutura também foi observada em outras espécies como *Danio rerio* aos 3,4 mm CT (Cubbage et al., 1996), *Salminus brasiliensis* (Mattox et al., 2014) *Epinephelus akaara* (Park et al., 2016), *Liobagrus obesus* (Seo et al., 2018), *Trident goby* (Hawang et al., 2018), sugerindo que o parassenóide é uma estrutura importante que dará sustentação da região cranial à parte axial.

A partir do momento em que as larvas atingiram comprimento total de 6,63 mm, ou seja, entre as fases de pré-flexão e flexão, começaram a apresentar ossificação nas estruturas da boca, no dentário e na região do opérculo e pré opérculo. Esse padrão de desenvolvimento osteológico foi visto de forma semelhante em *Piaractus mesopotamicus* (Lopes et al., 2014); *Trident goby* (Hawang et al., 2018), *Luciogobius guttatus* (Kim et al., 1992). Em *Danio rerio* o dentário, retro articular, inter opérculo se

mineralizam aos 5,1 mm CT (Cubbage et al., 1996) e em *Salminus brasiliensis* o dentário e a pré maxila se mineralizam aos 5,1 mm CT (Mattox et al., 2014).

Posteriormente, quando as larvas de *A. lacustris* medem por volta de 14,25 mm notam-se a maioria dos ossos que constituem a mandíbula visivelmente mineralizados, como o premaxila e dentário, assim como algumas estruturas não mandibulares na região craniofacial, destacando os ossos antrooccipital, retro-articular, pré-opérculo, suborperculo, opérculo, antro occipital, arcos branquiais e pterótico.

Em geral, observa-se que conforme as habilidades de alimentação e natatória se desenvolvem e se aperfeiçoam, as principais estruturas ligadas a essas funções vão mineralizando e ossificando, fornecendo maior rigidez, facilitando a apreensão do alimento e a rapidez do nado. Segundo Ozawa (1976) o esqueleto visceral e os ossos da mandíbula estão relacionados à ingestão de alimentos e à respiração e têm uma maior tendência a se ossificar inicialmente. Dessa forma é esperado que um desenvolvimento mínimo do aparato bucal seja necessário para a captura eficiente de alimento pelas larvas recém-eclodidas (Faustino e Power, 2001). Durante o desenvolvimento, o número de dentes mandibulares e faríngeos usados para ingestão de alimentos aumenta com a mudança dos hábitos alimentares (Kohno et al., 1983). Outros Characiformes como *Brycon* e *Moenkhausia* também usam seus dentes orais para ataque e captura, e seus ossos da mandíbula ossificam no início da ontogenia (Vandewalle et al., 2005; Walter, 2013)

O início da ossificação da coluna vertebral de *A. lacustris* foi observado aos 8,49 mm CT em dois pontos, por um lado se iniciando com 6 ou 7 centros vertebrais na parte cervical e se estendendo para parte medial da coluna e, por outro, da parte caudal também em direção à medial, sendo sua ossificação finalizada aos 10,87 mm CT. Os ossos dos arcos hemais e neurais iniciaram a mineralização no final da mineralização das vértebras. O intervalo em que ocorreu a mineralização da coluna vertebral de larvas de lambari correspondeu à fase de flexão da notocorda. Em larvas de pacu *Piaractus mesopotamicus*, a ossificação inicial da coluna vertebral foi vista aos 5,74 mm de CP, e sua mineralização estava completa na fase de pós-flexão com 7.75 ± 0.28 mm de CP (Lopes et al., 2014). Em *Danio rerio* a coluna vertebral inicia sua mineralização aos 3,0 mm CT (Cubbage et al., 1996). Em larvas de *Salminus brasiliensis* foi observado o início da mineralização da coluna vertebral aos 9,9 mm,

os arcos neurais 11,10 mm e os arcos hemais aos 12,00 mm CT (Mattox et al., 2014). Em garoupa vermelha a ossificação das vértebras se inicia com 7 centros vertebrais, quando as larvas medem 2,49 mm CT. Em *Tridentiger obscurus* a mineralização da coluna ocorreu no décimo dpe, as larvas em estágio de flexão medindo entre 3,83-4,43 mm com média 3,96 mm (Hwang et al., 2018). A progressão de ossificação se iniciando na porção cervical em direção à abdominal e da caudal para abdominal foi vista em outras espécies como *Cyprinus carpio* (Kuzir et al., 2020), *Ilisha elongata* (Han et al., 2000), baiacu (Han et al., 2005) e pacu (Portella et al. 2014). Portanto pode se pensar que a direção da ossificação da coluna vertebral não varia significativamente entre as espécies de peixes osteichthyes. Já o tempo de mineralização da coluna vertebral está diretamente ligada ao sistema de cultivo devido a fatores abióticos, podendo ser reduzido em sistemas de recirculação como visto no salmão *Salmo salar* que exposto a diferentes correntes de água alterou a sequência de ossificação (Robinson et al., 2021).

As nadadeiras de *A. lacustris* demonstraram um padrão de ossificação se iniciando pela nadadeira caudal aos 10,84 mm CT, posteriormente na nadadeira anal aos 13,46 mm, dorsal 14,25 mm , pélvica 15,80 mm e peitoral 20,25 mm. O padrão de ossificação das nadadeiras de *A. lacustris* é bem similar ao das outras espécies de ostariophysis estudadas, diferindo apenas a ordem de mineralização da nadadeira anal e dorsal, como visto no *Piaractus mesopotamicus* (Lopes et al., 2014), *Leporinus friderici* (Sanchez et al., 2008), *Bryconamericus stramineus* (Galuch et al., 2003), *Hoplias malabaricus* (Bialetzki et al., 2008) e *Salminus brasiliensis* (Mattox et al., 2014).

As estruturas diretamente ligadas à locomoção e alimentação são as primeiras a se desenvolverem. Esse padrão de desenvolvimento visto em larvas de teleósteos retrata um mecanismo de sobrevivência usado para fugir de predadores e aproveitar os alimentos disponíveis para garantir sua sobrevivência (Osse e van den Boogaart 2004). As estruturas envolvidas nessas funções principais exibem crescimento alométrico durante o desenvolvimento larval, uma abordagem alternativa para lidar com dificuldades no início da vida, como mudanças corporais, pois o crescimento diferencial das regiões craniofacial e axial aumentam a probabilidade de sobrevivência e o desempenho dos peixes (Osse e van den Boogaart 2004).

A mineralização das estruturas das nadadeiras está diretamente ligada às condições ambientais, como visto por Fiaz et al., (2012) em peixes zebra *Danio rerio*. Os autores verificaram que quando as larvas foram expostas a um aumento de fluxo de natação ocorreu priorização da ossificação das nadadeiras. A redução do tempo para ossificação das nadadeiras também foi vista em salmão, *Salmo salar*, quando expostos a sistemas de recirculação de água (Robinson et al., 2021). Assim podemos considerar que o tempo para mineralização de algumas estruturas está diretamente ligado ao meio abiótico. Neste estudo foi observado o desenvolvimento osteológico de larvas de lambari-rosa *A. lacustris* a fim de gerar informações para futuras avaliações de deformidades esqueléticas e para embasar pesquisas de sistemática filogenética. O conhecimento da esqueletogênese e da sequência de desenvolvimento de algumas estruturas pode contribuir para melhorar a produção de larvas de peixes, gerando base para identificar as deformidades esqueléticas nos estágios iniciais de desenvolvimento, e tomada de decisão para minimização e controle dos possíveis fatores causativos. Finalmente, esses resultados também podem contribuir para a identificação das espécies e também nas características osteológicas dos peixes adultos.

CONCLUSÃO

Conclui-se que as larvas de *A. lacustris* ao eclodir não apresentam estruturas esqueléticas mineralizadas e os moldes cartilagosos se formam no início de seu desenvolvimento. As primeiras estruturas a se mineralizar são o parassenoíde e os ossos da boca e da cauda, estruturas ligadas à sustentação da natação e alimentação. As últimas estruturas que se ossificam são as nadadeiras peitorais e o supraoccipital. As larvas com 15,8 mm CT (próximo aos 18 dpe) já apresentam ossificação total das regiões apendicular e axial, mas ainda estão em processo final de ossificação da região crânio facial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bialetzki, A., Nakatani, K., Sanches, P.V., Baumgartner, G., Makrakis, M.C., Taguti, T.L., 2008. Early development of *Hoplias aff. malabaricus* (Bloch, 1794) (Osteichthyes, Erythrinidae) in the upper Paraná river floodplain, Brazil. Acta Sci. - Biol. Sci. 30, 141–149. <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v30i2.3608>

Bird, N.C., Mabee, P.M., 2003. Developmental Morphology of the Axial Skeleton of the Zebrafish, *Danio rerio* (Ostariophysi: Cyprinidae). Dev. Dyn. 228, 337–357.

Boglione, C., Gavaia, P., Koumoundouros, G., Gisbert, E., Moren, M., Fontagné, S., Witten, P.E., 2013. Skeletal anomalies in reared European fish larvae and juveniles. Part 1: Normal and anomalous skeletogenic processes. Rev. Aquac. 5, 99-120.

Boglione, C., Marino, G., Giganti, M., Longobardi, A., Marzi, Paolo De Cataudella, S., 2009. Skeletal anomalies in dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe 1834) juveniles reared with different methodologies and larval densities. Aquaculture 291, 48-60.

Cahu, C.; Infante, J.Z.; Takeuchi, T. 2003 Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. Aquaculture, Amsterdam, 227(1): 254-258.

Cubbage CC, Mabee PM. Development of the cranium and paired fins in the zebrafish *Danio rerio* (Ostariophysi, Cyprinidae). J Morphol. 1996 Aug;229(2):121-160. doi: 10.1002/(SICI)1097-4687(199608)229:2<121::AID-JMOR1>3.0.CO;2-4.

Dean MN, Shahar R. 2012. The structure mechanics relationship and the response to load of the acellular bone of neoteleost fish: a review. Journal of Applied Ichthyology 28: 320– 329 Environmental Biology of Fishes 90: 421– 427.

FAO. 2020. Situação Mundial da Pesca e Aquicultura 2020. Sustentabilidade em ação. Roma.

Faustino, M.; Power, D. M. (2001). Osteologic development of the viscerocranial skeleton in sea bream: alternative ossification strategies in teleost fish. *Journal of Fish Biology*, 58: 537-572.

Fiaz AW, Léon-Kloosterziel KM, Gort G, Schulte-Merker S, van Leeuwen JL, Kranenbarg S .2012. Swim-training changes the spatio-temporal dynamics of skeletogenesis in zebrafish larvae (*Danio rerio*). *PLoS ONE* 7: e34072.

Galuch, A.V., Suiberto, M.R., Nakatani, K., Bialezki, A., Baumgartner, G., 2003. Initial development and temporal distribution of larvae and juveniles of *Bryconamericus stramineus* Eigenmann, 1908 (Osteichthyes, Characidae) in the floodplain of Upper Paraná River. *Acta Sci. - Biol. Sci.* 25, 335–343.

Han KH, Cho JK, Lee SH, Hwang SY, Yoon SM, Seo WI, Kim CC. Osteological development of *Takifugu pardalis* larvae and juveniles (Teleostei: Tetraodontidae). *Korean J Ichthyol.* 2005; 17: 29-35

Han KH, Kim DY, Noh BY, Oh SH, Kim YM, Jin DS, Kim YU. Morphological and skeletal development of larvae and juveniles of the slender *Ilisha elongata* (Bennett) (Teleostei: Clupeidae). *Korean J Ichthyol.* 2000; 12: 230-235

Hwang, S., Park, J., Lee, S., Han, K., 2018. Osteological Development of the Larvae and Juvenile of *Trident Goby* , *Tridentiger obscurus* 22, 205–212.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2020. Produção da Pecuária Municipal 2020. Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3940>.

Jesus, L. W. O. Gonadotropinas e seus receptores em *Astyanax altiparanae* (teleostei, characiformes): caracterização molecular e expressão espaço-temporal durante o ciclo reprodutivo em cativeiro. 2016, 149 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e

Tecidual), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, 2016

Jomori, R.K., Carneiro, D.J., Malheiro S, E.B., 2003. Growth and survival of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) juveniles reared in ponds or at different initial larviculture periods indoors. *Aquaculture* 221, 277–287.

Jomori, R.K.; Carneiro, D.J.; Malheiros, E.B. & Portella, M.C., 2005. Economic evaluation of *Piaractus mesopotamicus* juvenile production in different rearing systems. *Aquaculture* 234, 175-183.

Kendall, A. W., Jr., E. H. Ahlstrom, and H. G. Moser. 1984. Early life history stages of fishes and their characters. Pages 11–22 in H. G. Moser, W. J. Richards, D. M. Cohen, M. P. Fahay, A. W. Kendall Jr., and S. L. Richardson, editors. *Ontogeny and systematics of fishes: based on International Symposium dedicated to the memory of Elbert Halvor Ahlstrom*. Special publication/American Society of Ichthyologists and Herpetologists, New York, New York, USA.

Kim YU, Han KH, Kang CB, Ryu JW. 1992; Childhood history and spawning behavior of the gobiid fish, *Luciogobius guttatus* Gill. *Korean J Ichthyol*. 4: 1-1

Kohno H, Taki Y, Ogasawara Y, Shirojo Y, Taketomi M, Inoue M. Development of swimming and feeding function in *Pagrus major* larvae. *Japan J Ichthyol*. 1983; 30: 47-60.

Koumoundouros G, Gagliardi F, Divanach P, Boglione C, Cataudella S, Kentouri M. Normal and abnormal osteological development of the tail fin in *Sparus aurata* L. fry. *aquaculture*. 1997a; 149: 215-226.

Koumoundouros, G., Gagliardi, F., Divanach, P., Boglione, C., Cataudella, S., Kentouri, M., 1997. Normal and abnormal osteological development of the tail fin in *Sparus aurata* L. fry. *Aquaculture* 149, 215-226.

Kužir, S., Drašner, K., Matanović, K., Bastiančić, L., Vlahek, I., Savoca, S., Gjurčević, E., 2020. Trade-off between fast growth and the ossification process in common carp (*Cyprinus carpio*). Vet. Arh. 90, 485–492. <https://doi.org/10.24099/vet.arhiv.1166>

Lopes, T., 2014. Osteogênese, vitamina A e anomalias esqueléticas em larva de Pacu, *Piaractus mesopotamicus*. Aleph.

Mattox, George MT, Ralf Britz e Mônica Toledo-Piza: Skeletal development and ossification sequence of the characiform *Salminus brasiliensis* (Ostariophysi: Characidae) Ichthyol. Explor. Freshwaters, vol. 25, No. 2

Meunier F-J, Huysseune A. 1992. The concept of bone tissue in osteichthyes. Netherland Journal of Zoology 42: 445– 458.

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.

Ozawa T. Childhood history of the gonostiomatid fish, *Polichthys maui*, in the southern oceanic region of Japan. Jap J Ichthyol. 1976; 23: 43-54.

Park, J.Y., Han, K.H., Cho, J.K., Myeong, J.I. and Park, J.M., 2016. Early osteological development of larvae and juveniles in red spotted grouper, *Epinephelus akaara* (Pisces: Serranidae). J. Korean Soc. Develop. Biol., 20: 87-101.o

Park, J.Y., Hong, C.G., Cho, J.K., Son, M.H., Han, K.H., Park J.M., 2015. Desenvolvimento osteológico inicial de larvas e juvenis em garoupa de sete bandas, *Epinephelus septemfasciatus* (Pisces: Serranidae). Korean J Ichthyol 27, 189-198.

Portella, M.C., Jomori, R.K., Leitão, N.J., Menossi, O.C.C., Freitas, T.M., Kojima, J.T., Lopes, T.S., Clavijo-Ayala, J.A., Carneiro, D.J., 2014. Larval development of indigenous South American freshwater fish species, with particular reference to pacu (*Piaractus mesopotamicus*): A review. *Aquaculture* 432, 402–417. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.04.032>

Potthoff, T. 1984. Clearing and staining techniques. Pages 35–37 in H. G. Moser, W. J. Richards, D. M. Cohen, M. P. Fahay, A. W. Kendall Jr., and S. L. Richardson, editors. *Ontogeny and systematics of fishes*. American Society of Ichthyologists and Herpetologists. Special publication. Allen Press, Lawrence, Kansas, USA.

Robinson, N., Karlsen, C., Ytteborg, E., Krasnov, A., Gerwins, J., Johnsen, H., Kolarevic, J., 2021. Skin and bone development in Atlantic salmon (*Salmo salar*) influenced by hatchery environment. *Aquaculture* 544, 737155. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737155>

Sanches, P.V., Baumgartner, G., Bialecki, A., Rodrigues, M., 2008. Caracterização do desenvolvimento inicial de *Leporinus friderici* (Osteichthyes, Anostomidae) da bacia do rio Paraná, Brasil. *Acta Sci. Biol. Sci.* 23, 383–389. <https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v23i0.2693>

Seo, W., Park, J., Lee, S., Yoon, S.M., Hwang, S., Han, K., 2018. Osteological Development of the Larvae and Juvenile of Bullhead torrent catfish , *Liobagrus obesus* 22, 9–18.

Sfakianakis DG, Leris I, Laggis A, Kentouri M. 2011 The effect of rearing temperature on body shape and meristic characters in zebrafish (*Danio rerio*) juveniles.

Stevanato, D.J., Ostrensky, A., 2018. Ontogenetic Development of Tetra *Astyanax lacustris* (Characiformes: Characidae). *Neotropical Ichthyology* 16, 1-1.

Valenti, Wagner C. et al. Aquaculture in Brazil: past, present and future. Aquaculture Reports, v. 19. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/207202>>.

Valladão, G. M. R., Gallani, S. U., Pilarski, F., 2016. South American fish for continental aquaculture. Reviews in Aquaculture 10, 351-369.

Vandewalle, P., G. Germeau, P. Besancenet, E. Parmentier e E. Baras. 2005. Early Skeletal Head Development in *Brycon Moorei* (Pisces, Ostariophysi, Characidae). Journal of Fish Biology, 66: 996-1024. Vari, RP

Waagbo, R., 2006. Feeding and disease resistance in fish. In: Mosenthin R, Zenek J, Zebrowska T (eds) Biology of Nutrition in Growing Animals, 387-415.

Walter, BE 2013. Cranial Skeletogenesis and Osteology of the Red-Eyed *Tetra Moenkhausia sanctaefilomenae*. Journal of Fish Biology, 82: 69-95.

Zambonino Infante, J. L. and C. L. Cahu 2001. "Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology.