

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NOS PARÂMETROS
REPRODUTIVOS E NA ALIMENTAÇÃO
DE LARVAS DE *Lophosilurus alexandri***

LUCAS PEDRO GONÇALVES JUNIOR

BELO HORIZONTE

2019

LUCAS PEDRO GONÇALVES JUNIOR

**INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NOS PARÂMETROS REPRODUTIVOS E NA
ALIMENTAÇÃO DE LARVAS DE *Lophiosilurus alexandri***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Zootecnia.

Área de concentração: Produção Animal

Prof. Orientador: Dr. Ronald Kennedy Luz

Coorientadores:

Dr^a. Angélica da Silva Vasconcellos

Dr. Alan Diego Conceição Santos

BELO HORIZONTE

2019

G635i Gonçalves Junior, Lucas Pedro, 1993-
Influência da temperatura nos parâmetros reprodutivos e na alimentação de larvas de
Lophosilurus alexandri / Lucas Pedro Gonçalves Junior. – 2019.
112 p. : il.

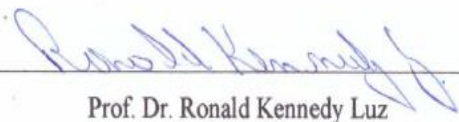
Orientador: Ronald Kennedy Luz

Coorientadores: Angélica da Silva Vasconcellos, Alan Diego Conceição Santos
Teşe (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária.
Inclui bibliografia

I. Pacamã (Peixe) – Reprodução – Teses. 2. Pacamã (Peixe) – Alimentação e rações –
Teses. 3. Temperatura – Efeito fisiológico – Teses. 4. Produção animal – Teses. I. Luz,
Ronald Kennedy. II. Vasconcellos, Angélica da Silva. III. Santos, Alan Diego Conceição.
IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. V. Título.

CDD – 639.3

TESE defendida e aprovada em 28/02/2019 pela comissão avaliadora composta pelos seguintes membros.



Prof. Dr. Ronald Kennedy Luz



Prof. Dr. Nilo Bazzoli



Prof. Dr. Rodrigo Takata



Prof.ª Dr.ª Gisele Cristina Fávero



Prof.ª Dr.ª. Cintia Labussière Nakayama

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese ao meu filho, Miguel Gripp Vezula Gonçalves, meus pais Lucas Pedro Gonçalves e Irene Gravel Vezula Gonçalves, a minha irmã Lara Vezula Gonçalves e aos meus tios Ademir Pirovani e Neuza Vezula.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Ronald Kennedy Luz, pelos seus eternos ensinamentos, preciosos conselhos e confiança. É com imensa honra e orgulho que adquiri, em minha formação profissional, a experiência de ter trabalhado no Laboratório de Larvicultura sob a sua orientação. Muito obrigado!

Agradeço ao amigo e coorientador Prof. Dr. Alan Diego Conceição Santos pela colaboração valiosa nesta tese na análise de Ressonância Magnética Nuclear.

Agradeço a minha coorientadora Prof^a. Dr^a. Angélica da Silva Vasconcelos pela colaboração valiosa nesta tese na avaliação do comportamento reprodutivo.

Agradeço a amiga Dr^a. Deliane Cristina Costa pela colaboração valiosa nesta tese no experimento de alimentação das larvas.

Agradeço aos amigos Cristiano, Walisson e Edenilce pela ajuda na coleta de dados, análises hematológicas e bioquímicas.

Agradeço ao Prof. Dr. Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida por disponibilizar o laboratório de Ressonância Magnética Nuclear.

Aos amigos do laboratório de larvicultura que colaboraram de alguma forma para esta tese, Luiz Gustavo, Gustavo, Reinaldo, Tulio, Angélica, Isabela.

Ao amigo de longa data, Bruno Dias Santos pela ajuda na análise estatística.

Agradeço ao Tarso pela ajuda na avaliação do comportamento reprodutivo.

Agradeço a CAPES, FAPEMIG e CNPq pela bolsa concedida e financiamento do projeto.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	7
LISTA DE FIGURAS	109
LISTA DE ABREVIATURAS	121
RESUMO	132
ABSTRACT	143
INTRODUÇÃO	14
REVISÃO DE LITERATURA	15
PACAMÃ <i>Lophiosilurus alexandri</i>	15
COMPORTAMENTO REPRODUTIVO	17
METABOLÔMICA EM PEIXES	19
TEMPERATURA E REPRODUÇÃO	21
TEMPERATURA E ALIMENTAÇÃO DE LARVAS	24
OBJETIVO GERAL	26
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
REFERÊNCIAS	27
ARTIGO 1: TEMPERATURE-INDUCED CHANGES IN REPRODUCTIVE VARIABLES IN THE TELEOST FISH <i>Lophiosilurus alexandri</i>	44
ARTIGO 2: AVALIAÇÃO METABOLÔMICA POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR EM REPRODUTORES DO PEIXE TELEÓSTEO <i>Lophiosilurus alexandri</i> SUBMETIDO AO AUMENTO DA TEMPERATURA ...	68
ARTIGO 3: EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE O CONSUMO E DIGESTÃO DE NÁUPLIOS DE ARTÊMIA NAS FASES INICIAS DE VIDA DO <i>Lophiosilurus alexandri</i>	90
CONSIDERAÇÕES FINAIS	112

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1. Temperature-induced changes in reproductive variables in the teleost fish *Lophiosilurus alexandri*.

Table 1. Frequency of *L. alexandri* spawns in four tanks during the period with the mean water temperature in 29.0 °C.....49

Table 2. Means (\pm SD) for spawn weight, egg weight, larval weight 0 days post hatching (dph), larval weight 8 dph, number of eggs/spawn, hatching rate, survival 8 dph, and stress resistance (Re) for newly hatched larvae and larvae 8 days dph of *L. alexandri*.....50

Table 3. F-values and means (\pm SD) for hematocrit, plasma protein, leukocytes, erythrocytes and glucose.....51

Table 4. Deviation of the interactions (\pm SD) for plasma protein (g/dL).....51

Table 5. F-values and means (\pm SD) for testosterone and 17 β -estradiol.....52

Table 6. Description of the behaviors observed for *L. alexandri*.....53

ARTIGO 3. Efeito da temperatura sobre o consumo e digestão de náuplios de artêmia nas fases iniciais de vida do *Lophiosilurus alexandri*.

Tabela 1. Ilustração do desenho das unidades experimentais em esquema fatorial 4x4x8 (idade, temperatura e tempo de avaliação do conteúdo estomacal.....92

Tabela 2. Valores de F para consumo de náuplios, taxa de digestão e consumo em porcentagem do peso de larvas de *L. alexandri* em diferentes idades, temperaturas e tempos de coleta.....95

Tabela 3. Desdobramento da interação temperatura, idade e tempo para consumo de náuplios de artêmia por larvas de *L. alexandri* em diferentes idades, temperaturas e tempos de coleta. Média (\pm desvio padrão).....96

Tabela 4. Desdobramento da interação temperatura, idade e tempo para consumo em porcentagem do peso vivo para larvas de *L. alexandri* em diferentes idades, temperaturas e tempo de coletas. Média (\pm desvio padrão).....97

Tabela 5. Desdobramento da interação temperatura, idade e tempo para taxa de digestão de náuplios de artêmia por larvas de <i>L. alexandri</i> em diferentes idades, temperaturas e tempo de coletas. Média (\pm desvio padrão).....	98
---	----

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1: Temperature-induced changes in reproductive variables in the teleost fish *Lophiosilurus alexandri*.

Figure 1. Proportion of behaviors — Inactivity (IN), Locomotion (DL), Courting Behavior (CB) and Reproductive Behavior (RB) — exhibited by the breeding female (a) and male (b) on the night of spawning, and by the non-spawning individuals (c) of *Lophiosilurus alexandri* during the 24 hours of observation.....54

Figure 2. (A) Male (bottom) and female (top) on the nest prior to spawning. Note their lateral opposite position. (B) Male on eggs in the nest during parental care.....54

Figure 3. Frequency of biting behavior pre- and post-spawning for the female and male spawning fish and the non-spawning fish of *Lophiosilurus alexandri* during the 24 hours of observation. Bars with different letters represent significant differences ($P < 0.05$).....55

ARTIGO 2: Avaliação metabólica por Ressonância Magnética Nuclear em reprodutores do peixe teleosteo *Lophiosilurus alexandri* submetido ao aumento da temperatura

Figura 1: Espectros de ^1H representativos do soro dos peixes analisados sendo: RF 21 (reprodutor fêmea a 24°C), RF 29 (reprodutor fêmea a 29°C), RM 24 (reprodutor macho a 24°C) e RM 29 (reprodutor macho a 29°C).....72

Figura 2: Gráfico de escores (PC3 x PC4) das amostras de soro dos peixes analisados sendo: RF 24 (reprodutor fêmea a 24,4 °C), RF 29 (reprodutor fêmea a 29 °C), RM 24 (reprodutor macho a 24,4 °C) e RM 29 (reprodutor macho a 29°C).....73

Figura 3: Gráfico de loadings 1 D da PC3 das amostras de soro dos reprodutores de *Lophiosilurus alexandri* analisados, com identificação dos sinais com maior impacto na variação dos dados. Os sinais negativos indicam os *buckets* que contribuíram para a diferença dos escores dos peixes mantidos a 24 °C. Os sinais positivos indicam os *buckets* que contribuíram para a diferença dos escores dos peixes mantidos a 29 °C.....74

ARTIGO 3. Efeito da temperatura sobre o consumo e digestão de náuplios de artêmia nas fases iniciais de vida do *Lophiosilurus alexandri*.

Figura 1. Interação entre temperatura, idade e tempo para consumo total de náuplios de larvas de *L. alexandri*. (A) Interação temperatura x idade. (B) Interação temperatura x tempo. (C) Interação idade x tempo.....99

Figura 2. Interação entre temperatura, idade e tempo para consumo em porcentagem do peso vivo para larvas de *L. alexandri*. (A) Interação temperatura x idade. (B) Interação temperatura x tempo. (C) Interação idade x tempo.....100

Figura 3. Interação entre temperatura, idade e tempo para taxa de náuplios digeridos para larvas de *L. alexandri*. (A) Interação temperatura x idade. (B) Interação temperatura x tempo. (C) Interação idade x tempo.....100

LISTA DE ABREVIATURAS

AST- Aspartato aminotransferase
ACP - Análise de componentes principais
AQ - tempo de aquisição
CB - courting Behavior
d1- relaxation delay
d8 - mixing time
DL - locomotion
DPE – dias pós eclosão
FSH – hormônio folículo estimulante.
GH - hormônio de crescimento
GnRH – hormônio liberador de gonadotrofinas.
IN - inactivity
LH- hormônio lutennnnbbbbizante.
NS - transientes
PC 3 – componente principal 3
PC4 – componente principal 4
PCs – componentes principais
POMC - pro-opiomelanocortina
PRL - prolactina
RB - reproductive behavior
RF 24 - reprodutor fêmea a 23°C
RF 28 - reprodutor fêmea a 28°C
RM 23 - reprodutor macho a 23°C
RM 28 - reprodutor macho a 28°C
RMN – ressonância magnética nuclear
SD – desvio padrão
SL - somatolactina
TD - número de pontos
TSH - tirotrofina

RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram avaliar o efeito da manipulação da temperatura na reprodução, perfil metabólico e alimentação de larvas do *Lophiosilurus alexandri*. Para o experimento de reprodução foram utilizados quatro machos e 12 fêmeas. Da semana 1 a 22, a temperatura da água foi mantida em $24,4 \pm 1,0$ °C. Após a semana 22, a temperatura da água foi elevada e mantida em $29,0 \pm 1,1$ °C até a semana 44. Para o segundo experimento, foi utilizado a abordagem metabolômica por Ressonância Magnética Nuclear na avaliação das respostas metabólicas no soro dos reprodutores, submetidos as mesmas condições de temperatura descrita acima. No terceiro experimento, foram realizadas avaliações sobre a ingestão e digestão dos náuplios de artêmia por larvas de *L. alexandri* em diferentes temperaturas: 23, 26, 29 e 32 °C; diferentes idades: 8, 13, 18 e 23 dias pós eclosão; e diferentes tempos de coleta: 5, 15, 30, 45, 60, 120, 180 e 300 minutos após a alimentação. O peso da desova, número de ovos/desova e taxa de eclosão foram satisfatórios e variaram em 27,5–127,5g, 1209–5183 e 83–89%, respectivamente. O hematócrito, leucócitos e glicose, não foram influenciados pelo aumento da temperatura ($P < 0,05$). Não foi evidenciada variação no 17β -estradiol em função das temperaturas avaliadas ($P > 0,05$). O comportamento reprodutivo para *L. alexandri* foi reportado, incluindo a corte e o cuidado parental. A Análise dos Componentes Principais revelou menores valores de valina, creatina/fosfocreatina e ácidos graxos poli-insaturados com a temperatura em 24,4 °C. Após elevação da temperatura ocorreu aumento de unidade de glicerol dos ácidos graxos que compõem a fração lipídica das lipoproteínas e do colesterol total. Para as larvas, o consumo de náuplios de artêmia, consumo em porcentagem do peso vivo e a taxa de digestão em larvas de *L. alexandri* foram influenciados ($P < 0,01$) pela temperatura, idade e tempo, assim como pela interação entre estes três fatores. Com base nestes resultados foi possível concluir que, indivíduos adultos são capazes de manter estáveis os parâmetros hematológicos durante a elevação da temperatura da água de 24,4 °C para 29,0 °C e produzir larvas de boa qualidade. A predominância de lipídios no soro foi a principal alteração metabólica em função do aumento da temperatura média da água de 24,4 para 29 °C. As temperaturas de 29 e 32 °C foram as que proporcionaram os resultados mais satisfatórios para alimentação das larvas.

Palavras-chave: fisiologia, larvicultura, pacamã, peixe nativo; reprodução.

ABSTRACT

The objectives of this thesis were to evaluate the manipulation effect of temperature on reproduction, metabolic profile and larval feeding of *Lophiosilurus alexandri*. For the reproduction experiment, four males and 12 females were used. From week 1 to 22, the water temperature was maintained at 24.4 ± 1.0 °C. After week 22, the water temperature was elevated and maintained at 29.0 ± 1.1 °C until week 44. For the second experiment, the metabolomic approach for Nuclear Magnetic Resonance was used in the evaluation of the metabolic responses in the serum of the reproducers, submitted to the conditions described above. In the third experiment, evaluations were made on the ingestion and digestion of artemia nauplii by *L. alexandri* larvae at different temperatures: 23, 26, 29 and 32 °C; different ages: 8, 13, 18 and 23 days after hatching; different times 5, 15, 30, 45, 60, 120, 180 and 300 minutes after feeding. Spawning weight, number of eggs/spawn, and hatching rate were satisfactory and ranged from 27.5-127.5g, 1209-5183 and 83-89%, respectively, during breeding. Hematocrit, leukocytes and glucose were not influenced by the increase in temperature ($P < 0.05$). No variation in 17β -estradiol was evidenced as a function of the temperatures evaluated ($P > 0.05$). Reproductive behavior for *L. alexandri* has been reported, including court and parental care. Lower values of valine, creatine/phosphocreatine and polyunsaturated fatty acids were verified at 24 °C. After elevation of temperature, there was an increase in the glycerol unit of the fatty acids that make up the lipid fraction of lipoproteins and total cholesterol. For larvae, the consumption of artemia, consumption of live weight percentage and digestion rate in *L. alexandri* larvae were influenced ($P < 0.01$) by temperature, age and time, as well as by the interaction between these three factors. Based on these results it was possible to conclude that adult individuals are able to maintain stable hematological parameters during the elevation of water temperature from 24.4 °C to 29.0 °C and to produce good quality larvae. The predominance of serum lipids was the main metabolic alteration due to the increase in water temperature from 24 to 29 °C. Temperatures of 29 and 32 °C provided the most satisfactory results for larval feeding.

Key words: physiology, larviculture, pacamã, native fish; reproduction.

INTRODUÇÃO

A maioria das informações disponíveis na literatura sobre a relação entre a temperatura da água e reprodução em peixes foi obtida de pesquisas com espécies de clima temperado. Entre as iniciativas com espécies nativas, podem ser citados os trabalhos realizados com o curimatã-pacu (*Prochilodus argenteus*) (Arantes et al., 2010, 2011; Thomé et al., 2012) e o *Rhamdia quelen* (Sanches et al., 2011). Portanto, os estudos sobre biologia reprodutiva e sua relação com fatores endócrinos e ambientais são fundamentais para melhorar as técnicas de cultivo de espécies nativas (Arantes et al., 2011).

Os estudos de reprodução em peixes têm avaliado o efeito da temperatura em diferentes níveis de respostas, incluindo a gametogênese, desempenho reprodutivo, esteroides sexuais e parâmetros fisiológicos (Pankhurst e King, 2010). Entretanto, há escassez de informações sobre alterações metabólicas ligadas a interação da temperatura com a atividade reprodutiva em peixes. Visando a busca de mais informações em relação aos aspectos reprodutivos em peixes, a análise metabolômica, que apresenta aplicação em diferentes áreas da ciência, principalmente nas pesquisas com objetivo de avaliar as respostas das vias metabólicas do organismo (Viant, 2009), pode ser mais uma importante ferramenta.

Além da reprodução, a temperatura também influencia o consumo de alimento e a eficiência de digestão durante a fase larval (Legler et al., 2010; Ma et al., 2014; Takata et al., 2014). É provável que as diferentes espécies apresentem temperatura específica para ótima eficiência alimentar. Estudos de alimentação por meio da avaliação do conteúdo estomacal de larvas podem contribuir com informações que melhorem a eficiência produtiva (Olsen et al., 2000; Ribeiro e Nuñez, 2008; Zhang et al., 2015), especificamente sobre o efeito da temperatura durante o período da primeira alimentação exógena (Legler et al., 2010; Ma et al., 2014), momento crítico da larvicultura em peixes (Yufer et al., 1996; Lombardi e Gomes, 2008; Menossi et al., 2012).

Desta forma, conhecer o efeito da temperatura nas respostas fisiológicas em reprodutores, e no consumo e digestão do alimento vivo em diferentes idades das larvas poderá contribuir com informações para aprimorar os protocolos de reprodução e larvicultura de peixes nativos mantidos em cativeiro.

REVISÃO DE LITERATURA

PACAMÃ *Lophiosilurus alexandri*

O *Lophiosilurus alexandri*, comumente chamado de pacamã, é uma espécie pertencente a ordem dos Siluriformes que está entre os peixes endêmicos da bacia do Rio São Francisco na lista dos animais vulneráveis a extinção (ICMbio, 2016). Em função de sua vulnerabilidade aos impactos antropogênicos, principalmente os relacionados a atividade de pesca e as alterações em seu ambiente natural, como a construção de barragens, esta espécie foi utilizada em programas de repovoamento e conservação da bacia do Rio São Francisco (Sato et al., 2003).

Em seu habitat, o período reprodutivo ocorre entre os meses de novembro e fevereiro, época mais chuvosa e quente (Sato et al., 2003). O *L. alexandri* possui o desenvolvimento gonadal do tipo assincrônico (Barros et al., 2007; Melo et al., 2011), apresentando desovas parceladas ao longo da estação reprodutiva (Costa et al., 2015). Em relação a morfologia do sistema reprodutivo, as fêmeas apresentam ovários pares, em que o lume tem continuidade com o oviduto, através do qual os ovócitos alcançam o meio externo; já nos machos, os testículos são órgãos franjados, com atividade espermatogênica apenas na região craniana e atividade secretora na região caudal (Barros et al., 2007; Melo et al., 2011).

O *L. alexandri* apresenta ovos aderentes, com construção de ninho em fundo arenoso e cuidado parental exercido pelo macho (Sato et al., 2003; Costa et al. 2015). O primeiro relato de desova em cativeiro está descrito no trabalho realizado por Sato et al. (1999), em que a reprodução foi obtida pela indução hormonal com extrato bruto de hipófise de carpa. Atualmente, sabe-se que em condições controladas, sua reprodução natural pode ser manipulada por controle de temperatura e alimentação, sendo verificadas desovas trinta dias após o aumento da temperatura da água para 28° C (Costa et al., 2015). Estes autores também demonstraram que a reprodução ocorreu no período noturno e em dias com menos atividade no laboratório. O número médio de ovos por desova e taxa de eclosão obtidos foram de 4534 ovos e 59 % Santos et al., (2013) e de 4600 ovos e 95% Costa et al., (2015), respectivamente.

Estudos também foram desenvolvidos com o foco na produção de juvenis de *L. alexandri*, principalmente sobre a larvicultura (Pedreira et al., 2008; Santos e Luz, 2009; Takata et al., 2014; Salaro et al., 2015; Santos et al., 2015), condicionamento alimentar a

dietas comerciais (Silva et al., 2014), densidade de estocagem (López et al., 2000; Luz e Santos, 2008; Cordeiro et al., 2016) e o desenvolvimento de sistemas para a larvicultura (Pedreira et al., 2009; Melillo Filho et al., 2014). Para esta espécie, a utilização da água levemente salinizada (2 g de sal/L) favoreceu o crescimento e sobrevivência (Santos e Luz, 2009). Neste mesmo sentido a utilização da temperatura da água entre 29-32° C combinados com a concentração de presas de 1.300 náuplios de artêmia/larva/dia, dividido em três refeições diárias possibilitou obter sobrevivência de até 96% em 15 dias (Takata et al., 2014). Em outro estudo, foi recomendado 1.600 náuplios de artêmia/larva/dia para o máximo crescimento (Santos et al., 2015). Além disso, a separação das larvas por traços de personalidade, possibilitou uma diminuição do canibalismo e, portanto, larvicultura mais produtiva nos primeiros 15 dias de alimentação exógena (Torres et al., 2017). Já, durante o condicionamento alimentar, foi recomendada taxa de arraçamento de 50% da biomassa e a alimentação fornecida por três vezes ao dia (Silva et al., 2014). Quanto aos alimentos nesta fase de condicionamento, a utilização de dieta úmida formulada com coração de boi ou gelatina, resultaram em valor para sobrevivência superior a 70% (Salario et al., 2015).

Em contrapartida, há escassez de informações na literatura sobre a alimentação e nutrição do *L. alexandri*. Iniciativas isoladas foram realizadas, porém apenas para as fases iniciais de crescimento (Souza et al. 2013,2014; Figueiredo et al., 2014; Melo et al., 2016). Além disso, as informações sobre a digestibilidade dos ingredientes para esta espécie sob diferentes condições ainda não foram definidas. Para juvenis com peso inicial de 5g, o requerimento em proteína bruta foi estimado em 36,2% (Souza et al. 2013). Em outro estudo com juvenis na mesma fase (peso médio de 2 g), resultado semelhante foi obtido, em que o requerimento em proteína bruta foi estimado em 38% com base nos resultados de desempenho produtivo (Souza et al., 2014).

Por possuir habito alimentar carnívoro, o *L. alexandri* apresentou limitada capacidade de inclusão de carboidratos em sua dieta, uma vez que as relações entre proteínas/carboidratos inferiores a 1,24 resultaram em alterações negativas no desempenho produtivo, gordura visceral, glicemia e aminoácidos livres no plasma (Figueiredo et al., 2014). Por outro lado, com base no coeficiente de digestibilidade de proteína bruta para seis ingredientes como: farinha de peixe (86%), farinha de carne e ossos (82%), farelo de soja (89%), soja integral tostada (91%), farelo de trigo (83%) e proteose de milho (91%), foi demonstrado que o *L.*

alexandri pode utilizar de forma eficiente os ingredientes de origem vegetal como fonte de proteína (Melo et al., 2016).

Os efeitos de diferentes fatores ambientais também foram avaliados para os juvenis de *L. alexandri*. Por exemplo, a temperatura ideal para ganho de peso e conversão alimentar está entre 27 e 28° C, assim como para os valores basais de hemoglobina, colesterol e cortisol (Costa et al., 2016). Os juvenis de *L. alexandri* foram tolerantes ao choque osmótico até a salinidade de 7,5 g de sal/L (Mattioli et al., 2017). Entretanto, segundo os autores, para as salinidades superiores a 2,5 g de sal/L os valores de cortisol, glicose, hematócrito, osmolaridade e íons Cl⁻ foram alterados e indicaram condição de estresse após a exposição por 24 dias. Quanto aos compostos nitrogenados, alterações fisiológicas foram relatadas após a exposição a baixos níveis (NH₃⁻ = 1,64 mg/L; NO₂⁻ = 1,86 mg/L), sendo as CL₅₀ para 96 horas estimadas em 3,66 e 5,86 mg/L para NH₃⁻ e NO₂⁻, respectivamente (Silva et al., 2018).

Em relação aos aspectos comportamentais, o *L. alexandri* demonstrou ser uma espécie de hábito noturno, uma vez que os peixes mantidos em fotoperíodo de 12L:12D apresentaram maior locomoção (90% das ações totais) e atividade de alimentação (88% das ações totais) na fase escura, embora tenha sido verificada a plasticidade para se adaptar a alimentação durante o dia (Kitagawa et al., 2015). Em contrapartida, em outro estudo foi demonstrado que o uso de tanques pretos durante o cultivo deve ser evitado, pois causou elevação dos níveis plasmáticos de cortisol (Costa et al., 2017). Além disso, estes autores também verificaram que a cor do tanque afetou a pigmentação da pele, sendo que as cores branco e amarelo foram as que resultaram em animais com a pele mais clara, enquanto as cores azul e preto estimularam maior produção de melanóforos.

COMPORTAMENTO REPRODUTIVO

Além de estudos hematológicos e hormonais, o entendimento do comportamento reprodutivo em peixes vem contribuindo para melhorar as condições de manutenção de reprodutores e, conseqüentemente, o aumento da produtividade das espécies em cativeiro (Cacho et al., 2007; Chellappa et al., 2014; Mattos et al., 2016). Entretanto, a grande maioria dos estudos foi realizado com o objetivo de avaliar o comportamento reprodutivo em ciclídeos (Teresa e Freitas, 2011; Alonso et al., 2012; Tubert et al., 2012; Baldauf et al., 2013; Kidd et al., 2013; Araújo et al., 2014; Ramallo et al., 2014; Selz et al., 2014; Simões et al.,

2015; Mattos et al., 2016). Desta forma, pouco se sabe sobre os padrões reprodutivos para outros grupos de peixes.

O comportamento reprodutivo é dividido em categorias e subcategorias, que por sua vez, podem variar em função da espécie ou até mesmo dentro do mesmo grupo, como os ciclídeos. Espécies como o *Pterophyllum scalare* (Cacho et al., 1999), *Symphysodon aequifasciatus* (Mattos et al., 2016), *Cichlasoma dimerus* (Alonso et al., 2012) e o *Arapaima gigas* (Monteiro et al., 2010) apresentaram comportamento reprodutivo semelhante, sendo dividido em escolha do parceiro, formação de casal, acasalamento, desova e cuidado biparental. Em outros casos, macho e fêmea interagem apenas no momento do acasalamento e desova, com cuidado parental realizado por apenas um dos sexos, como é o caso do *Betta splendens* (Faria et al., 2007) e *Oreochromis* sp. (Freitas e Ferreira, 2004; Mendonça e Freitas, 2008; Chellappa et al., 2014; Simões et al., 2015).

A escolha do parceiro para acasalamento está descrita para diferentes espécies. Para o *P. scalare*, machos experientes e agressivos foram escolhidos pelas fêmeas para formar casal, resultando em maior sobrevivência dos ovos e larvas durante o cuidado parental (Cacho et al., 2007). Para o *Cichlasoma dimerus*, tanto para machos quanto para fêmeas, os indivíduos que formaram casal foram os mais altos na hierarquia social. Para a tilápia vermelha (*O. niloticus* x *O. mossambicus*), machos maiores e agressivos na posse de locais de reprodução foram preferidos pelas fêmeas durante a seleção do parceiro (Chellappa et al., 2014). Em contrapartida, a dominância social da fêmea não promoveu prioridade de acasalamento em *O. niloticus*, sendo que, possivelmente, os machos desta espécie escolheram as fêmeas em função do estágio de maturação gonadal e não a posição social (Freitas e Ferreira, 2004).

A habilidade de escolha do parceiro para o acasalamento foi adquirida ao longo da escala evolutiva e está associada a maior chance de sobrevivência da prole (York et al., 2015). Fêmeas de pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*) apresentaram preferência por machos bem nutridos em relação aos machos submetidos à privação de alimento (Giaquinto, 2010). Já para as espécies onde a capacidade de defesa do território é de grande relevância, justifica-se a preferência por indivíduos de maior porte e agressividade (Alonso et al., 2012; Araújo et al., 2014; Chellappa et al., 2014; Keller-Costa et al., 2014). Outros aspectos associados à escolha do parceiro para reprodução são os estímulos visuais, como a exibição das nadadeiras (Makowicz et al., 2016) e intensificação da coloração (Oliveira et al., 1993; Selz et al., 2014).

Além dos estímulos visuais, outros mecanismos de comunicação são utilizados pelos peixes durante o comportamento reprodutivo. Os feromônios são os principais estímulos químicos envolvidos no comportamento reprodutivo (Hubbard et al., 2014; Huertas et al., 2014; Keller-Costa et al., 2014; Simões et al., 2015). Nesse mesmo sentido, a frequência e duração da comunicação sonora entre os peixes também vêm sendo associados ao comportamento e ao sincronismo na reprodução, determinando o sucesso da corte (Vasconcelos et al., 2012; Longrie et al., 2013). Estes fatores comportamentais são regulados por mecanismos endócrinos em resposta aos estágios fisiológicos que variam durante a maturação gonadal, formação de casal, ovulação e cuidado parental (Munakata e Kobayashi, 2010; Ramallo et al., 2014).

METABOLÔMICA EM PEIXES

Por convenção, o termo metabolômica é definido como a avaliação simultânea do conjunto metabólitos no organismo (Low et al., 2017). Entre as possíveis aplicações, é conhecido seu uso no diagnóstico de doenças (Moazzami et al., 2011; Xu et al., 2013; Kim et al., 2014; Collette et al., 2016; Jang et al., 2016), em estudos de toxicologia (Viant et al., 2005; Huerta et al., 2013; Jakimska et al., 2013), avaliação nutricional (Jasour et al., 2017; Shen et al., 2018) e na interação do organismo com o ambiente (Lardon et al., 2013b; Nam et al., 2017). Esta versatilidade da técnica, provavelmente, está relacionada a possibilidade de extração e avaliação de metabólitos com rapidez e reprodutibilidade de diferentes amostras biológicas como urina, plasma, saliva e músculo (Weckwerth, 2007). Metabolitos constituem uma diversidade de moléculas resultante do produto final do metabolismo e com variação nas propriedades físicas e químicas, como peso molecular, polaridade, solubilidade e volatilidade (Low et al., 2017). Em função disto, as principais técnicas analíticas utilizadas em experimentos envolvendo metabolômica são a espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectroscopia de Massa (Bundy et al., 2009).

Na ciência animal, novas perspectivas de pesquisa surgiram com a avaliação do perfil metabólico, utilizando conjunto de respostas que até então não era possível obter pelos métodos analíticos tradicionais, baseados na interpretação individual de cada parâmetro (Viant, 2009; Bundy et al., 2009). Em peixes, os protocolos analíticos já são conhecidos em trabalhos avaliando os metabólitos de diferentes tecidos como músculo, fígado (Lin et al., 2007; Wu et al., 2008), rins (Allen et al., 2015), plasma (Bembenek Bailey et al., 2017;

Prathomya et al., 2017), soro (Hajirezaee et al., 2018), ovos e larvas (Soanes et al., 2011; Huang et al., 2013; Cai et al., 2014). De maneira geral, a metabolômica se expandiu na linha complementar às análises genômica, transcritômica e proteômica (Soanes et al., 2011; Cho et al., 2017; Low et al., 2017).

Entre os estudos já realizados em peixes, existe interesse na identificação de marcadores biológicos nos ensaios de toxicologia (Viant et al., 2005; Ekman et al., 2008, 2009; Bundy et al., 2009; Collette et al., 2016; Akhtar et al., 2016). Por exemplo, em *Oryzias latipes*, foi revelado alteração nas trajetórias metabólicas em todo espectro de RMN durante a embriogênese para os embriões expostos à concentrações superiores a 8 mg/L de tricloroetileno (Viant et al., 2005). Para embriões de *Danio rerio* foi demonstrado que os metabólitos precursores da dopamina, fenilalanina e tirosina, estiveram associados ao efeito negativo na neurotransmissão quando exposto a canabíoides (Akhtar et al., 2016). Distúrbios fisiológicos em machos de *Pimephales promelas*, incluindo alterações no metabolismo energético (glicogênio, glicose e lactato), toxicidade hepática (creatina e ácidos biliares), aumento de aminoácidos e lipoproteína no sangue associados à síntese de vitelogenina (Ekman et al., 2008) e alteração no perfil de lipídio hepático (Ekman et al., 2009), estiveram associados à exposição ao estrógeno 17 α -etilestradiol.

Além das alterações fisiológicas relacionadas a toxicologia, em recente revisão foi ressaltada a emergente aplicação da metabolômica na elucidação dos mecanismos de ação de doenças, assim como possíveis estratégias terapêuticas para melhorar a saúde dos peixes (Low et al., 2017). De fato, para exemplares de *Ictalurus punctatus* com quadro clínico de anemia, as fontes de energia a partir da glicose foram esgotadas e os metabólitos associados ao metabolismo anaeróbico como lactato, creatina, alanina e acetato tinham aumentado como via de energia alternativa (Allen et al., 2015). Estudos de metabolômica também foram realizados com peixes infectados com diferentes agentes patogênicos como vírus (Cho et al., 2017; Wu et al., 2010), bactéria (Cheng et al., 2014; Guo et al., 2014; Ma et al., 2015) e parasitas (Kodama et al., 2014), com foco na identificação de biomarcadores.

Em relação à exposição a condições adversas do ambiente, diferentes espécies de peixes foram utilizadas na avaliação da resposta à variação de fatores abióticos. Especificamente para o estresse por hipóxia em *Carassius carassius*, o espectro de metabólitos foi amplamente alterado, resultando na redução de fosfocreatina (músculo, fígado), glicogênio (fígado), ATP/ADP (fígado, coração e músculo), aumento na

concentração de lactato (cérebro, coração e músculo) e ácido beta-hidroxiacético (todos tecidos) (Lardon et al., 2013b). Em outro estudo, resultado semelhante foi verificado para *Cyprinus carpio*, também em condição de baixo nível de oxigênio dissolvido na água (Lardon et al., 2013a). Respostas metabólicas do *Acipenser persicus* em condição hiperosmótica também foram avaliadas, sendo as principais alterações de metabólitos ocorridas durante a aclimatação a salinidade verificadas para aminoácidos, osmolitos e metabolismo energético (Hajirezaee et al., 2018).

A limitação alimentar também pode causar efeito em todos grupos de metabólitos nos peixes (Rosenblum et al., 2005). A abordagem metabolômica foi utilizada para explorar o impacto da suplementação da dieta sobre o perfil metabólico em *Salmo salar*, onde o aumento de oito metabólitos principais (leucina, valina, carnitina, creatina, glicose, glicogênio e dois desconhecidos) em resposta a elevados níveis de inclusão de sesamin estiveram associados a distúrbios metabólicos e menor taxa de crescimento (Wagner et al., 2014). Em *Oncorhynchus mykiss* a análise multivariada revelou alterações dos metabólitos no fígado e plasma para os peixes alimentados com diferentes níveis de substituição da farinha de peixe pela farinha de pena (0, 8 e 24%), sugerindo distúrbio metabólico correlacionado ao metabolismo energético (Jasour et al., 2017). Neste sentido, os estudos avaliando o metaboloma vêm contribuindo para melhorar o entendimento do efeito das dietas nas respostas fisiológicas em peixes, e consequentemente, fornecendo informações complementares para avaliação nutricional. Contudo, até o momento, não há relatos do efeito do aumento da temperatura na metabolômica em reprodutores de peixes.

TEMPERATURA E REPRODUÇÃO

A temperatura é o principal fator que controla a maturação final dos gametas, ovulação e desova (Levy et al., 2011; Unuma et al., 2012; Hermelink et al., 2013; Nowosad et al., 2014). Neste mesmo sentido, elevada variação ou a manutenção da temperatura fora da faixa de conforto pode produzir ovos de baixa qualidade, inibir a reprodução (Targońska et al., 2014, 2011; Unuma et al., 2012; Nowosad et al., 2014;) ou estimular a atresia folicular (Pankhurst et al., 1996; Santos et al., 2008; Thomé et al., 2012). De fato, a inibição da maturação final foi relatada para o *P. argenteus* em peixes capturados em ambiente natural quando a temperatura da água estava em 23° C (Arantes et al., 2010). Para a mesma espécie durante a indução hormonal, a reprodução em condições de cativeiro com a temperatura da

água em 23 °C, levou a redução da fecundidade, número de fêmeas que ovularam e de ovócitos vitelogênicos (Arantes et al., 2011). Estes autores atribuíram esta resposta à temperatura estar abaixo da faixa ideal para reprodução da espécie, que é de 26° C. Em machos, as principais consequências da manutenção da temperatura fora da faixa ideal foram a redução do volume e qualidade espermática em *P. argenteus* (Arantes et al., 2011) e *Leuciscus idus* L. (Targońska et al., 2011), e a inibição da espermatogênese em *Oreochromis niloticus* (Melo et al., 2016b).

A manipulação da temperatura da água em condições de cativeiro vem sendo utilizada no aperfeiçoamento dos protocolos de reprodução em diferentes espécies de teleósteos, possibilitando a obtenção de desovas distribuídas ao longo do ano. Para o *Cyprinus carpio*, foi possível obter desovas antes do período de reprodução natural sem efeito negativo nos resultados para porcentagem de ovulação, motilidade dos espermatozoides e taxa de eclosão, quando a temperatura foi gradualmente aumentada durante 12 dias de 10° C para 20° C (Kucharczyk et al., 2008). Para o *Sander lucioperca*, mantidos durante cinco meses em diferentes temperaturas em sistema de recirculação de água, os melhores resultados para a porcentagem de fêmeas em maturação final foram obtidos nas temperaturas de 9 e 12° C, quando comparado as temperaturas de 6, 15 e 23° C (Hermelink et al., 2011). Para esta mesma espécie em estudo posterior, resultado mais satisfatório para a obtenção de fêmea em maturação final foi relatado quando realizado o condicionamento à temperatura de 12° C durante 12 semanas, seguido do aumento e manutenção da temperatura constante a 14° C por oito semanas (Hermelink et al., 2013). Estes resultados sugerem que a temperatura mais baixa seguida de ligeiro aumento favorece a maturação gonadal.

Este fato também foi relatado em outras espécies. Para o *Conger myriaster*, foi necessário a manutenção da temperatura da água em 6° C para estimular a manutenção gonadal inicial, sendo verificado aumento no diâmetro dos ovócitos de 300 µm para 600 µm; porém, os ovócitos ovulados com diâmetro de 995 µm foram obtidos apenas 41 dias após a elevação da temperatura da água para 10° C (Utoh et al., 2013). Para a *Anguilla anguilla* a maturação final foi obtida para os peixes mantidos durante 6 semanas a 10° C, seguido de aumento para 15° C (Mazzeo et al., 2014). Já o *Leuciscus leuciscus* respondeu eficientemente ao protocolo de indução hormonal a reprodução quando a temperatura da água foi elevada de 6° C para 9,5; 12 ou 14,5° C durante uma semana (Nowosad et al., 2014). Nestes trabalhos,

podemos observar diferentes faixas de variação, indicando que a temperatura ideal para reprodução é espécie específica.

O hipotálamo é responsável por sincronizar o ciclo reprodutivo com as condições ambientais. Os estímulos captados pela kisspeptina e pela glândula pineal são transmitidos para o hipotálamo, que por sua vez libera o GnRH que age na hipófise (Zohar et al., 2010). A hipófise é uma glândula endócrina presente nos vertebrados, responsável pela síntese, armazenamento e liberação de vários hormônios. Além das gonadotrofinas (LH e FSH), também são encontrados na hipófise o hormônio de crescimento (GH), tirotrófina (TSH), pro-opiomelanocortina (POMC), prolactina (PRL) e somatolactina (SL) (Ganeco, 2007). Esses são responsáveis pela regulação de diferentes funções tais como desenvolvimento, crescimento, osmorregulação, metabolismo e reprodução.

As gonadotrofinas, por sua vez, atuam em conjunto com os esteroides reprodutivos na regulação da maturação gonadal (Arantes et al., 2010; Hermelink et al., 2011; Kazeto et al., 2011). Em machos, a testosterona e a 11-ketotestosterona atuam em todas as etapas da espermatogênese (Mori et al., 2003; Mylonas et al., 2010; Ammar et al., 2015). Em fêmeas, a 11-ketotestosterona controla o crescimento dos ovócitos na fase pré-vitelogênica (Kazeto et al., 2011; Ammar et al., 2015). Já, a testosterona, atua principalmente como precursora do 17β -estradiol (Balthazart et al., 1996). O 17β -estradiol é produzido no tecido folicular sobre o controle das gonadotrofinas hipofisárias e atua, principalmente, estimulando a produção de vitelogenina pelo fígado e, conseqüentemente, a deposição dos grânulos de vitelo no ovócito (Ammar et al., 2015; Kazeto et al., 2011; Mori et al., 2003). Já o progestágeno $17\alpha,20\beta$ -DP está estabelecido como o hormônio indutor da maturação final (Kazeto et al., 2011).

A sazonalidade da reprodução em função da variação da temperatura é regulada, principalmente, pelas gonadotrofinas e esteroides reprodutivos. Por exemplo, para o *Trichogaster trichopterus*, maiores valores de mRNA do gene responsável pela expressão do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH3), foi verificado para a temperatura de 27°C em relação a 23°C (Levy et al., 2011). Em *P. argenteus*, a maior porcentagem de fêmeas em maturação foi correlacionada aos valores mais elevados de testosterona e 17β -estradiol quando a temperatura estava em 26°C (Arantes et al., 2010). Para *A. anguilla* a temperatura constante de 18°C inibiu a maturação gonadal em função dos baixos níveis de testosterona, uma vez que a temperatura ideal para esta espécie é 10°C (Mazzeo et al., 2014). Em *S. lucioperca* as concentrações plasmáticas de estradiol, testosterona, 11-ketotestosterona e

17 α ,20 β -DP-progestágeno foram responsáveis por estimular a maturação gonadal durante oito semanas após o aumento da temperatura da água de 12° C para 14° C (Hermelink et al., 2013). Ainda, segundo os mesmos autores, os peixes mantidos na temperatura constante de 23° C tiveram a síntese destes hormônios afetada negativamente e permaneceram com as gônadas em repouso.

Em contrapartida, os efeitos da temperatura nos parâmetros hematológicos em reprodutores não se encontram completamente esclarecidos. Porém, alterações foram relatadas em função da sazonalidade de fatores ambientais e alimentação (Fiszbein et al., 2010; Kavadias et al., 2004; Matsche e Gibbons, 2012; Valenzuela et al., 2006). Outros autores se dedicaram a estabelecer valores de referência para macho e fêmea (Barcellos et al., 2003; Sarameh et al., 2013; Tavares-dias et al., 2004). Em *Dicentrarchus labrax*, aumento nos valores de eritrócitos, leucócitos e hematócrito ocorreram nos meses mais quentes do verão, enquanto os valores de proteína plasmática não foram afetados (Kavadias et al., 2004). De maneira geral, o ritmo sazonal dos níveis dos parâmetros hematológicos, podem ser atribuídos às flutuações naturais de fatores extrínsecos (temperatura da água e fotoperíodo), bem como pelas mudanças subsequentes na ingestão diária de alimentos e maturidade sexual (Kavadias et al., 2004).

TEMPERATURA E ALIMENTAÇÃO DE LARVAS

Os estudos de alimentação durante a larvicultura tem contribuído com informações de importância biológica e produtiva para diferentes espécies de peixes teleósteos. A larvicultura é considerada a fase mais crítica para a sobrevivência, principalmente no momento da primeira alimentação exógena (Yufera et al., 1996; Lombardi e Gomes, 2008; Conceição et al., 2010; Legler et al., 2010; Menossi et al., 2012; Ma et al., 2014). Após o período de utilização da reserva endógena, as larvas necessitam de alimentação em qualidade e quantidade para suprir suas necessidades nutricionais (Pittman et al., 2013). O manejo alimentar incorreto nesta fase pode ocasionar elevada taxa de mortalidade e redução no crescimento (Bonaldo et al., 2011; Hamre et al., 2013; Parma et al., 2013). Neste mesmo sentido, a privação de alimento pode levar a larva a perder permanentemente sua capacidade de alimentação (Ma et al., 2014). Além disso, para as espécies com hábito alimentar carnívoro a ingestão insuficiente de presas pode resultar no aumento do canibalismo (Luz e Zaniboni Filho, 2001; Pedreira e Sipaúba-Tavares 2002; Pedreira et al., 2008; Silva et al., 2014).

A temperatura é um importante fator que afeta a alimentação durante a larvicultura (Johnston e Mathias, 1994; Legler et al., 2010; Baras et al., 2011; Ye et al., 2011; Ma et al., 2014; Takata et al., 2014; McLeond e Clark, 2016). O aumento do metabolismo, que acompanha elevação da temperatura, determina o tempo de busca e, conseqüentemente, a taxa de encontro das larvas com as presas (Johnston e Mathias, 1994). Em contra partida, disfunções relacionadas a fisiologia da digestão estão ligadas aos peixes mantidos fora do conforto térmico, incluindo alteração do tempo de trânsito gastrointestinal (Sun e Chen, 2009; Miegel et al., 2010) e redução da atividade das enzimas digestivas (Hardewig e Van Dijk, 2003; Savoie et al., 2008; Bowyer et al., 2014). Além disso, também ocorreram alterações metabólicas negativas em função do estresse pela temperatura (Turner et al., 2007; Savoie et al., 2008).

Sabe-se que a temperatura ótima durante a alimentação na larvicultura é variável entre as espécies. Por exemplo, o consumo de presa e taxa de ataque ao alimento vivo aumentaram com a elevação da temperatura de 15 para 22 °C para larvas de *Stizostedion vitreum* (Johnston and Mathias, 1994). Para espécies como *Lepomis macrochirus* e *Perca flavescens* maior taxa de digestão ocorre na temperatura de 22°C comparados aos animais alimentados a 7 °C (Legler et al., 2010). Em *Seriola lalandi* a temperatura ideal para ingestão de presa na primeira alimentação também é semelhante, 21-23°C (Ma, 2014). Porém, larvas de *Amphiprion clarkii* expostas a temperatura da água de 23 °C tiveram o consumo alimentar reduzido, conseqüentemente, maior mortalidade e prolongamento do período para atingir a metamorfose em relação as larvas mantidas a 29 °C (Le et al., 2011). Para o *Pangasianodon hypophthalmus*, na primeira alimentação exógena, a temperatura ideal para o máximo crescimento foi ainda mais elevada (31 °C) (Baras et al., 2011). Resultado semelhante foi verificado para o *L. alexandri*, sendo recomendado temperaturas entre 29-32 °C (Takata et al., 2014). Esta divergência da temperatura ótima pode ser atribuída a condição de temperatura distinta do ambiente onde estas espécies são encontradas na natureza. Contudo, não estão completamente esclarecidos os efeitos da temperatura na digestão para as larvas de peixes teleósteos.

OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da manipulação da temperatura na reprodução e alimentação de larvas de *Lophosilurus alexandri*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito do aumento na temperatura da água sobre a reprodução, qualidade das larvas, esteroides sexuais e perfil hematológico do *L. alexandri*

Elaborar o etograma e descrever o comportamento reprodutivo do *L. alexandri*.

Avaliar as respostas metabólicas ao aumento da temperatura em reprodutores de *L. alexandri* utilizando a abordagem metabolômica por RMN.

Quantificar o consumo e digestão de náuplios de artêmia pelas larvas de *L. alexandri* em função da temperatura, idade e tempo após a alimentação.

REFERÊNCIAS

- Akhtar, M.T., Mushtaq, M.Y., Verpoorte, R., Richardson, M.K., Choi, Y.H., 2016. Metabolic effects of cannabinoids in zebrafish (*Danio rerio*) embryos determined by ¹H NMR metabolomics. *Metabolomics* 12, 1–11. doi:10.1007/s11306-016-0964-2
- Allen, P.J., Wise, D., Greenway, T., Khoo, L., Griffin, M.J., Jablonsky, M., 2015. Using 1-D ¹H and 2-D ¹H J-resolved NMR metabolomics to understand the effects of anemia in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Metabolomics* 11, 1131–1143. doi:10.1007/s11306-014-0767-2
- Almeida, F.L., 2013. Endocrinologia aplicada na reprodução de peixes. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 37, 174–180.
- Alonso, F., Honji, R.M., Moreira, R.G., Pandolfi, M., 2012. Dominance hierarchies and social status ascent opportunity: anticipatory behavioral and physiological adjustments in a Neotropical cichlid fish. *Physiol. Behav.* 106, 612–618. doi:10.1016/j.physbeh.2012.04.003
- Ammar, I. Ben, Teletchea, F., Milla, S., Ndiaye, W.N., Ledoré, Y., Missaoui, H., Fontaine, P., 2015. Continuous lighting inhibits the onset of reproductive cycle in pikeperch males and females. *Fish Physiol. Biochem.* 41, 345–356. doi:10.1007/s10695-014-9987-7
- Arantes, F.P., Santos, H.B., Rizzo, E., Sato, Y., Bazzoli, N., 2011. Influence of water temperature on induced reproduction by hypophysation, sex steroids concentrations and final oocyte maturation of the “curimatã-pacu” *Prochilodus argenteus* (Pisces: Prochilodontidae). *Gen. Comp. Endocrinol.* 172, 400–408. doi:10.1016/j.ygcen.2011.04.007
- Arantes, F.P., Santos, H.B., Rizzo, E., Sato, Y., Bazzoli, N., 2010. Profiles of sex steroids, fecundity, and spawning of the curimatã-pacu *Prochilodus argenteus* in the São Francisco River, downstream from the Três Marias Dam, Southeastern Brazil. *Anim. Reprod. Sci.* 118, 330–336. doi:10.1016/j.anireprosci.2009.07.004
- Araújo, A.S., Oliveira, J.C.S., Barros, N.H.C., Yamamoto, M.E., Chellappa, S., 2014. Dinâmica do comportamento territorial de *Crenicichla menezesi* (Osteichthyes:

- Perciformes: Cichlidae). *Biota Amaz.* 4, 37–44. doi:10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v4n1p37-44
- Baldauf, S.A., Engqvist, L., Ottenheym, T., Bakker, T.C.M., Thünken, T., 2013. Sex-specific conditional mating preferences in a cichlid fish: implications for sexual conflict. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 67, 1179–1186. doi:10.1007/s00265-013-1543-4
- Balthazart, J., Foidart, A., Absil, P., Harada, N., 1996. Effects of testosterone and its metabolites on aromatase-immunoreactive cells in the quail brain: Relationship with the activation of male reproductive behavior. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 56, 185–200.
- Baras, E., Raynaud, T., Slembrouck, J., Caruso, D., Cochet, C., Legendre, M., 2011. Interactions between temperature and size on the growth, size heterogeneity, mortality and cannibalism in cultured larvae and juveniles of the Asian catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage). *Aquac. Res.* 42, 260–276. doi:10.1111/j.1365-2109.2010.02619.x
- Barcellos, L.J.G., Kreutz, L.C., Rodrigues, L.B., Fioreze, I., Quevedo, R.M., Cericato, L., Conrad, J., Soso, A.B., Fagundes, M., Lacerda, L.D.A., 2003. Haematological and biochemical characteristics of male junia (*Rhamdia quelen*): changes after acute stress. *Aquac. Res.* 34, 1465–1469. doi:10.1111/j.1365-2109.2003.00972.x
- Barros, M.D.M., Guimarães-Cruz, R.J., Veloso-Júnior, V.C., Santos, J.E. Dos, 2007. Reproductive apparatus and gametogenesis of *Lophiosilurus alexandri* Steindachner (Pisces, Teleostei, Siluriformes). *Rev. Bras. Zool.* 24, 213–221. doi:10.1590/S0101-81752007000100028
- Bailey, S.A.B., Niemuth, J.N., McClellan-Green, P.D., Godfrey, M.H., Harms, C.A., Stoskopf, M.K., 2017. 1 H-NMR metabolomic study of whole blood from hatchling loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) exposed to crude oil and/or Corexit. *R. Soc. Open Sci.* 4, 171433. doi:10.1098/rsos.171433
- Biran, J., Ben-Dor, S., Levavi-Sivan, B., 2008. Molecular identification and functional characterization of the kisspeptin/kisspeptin receptor system in lower vertebrates. *Biol. Reprod.* 79, 776–786. doi:10.1095/biolreprod.107.066266
- Bombardelli, R.A., Syperreck, M.A., Sanches, E.A., 2006. Hormônio liberador de gonadotrofinas em peixes: Aspectos básicos e suas aplicações. *Arq. Ciên. Vet. Zool.* 9, 59–65.

- Bonaldo, A., Parma, L., Badiani, A., Serratore, P., Gatta, P.P., 2011. Very early weaning of common sole (*Solea solea* L.) larvae by means of different feeding regimes and three commercial microdiets: Influence on performances, metamorphosis development and tank hygiene. *Aquaculture* 321, 237–244. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.09.007
- Bowyer, J. N., Qin, J. G., Adams, L. R., Thomson, M. J. S., David A.J., Stone, D. A.J. 2012. The response of digestive enzyme activities and gut histology in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) to dietary fish oil substitution at different temperatures. *Aquaculture* 368–369, 19–28. doi: 10.1016/j.aquaculture.2012.09.012
- Bundy, J.G., Davey, M.P., Viant, M.R., 2009. Environmental metabolomics: a critical review and future perspectives. *Metabolomics* 5, 3–21. doi:10.1007/s11306-008-0152-0
- Cacho, M. do S.R.F., Chellappa, S., Yamamoto, M.E., 2007. Efeitos da experiência de machos no sucesso reprodutivo em acará bandeira, *Pterophyllum scalare* Lichtenstein, 1823 (Osteichthyes, Cichlidae). *Rev. Bras. Zootecias* 9, 41–47.
- Cacho, M. do S.R.F., Yamamoto, M.E., Chellappa, S., 1999. Comportamento reprodutivo do acará bandeira, *Pterophyllum scalare* Cuvier & Valenciennes (Osteichthyes, Cichlidae). *Rev. Bras. Zool.* 16, 653–664.
- Cai, H., Chen, Y., Cui, X., Cai, S., Chen, Z., 2014. High-resolution ¹H NMR spectroscopy of fish muscle, eggs and small whole fish via Hadamard-Encoded Intermolecular Multiple-Quantum Coherence. *PLoS One* 9, e86422. doi:10.1371/journal.pone.0086422
- Chellappa, S., Patrícia, A., Medeiros, T. De, 2014. Dynamics of territorial behaviour and gonad development in the hybrid red tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. mossambicus* (Osteichthyes : Cichlidae). *Anim. Biol. J.* 3, 5–19.
- Cheng, Z., Ma, Y., Li, H., Peng, X., 2014. N-acetylglucosamine enhances survival ability of tilapias infected by *Streptococcus iniae*. *Fish Shellfish Immunol.* 40, 524–530. doi:10.1016/j.fsi.2014.08.008
- Cho, S.Y., Kwon, Y.K., Nam, M., Vaidya, B., Kim, S.R., Lee, S., Kwon, J., Kim, D., Hwang, G.S., 2017. Integrated profiling of global metabolomic and transcriptomic responses to viral hemorrhagic septicemia virus infection in olive flounder. *Fish Shellfish Immunol.* 71, 220–229. doi:10.1016/j.fsi.2017.10.007
- Collette, T.W., Skelton, D.M., Davis, J.M., Cavallin, J.E., Jensen, K.M., Kahl, M.D., Villeneuve, D.L., Ankley, G.T., Martinović-Weigelt, D., Ekman, D.R., 2016. Metabolite profiles of repeatedly sampled urine from male fathead minnows

- (*Pimephales promelas*) contain unique lipid signatures following exposure to anti-androgens. *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics* 19, 190–198. doi:10.1016/j.cbd.2016.01.001
- 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. doi:10.1111/j.1365-2109.2009.02242.x
- Cordeiro, N.I.S., Costa, D.C., Silva, W.S.S., Takata, R., Miranda-Filho, K.C., Luz, R.K., 2016. High stocking density during larviculture and effect of size and diet on production of juvenile *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1876 (Siluriformes: Pseudopimelodidae). *J. Appl. Ichthyol.* 32, 61–66. doi:10.1111/jai.12963
- Costa, D.C., Silva, W. S., Melillo Filho, R., Miranda Filho, K.C., Santos, J.C.E., Kennedy Luz, R., 2015. Capture, adaptation and artificial control of reproduction of *Lophiosilurus alexandri*: A carnivorous freshwater species. *Anim. Reprod. Sci.* 159, 148–154. doi:10.1016/j.anireprosci.2015.06.009
- Costa, D.C., Mattioli, C.C., Silva, W.S., Takata, R., Leme, F.O.P., Oliveira, A.L., Luz, R.K., 2017. The effect of environmental colour on the growth, metabolism, physiology and skin pigmentation of the carnivorous freshwater catfish *Lophiosilurus alexandri*. *J. Fish Biol.* 90, 922–935. doi:10.1111/jfb.13208
- Ekman, D.R., Teng, Q., Villeneuve, D.L., Kahl, M.D., Jensen, K.M., Durhan, E.J., Ankley, G.T., Collette, T.W., 2009. Profiling lipid metabolites yields unique information on sex- and time-dependent responses of fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to 17 α -ethynylestradiol. *Metabolomics* 5, 22–32. doi:10.1007/s11306-008-0138-y
- Ekman, D.R., Teng, Q., Villeneuve, D.L., Kahl, M.D., Jensen, K.M., Durhan, E.J., Ankley, G.T., Collette, T.W., 2008. Investigating compensation and recovery of fathead minnow (*Pimephales promelas*) exposed to 17 α -Ethinylestradiol with metabolite profiling. *Environ. Sci. Technol.* 42, 4188–4194. doi:10.1021/es8000618
- Faria, P.M.C., Crepaldi, D. V, Teixeira, E.A., Ribeiro, L.P., Souza, A.B., Carvalho, D.C., Melo, D.C., Saliba, E.O.S., 2007. Criação, manejo e reprodução do peixe *Betta splendens* (Regan 1910). *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 30, 134–149.
- Figueiredo, R.A.C.R., Souza, R.C., Bezerra, K.S., Campeche, D.F.B., Campos, R.M.L., Souza, A.M., Melo, J.F.B., 2014. Relação proteína:carboidrato no desempenho e

- metabolismo de juvenis de pacamã (*Lophiosilurus alexandri*). Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec. 66, 1567–1576. doi:10.1590/1678-6454
- Fiszbein, A., Cánepa, M., Vázquez, G.R., Maggese, C., Pandolfi, M., 2010. Photoperiodic modulation of reproductive physiology and behaviour in the cichlid fish *Cichlasoma dimerus*. Physiol. Behav. 99, 425–432. doi:10.1016/j.physbeh.2009.11.017
- Freitas, E.G., Ferreira, A.C., 2004. Female social dominance does not establish mating priority in Nile tilapia. Rev Etol. 6, 33–37.
- Ganeco, L.N., 2007. Ontogenia da resposta endócrina em larvas de matrinxã *Brycon amazonicus*. Ênfase nos eixos hipófise-tireóide e hipófise-tecido interrenal. Tese – Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 109.
- Giaquinto, P.C., 2010. Female pintado catfish choose well-fed males. Behaviour 147, 319–332. doi:10.1163/000579509X12535339073761
- Guo, C., Huang, X., Yang, M., Wang, S., Ren, S., Li, H., Peng, X., 2014. GC/MS-based metabolomics approach to identify biomarkers differentiating survivals from death in crucian carps infected by *Edwardsiella tarda*. Fish Shellfish Immunol. 39, 215–222. doi:10.1016/j.fsi.2014.04.017
- Hajirezaee, S., Mirvaghefi, A.R., Farahmand, H., Agh, N., 2018. A metabolic approach to understanding adaptation to sea water by endangered Persian sturgeon, *Acipenser persicus* fingerlings. Aquac. Res. 49, 341–351. doi:10.1111/are.13464
- Hamre, K., Yúfera, M., Rønnestad, I., Boglione, C., Conceição, L.E.C., Izquierdo, M., 2013. Fish larval nutrition and feed formulation: knowledge gaps and bottlenecks for advances in larval rearing. Rev. Aquac. 5, S26–S58. doi:10.1111/j.1753-5131.2012.01086.x
- Hardewig, I., Van Dijk, P.L.M. 2003. Is digestive capacity limiting growth at low temperatures in roach?. J. Fish Biol. 62, 358–374. doi: 10.1046/j.1095-8649.2003.00027.x
- Hermelink, B., Wuertz, S., Rennert, B., Kloas, W., Schulz, C., 2013. Temperature control of pikeperch (*Sander lucioperca*) maturation in recirculating aquaculture systems: induction of puberty and course of gametogenesis. Aquaculture 400-401, 36–45. doi:10.1016/j.aquaculture.2013.02.026.
- Hermelink, B., Wuertz, S., Trubiroha, A., Rennert, B., Kloas, W., Schulz, C., 2011. Influence of temperature on puberty and maturation of pikeperch, *Sander lucioperca*. Gen. Comp. Endocrinol. 172, 282–292. doi:10.1016/j.ygcen.2011.03.013

- Huang, S.-M., Xu, F., Lam, S.H., Gong, Z., Ong, C.N., 2013. Metabolomics of developing zebrafish embryos using gas chromatography- and liquid chromatography-mass spectrometry. *Mol. Biosyst.* 9, 1372. doi:10.1039/c3mb25450j
- Hubbard, P.C., Mota, V.C., Keller-Costa, T., Silva, J.P., Canário, A.V.M., 2014. Chemical communication in tilapia: A comparison of *Oreochromis mossambicus* with *O. niloticus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 207, 13–20. doi:10.1016/j.ygcen.2014.06.022
- Huerta, B., Jakimska, A., Gros, M., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D., 2013. Analysis of multi-class pharmaceuticals in fish tissues by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1288, 63–72. doi:10.1016/j.chroma.2013.03.001
- Huertas, M., Almeida, O.G., Canário, A.V.M., Hubbard, P.C., 2014. Tilapia male urinary pheromone stimulates female reproductive axis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 196, 106–111. doi:10.1016/j.ygcen.2013.11.024
- ICMbio, 2016. Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. Brasília.
- Jakimska, A., Huerta, B., Bargańska, Ż., Kot-Wasik, A., Rodríguez-Mozaz, S., Barceló, D., 2013. Development of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry procedure for determination of endocrine disrupting compounds in fish from Mediterranean rivers. *J. Chromatogr. A* 1306, 44–58. doi:10.1016/j.chroma.2013.07.050
- Jang, W.G., Park, J.Y., Lee, J., Bang, E., Kim, S.R., Lee, E.K., Yun, H.J., Kang, C.M., Hwang, G.-S., 2016. Investigation of relative metabolic changes in the organs and plasma of rats exposed to X-ray radiation using HR-MAS 1 H NMR and solution 1 H NMR. *NMR Biomed.* 29, 507–518. doi:10.1002/nbm.3485
- Jasour, M.S., Wagner, L., Sundekilde, U.K., Larsen, B.K., Greco, I., Orlie, V., Olsen, K., Rasmussen, H.T., Hjermitsev, N.H., Hammershøj, M., Dalsgaard, A.J.T., Dalsgaard, T.K., 2017. A comprehensive approach to assess feathermeal as an alternative protein source in aquafeed. *J. Agric. Food Chem.* 65, 10673–10684. doi:10.1021/acs.jafc.7b04201
- Johnston, T.A., Mathias, J.A., 1994. The effects of temperature on feeding in zooplanktivorous walleye, *Stizostedion vitreum*, larvae. *Environ. Biol. Fishes* 40, 189–198. doi:10.1007/BF00002545

- Kavadias, B.S., Dessypris, A., Miliou, H., 2004. Seasonal variation in steroid hormones and blood parameters in cage-farmed European sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*). *J. Appl. Ichthyol.* 20, 58–63.
- Kazeto, Y., Tosaka, R., Matsubara, H., Ijiri, S., Adachi, S., 2011. Ovarian steroidogenesis and the role of sex steroid hormones on ovarian growth and maturation of the Japanese eel. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 127, 149–154. doi:10.1016/j.jsbmb.2011.03.013
- Keller-Costa, T., Hubbard, P.C., Paetz, C., Nakamura, Y., da Silva, J.P., Rato, A., Barata, E.N., Schneider, B., Canario, A.V.M., 2014. Identity of a tilapia pheromone released by dominant males that primes females for reproduction. *Curr. Biol.* 24, 2130–2135. doi:10.1016/j.cub.2014.07.049
- Kidd, M.R., O'Connell, L.A., Kidd, C.E., Chen, C.W., Fontenot, M.R., Williams, S.J., Hofmann, H.A., 2013. Female preference for males depends on reproductive physiology in the African cichlid fish *Astatotilapia burtoni*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 180, 56–63. doi:10.1016/j.ygcen.2012.10.014
- Kim, J.A., Choi, H.J., Kwon, Y.K., Ryu, D.H., Kwon, T.H., Hwang, G.-S., 2014. 1H NMR-based metabolite profiling of plasma in a rat model of chronic kidney disease. *PLoS One* 9, e85445. doi:10.1371/journal.pone.0085445
- Kitagawa, A.T., Costa, L.S., Paulino, R.R., Luz, R.K., Rosa, P.V., Guerra-Santos, B., Fortes-Silva, R., 2015. Feeding behavior and the effect of photoperiod on the performance and hematological parameters of the pacamã catfish (*Lophiosilurus alexandri*). *Appl. Anim. Behav. Sci.* 171, 211–218. doi:10.1016/j.applanim.2015.08.025
- Kodama, H., Otani, K., Iwasaki, T., Takenaka, S., Horitani, Y., Togase, H., 2014. Metabolomic investigation of pathogenesis of myxosporean emaciation disease of tiger puffer fish *Takifugu rubripes*. *J. Fish Dis.* 37, 619–627. doi:10.1111/jfd.12154
- Kucharczyk, D., Targońska, K., Hliwa, P., Gomułka, P., Kwiatkowski, M., Krejszeff, S., Perkowski, J., 2008. Reproductive parameters of common carp (*Cyprinus carpio*) spawners during natural season and out-of-season spawning. *Reprod. Biol.* 8, 285–289. doi:10.1016/S1642-431X(12)60018-7
- Lardon, I., Eyckmans, M., Vu, T.N., Laukens, K., De Boeck, G., Dommissie, R., 2013a. 1H-NMR study of the metabolome of a moderately hypoxia-tolerant fish, the common carp (*Cyprinus carpio*). *Metabolomics* 9, 1216–1227. doi:10.1007/s11306-013-0540-y

- Lardon, I., Nilsson, G.E., Stecyk, J.A.W., Vu, T.N., Laukens, K., Dommissie, R., Boeck, G., 2013b. 1H-NMR study of the metabolome of an exceptionally anoxia tolerant vertebrate, the crucian carp (*Carassius carassius*). *Metabolomics* 9, 311–323. doi:10.1007/s11306-012-0448-y
- Legler, N.D., Johnson, T.B., Heath, D.D., Ludsin, S.A., 2010. Water temperature and prey size effects on the rate of digestion of larval and early juvenile fish. *Trans. Am. Fish. Soc.* 139, 868–875. doi:10.1577/T09-212.1
- Le., Y. Yang, S.-Y., Zhu, X.-M., Liu, M., Lin, J.-Y., Wu, K.-C., 2011. Effects of temperature on survival, development, growth and feeding of larvae of Yellowtail clownfish *Amphiprion clarkii* (Pisces: Perciformes). *Acta Ecol. Sin.* 31, 241–245. doi:10.1016/j.chnaes.2011.06.003
- Levy, G., David, D., Degani, G., 2011. Effect of environmental temperature on growth- and reproduction-related hormones gene expression in the female blue gourami (*Trichogaster trichopterus*). *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 160, 381–389. doi:10.1016/j.cbpa.2011.07.007
- Lin, C.Y., Wu, H., Tjeerdema, R.S., Viant, M.R., 2007. Evaluation of metabolite extraction strategies from tissue samples using NMR metabolomics. *Metabolomics* 3, 55–67. doi:10.1007/s11306-006-0043-1
- Lombardi, D. C., Gomes, L. C., 2008. Substituição de alimento vivo por alimento inerte na larvicultura intensiva do tambacu (♀ *Colossoma macropomum* X ♂ *Piaractus mesopotamicus*). *Acta Sci. Anim. Sci.* 30, 467-472. doi: 10.4025/actascianimsci.v30i4.3835
- Longrie, N., Poncin, P., Denoël, M., Gennotte, V., Delcourt, J., Parmentier, E., 2013. Behaviours associated with acoustic communication in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *PLoS One* 8, e61467. doi:10.1371/journal.pone.0061467
- López, C.M., Edson, E., Sampaio, V., 2000. Sobrevivência e crescimento larval do pacamã *Lophiosilurus alexandri* Steindachner 1876 (Siluriformes, Pimelodidae), em função de três densidades de estocagem em laboratório. *Acta Sci.* 22, 491–494. doi: 10.4025/actascibiolsci.v22i0.2934
- Low, C.F., Rozaini, M.Z.H., Musa, N., Nataqain, B.S., 2017. Current knowledge of metabolomic approach in infectious fish disease studies. *J. Fish Dis.* 40, 1267–1277. doi:10.1111/jfd.12610

- Luz, R.K., Santos, J.C.E., 2008. Densidade de estocagem e salinidade da água na larvicultura do pacamã. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 43, 903–909. doi: 10.1590/S0100-204X2008000700015
- Luz, R.K.; Zaniboni-Filho, E. 2001. Utilização de diferentes dietas na primeira alimentação do mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*, Lacépède). *Acta Sci. Biol. Sci.* 23, 483-489. doi: 10.4025/actascibiolsci.v23i0.2704
- Ma, Y., Yang, M., Wang, S., Li, H., Peng, X., 2015. Liver functional metabolomics discloses an action of l-leucine against *Streptococcus iniae* infection in tilapias. *Fish Shellfish Immunol.* 45, 414–421. doi:10.1016/j.fsi.2015.04.037
- Ma, Z., 2014. Food ingestion, prey selectivity, feeding incidence, and performance of yellowtail kingfish *Seriola lalandi* larvae under constant and varying temperatures. *Aquac. Int.* 22, 1317–1330. doi:10.1007/s10499-013-9749-z
- Maitra, S.K., Chatteraj, A., Bhattacharyya, S., 2005. Implication of melatonin in oocyte maturation in Indian major carp *Catla catla*. *Fish Physiol. Biochem.* 31, 201–207. doi:10.1007/s10695-006-0025-2
- Maitra, S.K., Chatteraj, A., Mukherjee, S., Moniruzzaman, M., 2013. Melatonin: A potent candidate in the regulation of fish oocyte growth and maturation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 181, 215–222. doi:10.1016/j.ygcen.2012.09.015
- Makowicz, A.M., Tanner, J.C., Dumas, E., Siler, C.D., Schlupp, I., 2016. Pre-existing biases for swords in mollies (*Poecilia*). *Behav. Ecol.* 27, 175–184. doi:10.1093/beheco/arv130
- Martinez-Chavez, C.C., Minghetti, M., Migaud, H., 2008. GPR54 and rGnRH I gene expression during the onset of puberty in Nile tilapia. *Gen. Comp. Endocrinol.* 156, 224–233. doi:10.1016/j.ygcen.2008.01.019
- Matsche, M.A., Gibbons, J., 2012. Annual variation of hematology and plasma chemistry in shortnose sturgeon, *Acipenser brevirostrum*, during a dam-impeded spawning run. *Fish Physiol. Biochem.* 38, 1679–1696. doi:10.1007/s10695-012-9664-7
- Mattioli, C.C., Takata, R., Paes Leme, F. de O., Costa, D.C., Melillo Filho, R., de Souza e Silva, W., Luz, R.K., 2017. The effects of acute and chronic exposure to water salinity on juveniles of the carnivorous freshwater catfish *Lophiosilurus alexandri*. *Aquaculture* 481, 255–266. doi:10.1016/j.aquaculture.2017.08.016

- Mattos, D.D.C., Screnci-Ribeiro, R., Cardoso, L.D., Vazquez, M., Junior, V., 2016. Description of the reproductive behavior of *Symphysodon aequifasciatus* (Cichlidae) in captivity. *Acta Amaz.* 46, 433–438. doi:10.1590/1809-4392201600234
- Mazzeo, I., Peñaranda, D.S., Gallego, V., Baloché, S., Nourizadeh-Lillabadi, R., Tveiten, H., Dufour, S., Asturiano, J.F., Weltzien, F.-A., Pérez, L., 2014. Temperature modulates the progression of vitellogenesis in the *European eel*. *Aquaculture* 434, 38–47. doi:10.1016/j.aquaculture.2014.07.020
- Melillo Filho, R., Takata, R., Santos, A.E.H., Silva, W.S., Ikeda, A.L., Rodrigues, L.A., dos Santos, J.C.E., Salaro, A.L., Luz, R.K., 2014. Draining system and feeding rate during the initial development of *Lophiosilurus alexandri* (Steindachner, 1877), a carnivorous freshwater fish. *Aquac. Res.* 45, 1913–1920. doi:10.1111/are.12139
- McLeod, I.M., Clark, T.D., 2016. Limited capacity for faster digestion in larval coral reef fish at an elevated temperature. *PLoS One* 11, e0155360. doi:10.1371/journal.pone.0155360
- Melo, K.D.M., Oliveira, G.R., Brito, T.S., Soares, D.R.P., Tessitore, A.J.D.A., Alvarenga, É.R., Turra, E.M., Silva, F.C.D.O., Teixeira, E.D.A., 2016. Digestibilidade de ingredientes em dietas para juvenis de pacamã (*Lophiosilurus alexandri*). *Pesqui. Agropec. Bras.* 51, 785–788. doi:10.1590/S0100-204X2016000600012
- Melo, R.M.C., Arantes, F.P., Sato, Y., Santos, J.E., Rizzo, E., Bazzoli, N., 2011. Comparative morphology of the gonadal structure related to reproductive strategies in six species of neotropical catfishes (Teleostei: siluriformes). *J. Morphol.* 272, 525–535. doi:10.1002/jmor.10931
- Melo, R.M.C., Ribeiro, Y.M., Luz, R.K., Bazzoli, N., Rizzo, E., 2016. Influence of low temperature on structure and dynamics of spermatogenesis during culture of *Oreochromis niloticus*. *Anim. Reprod. Sci.* 172, 148–156. doi:10.1016/j.anireprosci.2016.07.013
- Mendonça, F.Z., Freitas, E.G., 2008. Nest deprivation and mating success in Nile tilapia (Teleostei: Cichlidae). *Rev. Bras. Zool.* 25, 413–418. doi: 10.1590/S0101-81752008000300005
- Menossi, O. C.C., Takata, R., Sánchez-Amaya, M.I., Freitas, T.M., Yúfera, M., Portella, M.C., 2012. Crescimento e estruturas do sistema digestório de larvas de pacu alimentadas com dieta microencapsulada produzida experimentalmente, *R. Bras. Zootec.* 41, 1-10.

- Miegel, R.P., Pain, S.J., Wettere, W.H.E.J.V., Howarth, G.S., Stone, D.A.J., 2010. Effect of water temperature on gut transit time, digestive enzyme activity and nutrient digestibility in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*). *Aquaculture*, 308, 145-151. doi: 10.1016/j.aquaculture.2010.07.036
- Moazzami, A.A., Andersson, R., Kamal-Eldin, A., 2011. Changes in the metabolic profile of rat liver after α -tocopherol deficiency as revealed by metabolomics analysis. *NMR Biomed.* 24, 499–505. doi:10.1002/nbm.1615
- Monteiro, L.B.B., Soares, M.D.C., Catanho, M.T.J., Honczaryk, A., 2010. Aspectos reprodutivos e perfil hormonal dos esteroides sexuais do pirarucu, *Arapaima gigas* (SCHINZ,1822), em condições de cativeiro. *Acta Amaz.* 40, 435–449. doi:10.1590/S0044-59672010000300004
- Mori, H., Nakagawa, M., Soyano, K., Koya, Y., 2003. Annual reproductive cycle of black rockfish *Sebastes schlegeli* in captivity. *Fish Sci.* 69, 910–923. doi:10.1046/j.1444-2906.2003.00707.x
- Munakata, A., Kobayashi, M., 2010. Endocrine control of sexual behavior in teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 456–468. doi:10.1016/j.ygcen.2009.04.011
- Mylonas, C.C., Fostier, A., Zanuy, S., 2010. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 516–534. doi:10.1016/j.ygcen.2009.03.007
- Nam, K.H., Kim, Y.J., Moon, Y.S., Pack, I.S., Kim, C.G., 2017. Salinity affects metabolomic profiles of different trophic levels in a food chain. *Sci. Total Environ.* 599-600, 198–206. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.05.003
- Nowosad, J., Targońska, K., Chwaluczyk, R., Kaszubowski, R., Kucharczyk, D., 2014. Effect of temperature on the effectiveness of artificial reproduction of dace [Cyprinidae (*Leuciscus leuciscus* (L.))] under laboratory and field conditions. *J. Therm. Biol.* 45, 62–68. doi:10.1016/j.jtherbio.2014.07.011
- Oliveira, R.F., Almada, V.A.C., Gil, M.G.F., 1993. The reproductive behavior of the longspine snipefish, *Macrorhamphosus scolopax* (Syngnathiformes, Macrorhamphosidae). *Environ. Biol. Fishes* 36, 337–343. doi:10.1007/BF00012410
- Olsen, A.I., Attramadal, Y., Reitan, K.I., Olsen, Y. 2000. Food selection and digestion characteristic of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) larvae fed cultivated prey organisms. *Aquaculture*, 181, 293-310. doi: 10.1016/S0044-8486(99)00230-6

- Pankhurst, N.W., Purser, G.J., Van Der Kraak, G., Thomas, P.M.; Forteach, G.N.R. 1996. Effect of holding temperature on ovulation, egg fertility, plasma levels of reproductive hormones and in vitro ovarian steroidogenesis in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 146, 277-290. doi:10.1016/S0044-8486(96)01374-9
- Parma, L., Bonaldo, A., Massi, P., Yúfera, M., Martínez-Rodríguez, G., Gatta, P.P., 2013. Different early weaning protocols in common sole (*Solea solea* L.) larvae: Implications on the performances and molecular ontogeny of digestive enzyme precursors. *Aquaculture* 414-415, 26–35. doi:10.1016/j.aquaculture.2013.07.043
- Pedreira, M.M., Luz, R.K., Santos, J.C.E., Sampaio, E.V., Silva, R.S.F., 2009. Biofiltração da água e tipos de substrato na larvicultura do pacamã. *Pesqui. Agropec. Bras.* 44, 511–518. doi:10.1590/S0100-204X2009000500011
- Pedreira, M.M., Santos, J.C.E., Sampaio, E.V., Ferreira, F.N., Silva, J.D.L., 2008. Efeito do tamanho da presa e do acréscimo de ração na larvicultura de pacamã. *Rev. Bras. Zootec.* 37, 1144–1150. doi:10.1590/S1516-35982008000700002
- Pedreira, M.M., Sipaúba-Tavares, L.H., 2002. Effect of preyslection and ration addition on the rearing of piracanjuba larvae, *Brycon orbignyanus*. *B. Lab. Hidro.* 14-15, 99-109.
- Pittman, K., Yúfera, M., Pavlidis, M., Geffen, A.J., Koven, W., Ribeiro, L., Zambonino-Infante, J.L., Tandler, A., 2013. Fantastically plastic: fish larvae equipped for a new world. *Rev. Aquac.* 5, S224–S267. doi:10.1111/raq.12034
- Prathomya, P., Prisingkorn, W., Jakovlić, I., Deng, F.Y., Zhao, Y.H., Wang, W.M., 2017. 1H NMR-based metabolomics approach reveals metabolic alterations in response to dietary imbalances in *Megalobrama amblycephala*. *Metabolomics* 13, 17. doi:10.1007/s11306-016-1158-7
- Ramallo, M.R., Morandini, L., Alonso, F., Birba, A., Tubert, C., Fiszbein, A., Pandolfi, M., 2014. The endocrine regulation of cichlids social and reproductive behavior through the eyes of the chanchita, *Cichlasoma dimerus* (Percomorpha; Cichlidae). *J. Physiol.* 108, 194–202. doi:10.1016/j.jphysparis.2014.08.004
- Rosenblum, E.S., Viant, M.R., Braid, B.M., Moore, J.D., Friedman, C.S., Tjeerdema, R.S., 2005. Characterizing the metabolic actions of natural stresses in the California red abalone, *Haliotis rufescens* using 1H NMR metabolomics. *Metabolomics* 1, 199–209. doi:10.1007/s11306-005-4428-3

- Salaro, A.L., Junior, J.C.O., Lima, F.W., Ferraz, R.B., Pontes, M.D., Campelo, D.V., Zuanon, J. a S., Luz, R.K., 2015. Gelatin in replacement of bovine heart in feed training of *Lophiosilurus alexandri* in different water salinities. *An. Acad. Bras. Cienc.* 87, 2281–2287. doi:10.1590/0001-3765201520140575
- Sanches, E.A., Neumann, G., Baggio, D.M., Bombardelli, R.A., Piana, P.A., Romagosa, E., 2011. Time and temperature on the storage of oocytes from jundiá catfish, *Rhamdia quelen*. *Aquaculture* 319, 453–458. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.07.036
- Sant'Ana L., Melilo Filho R., Silva W.S., Mattioli C.C., Teixeira L.V. and Luz R.K., Aspectos sensoriais do pacamã: uma espécie promissora, 2017, Panorama da Aquicultura, (Ed 158).
- Santos, B.H., Sampaio, E.V., Arantes, F.P., Sato, Y., 2013. Induced spawning and reproductive variables of the catfish *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1876 (Siluriformes: Pseudopimelodidae). *Neotrop. Ichthyol.* 11, 607–614. doi: 10.1590/S1679-62252013000300014
- Santos, H.B., Thomé, R.G., Arantes, F.P., Sato, Y., Bazzoli, N., Rizzo, E., 2008. Ovarian follicular atresia is mediated by heterophagy, autophagy, and apoptosis in *Prochilodus argenteus* and *Leporinus taeniatus* (Teleostei: Characiformes). *Theriogenology* 70, 1449–1460. doi:10.1016/j.theriogenology.2008.06.091
- Santos, J.C.E., Correia, E.S., Luz, R.K., 2015. Effect of daily artemia nauplii concentrations during juvenile production of *Lophiosilurus alexandri*. *Bol. Inst. Pesca* 41, 771–776.
- Santos, J.C.E., Luz, R.K., 2009. Effect of salinity and prey concentrations on *Pseudoplatystoma corruscans*, *Prochilodus costatus* and *Lophiosilurus alexandri* larviculture. *Aquaculture* 287, 324–328. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.10.014
- Sarameh, S.P., Falahatkar, B., Azari Takami, G., Efatpanah, I., 2013. Physiological changes in male and female pikeperch *Sander lucioperca* (Linnaeus, 1758) subjected to different photoperiods and handling stress during the reproductive season. *Fish Physiol. Biochem.* 39, 1253–1266. doi:10.1007/s10695-013-9780-z
- Sato, Y. Reprodução de peixes da bacia do rio São Francisco: indução e caracterização de padrões, São Carlos: Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UFSCar, 1999. 179p. (Tese, Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais).

- Sato, Y., Verani, N.F., Pires, A., Godinho, H.P., Verani, J.R., 2003. Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais: Padrões reprodutivos de peixes da bacia do São Francisco.
- Savoie, A., Le François, N. R., Cahu, C., Blier, P. U. 2008. Metabolic and digestive enzyme activity profiles of newly hatched spotted wolffish (*Anarhichas minor*, Olafsen): effect of temperature. *Aquac. Res.* 39, 382-389. doi: 10.1111/j.1365-2109.2007.01797.x
- Selz, O.M., Pierotti, M.E.R., Maan, M.E., Schmid, C., Seehausen, O., 2014. Female preference for male color is necessary and sufficient for assortative mating in 2 cichlid sister species. *Behav. Ecol.* 25, 612–626. doi:10.1093/beheco/aru024
- Shen, G., Huang, Y., Dong, J., Wang, X., Cheng, K.-K., Feng, J., Xu, J., Ye, J., 2018. Metabolic effect of dietary taurine supplementation on Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) evaluated by NMR-based metabolomics. *J. Agric. Food Chem.* 66, 368–377. doi:10.1021/acs.jafc.7b03182
- Silva, M.J.S., Costa, F.F.B., Leme, F.P., Takata, R., Costa, D.C., Mattioli, C.C., Luz, R.K., Miranda-Filho, K.C., 2018. Biological responses of neotropical freshwater fish *Lophosilurus alexandri* exposed to ammonia and nitrite. *Sci. Total Environ.* 616-617, 1566–1575. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.10.157
- Silva, W.S., Cordeiro, N.I.S., Costa, D.C., Takata, R., Luz, R.K., 2014. Frequência alimentar e taxa de arraçoamento durante o condicionamento alimentar de juvenis de pacamã. *Pesqui. Agropec. Bras.* 49, 648-651. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2014000800009>
- Simões, J.M., Barata, E.N., Harris, R.M., O'Connell, L.A., Hofmann, H.A., Oliveira, R.F., 2015. Social odors conveying dominance and reproductive information induce rapid physiological and neuromolecular changes in a cichlid fish. *BMC Genomics* 16, 114. doi:10.1186/s12864-015-1255-4
- Soanes, K.H., Achenbach, J.C., Burton, I.W., Hui, J.P.M., Penny, S.L., Karakach, T.K., 2011. molecular characterization of zebrafish embryogenesis via DNA microarrays and multiplatform time course metabolomics studies. *J. Proteome Res.* 10, 5102–5117. doi:10.1021/pr2005549
- Souza, M.G., Seabra, A.G.L., Silva, L.C.R.; Santos, L.D., Balen, R.E., Meurer, F., 2013. Exigência de proteína bruta para juvenis de pacamã. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.* 14, 362-370.

- Souza, M.G., Seabra, A.G.L., Balen, R.E., Costa, M.M., Santos, L.D., Meurer, F., 2014. Avaliação da exigência de proteína bruta para alevinos de pacamã *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1876. Rev. Bras. Cienc. Agrar. 9, 264–268. doi:10.5039/agraria.v9i2a3092z
- Sun, L., Chen, H. 2009. Effects of ration and temperature on growth, fecal production, nitrogenous excretion and energy budget of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). Aquaculture, 292, 197-206. doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.04.041
- Takata, R., Silva, W.D.S.E., Costa, D.C., Melillo Filho, R., Luz, R.K., 2014. Effect of water temperature and prey concentrations on initial development of *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1876 (Siluriformes: Pseudopimelodidae), a freshwater fish. Neotrop. Ichthyol. 12, 853–859. doi:10.1590/1982-0224-20140063
- Targońska, K., Kupren, K., Żarski, D., Król, R., Kucharczyk, D., 2011. Influence of thermal conditions on successful ide (*Leuciscus idus* L.) artificial reproduction during spawning season. Ital. J. Anim. Sci. 10, e50. doi:10.4081/ijas.2011.e50
- Targońska, K., Żarski, D., Kupren, K., Palińska-żarska, K., Mamcarz, A., Kujawa, R., Skrzypczak, A., Furgala-Selezniow, G., Czarkowski, T.K., Hakuć-Błażowska, A., Kucharczyk, D., 2014. Influence of temperature during four following spawning seasons on the spawning effectiveness of common bream, *Abramis brama* (L.) under natural and controlled conditions. J. Therm. Biol. 39, 17–23. doi:10.1016/j.jtherbio.2013.11.005
- Tavares-Dias, M., Bozzo, F.R., Ferreira, E., Sandrin, S., 2004. Células sangüíneas, eletrólitos séricos, relação hepato e esplenossomática de carpa-comum, *Cyprinus carpio* (Cyprinidae) na primeira maturação gonadal. Acta Sci. - Biol. Sci. 26, 73–80.
- Teresa, F.B., Freitas, E.G., 2011. Reproductive behavior and parental roles of the cichlid fish *Laetacara araguaiaae*. Neotrop. Ichthyol. 9, 355–362. doi:10.1590/S1679-62252011005000018
- Thomé, R.G., Domingos, F.F.T., Santos, H.B., Martinelli, P.M., Sato, Y., Rizzo, E., Bazzoli, N., 2012. Apoptosis, cell proliferation and vitellogenesis during the folliculogenesis and follicular growth in teleost fish. Tissue Cell 44, 54–62. doi:10.1016/j.tice.2011.11.002
- Torres, I.F.A., Júlio, G.S.D.C., Figueiredo, L.G., Lima, N.L.C., Soares, A.P.N., Luz, R.K., 2017. Larviculture of a carnivorous freshwater catfish, *Lophiosilurus alexandri*,

- screened by personality type. *Behav. Processes* 145, 44–47. doi:10.1016/j.beproc.2017.09.001
- Tubert, C., Nostro, F.L., Villafañe, V., Pandolfi, M., 2012. Aggressive behavior and reproductive physiology in females of the social cichlid fish *Cichlasoma dimerus*. *Physiol. Behav.* 106, 193–200. doi:10.1016/j.physbeh.2012.02.002
- Turner, M.A., Viant, M.R., Teh, S.J., Johnson, M.L., 2007. Developmental rates, structural asymmetry, and metabolic fingerprints of steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs incubated at two temperatures. *Fish Physiol. Biochem.* 33, 59–72. doi:10.1007/s10695-006-9117-2
- Unuma, T., Sawaguchi, S., Hasegawa, N., Tsuda, N., Tanaka, T., Nomura, K., Tanaka, H., 2012. Optimum temperature of rearing water during artificial induction of ovulation in *Japanese eel*. *Aquaculture* 358-359, 216–223. doi:10.1016/j.aquaculture.2012.07.004
- Utoh, T., Horie, N., Okamura, A., Mikawa, N., Yamada, Y., Tanaka, S., Oka, H.P., Tsukamoto, K., 2013. Water temperature manipulation can induce oocyte maturation and ovulation in the common japanese conger, *Conger myriaster*. *Aquaculture* 392-395, 120–127. doi:10.1016/j.aquaculture.2013.02.007
- Valenzuela, A.E., Silva, V.M., Klempau, A.E., 2006. Qualitative and quantitative effects of constant light photoperiod on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) peripheral blood erythrocytes. *Aquaculture* 251, 596–602. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.06.012
- Vasconcelos, R.O., Carrico, R., Ramos, A., Modesto, T., Fonseca, P.J., Amorim, M.C.P., 2012. Vocal behavior predicts reproductive success in a teleost fish. *Behav. Ecol.* 23, 375–383. doi:10.1093/beheco/arr199
- Viant, M.R., 2009. Applications of metabolomics to the environmental sciences. *Metabolomics* 5, 1–2. doi:10.1007/s11306-009-0157-3
- Viant, M.R., Bundy, J.G., Pincetich, C.A., Ropp, J.S., Tjeerdema, R.S., 2005. NMR-derived developmental metabolic trajectories: an approach for visualizing the toxic actions of trichloroethylene during embryogenesis. *Metabolomics* 1, 149–158. doi:10.1007/s11306-005-4429-2
- Viveiros, A.T.M., Gonçalves, A.C.S., Chiacchio, I.M., Nascimento, A.F., Romagosa, E., Leal, M.C., 2015. Gamete quality of streaked prochilod *Prochilodus lineatus* (Characiformes) after GnRH α and dopamine antagonist treatment. *Zygote* 23, 212–221. doi:10.1017/S0967199413000440

- Wagner, L., Trattner, S., Pickova, J., Gómez-Requeni, P., Moazzami, A.A., 2014. ¹H NMR-based metabolomics studies on the effect of sesamin in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Food Chem. 147, 98–105. doi:10.1016/j.foodchem.2013.09.128
- Wei, Y., Liang, M., Mai, K., Zheng, K., Xu, H., 2017. The effect of ultrafiltered fish protein hydrolysate levels on the liver and muscle metabolic profile of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) by ¹H NMR-based metabolomics studies. Aquac. Res. 48, 3515–3527. doi:10.1111/are.13178
- Wu, H., Southam, A.D., Hines, A., Viant, M.R., 2008. High-throughput tissue extraction protocol for NMR- and MS-based metabolomics. Anal. Biochem. 372, 204–212. doi:10.1016/j.ab.2007.10.002
- Wu, J., Chan, R., Wenk, M.R., Hew, C.-L., 2010. Lipidomic study of intracellular *Singapore grouper iridovirus*. Virology 399, 248–256. doi:10.1016/j.virol.2010.01.016
- Xu, F., Tavintharan, S., Sum, C.F., Woon, K., Lim, S.C., Ong, C.N., 2013. Metabolic signature shift in type 2 diabetes mellitus revealed by mass spectrometry-based metabolomics. J. Clin. Endocrinol. Metab. 98, 1060–1065. doi:10.1210/jc.2012-4132
- York, R.A., Patil, C., Hulsey, C.D., Streelman, J.T., Fernald, R.D., 2015. Evolution of bower building in Lake Malawi cichlid fish: phylogeny, morphology, and behavior. Front. Ecol. Evol. 3, 1–13. doi:10.3389/fevo.2015.00018
- Yufera, M., Sarasquete, M.C., Fernandez-Diaz, C., 1996. Testing protein-walled microcapsules for the rearing of first-feeding gilthead sea bream *Sparus aurata* L. larvae. Mar. Freshw. Res. 47, 211–216. doi: 10.1071/MF9960211
- Zohar, Y., Muñoz-Cueto, J.A., Elizur, A., Kah, O., 2010. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. Gen. Comp. Endocrinol. 165, 438–455. doi:10.1016/j.ygcen.2009.04.017
- Zohar, Y., Mylonas, C.C., 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. Aquaculture 197, 99–136. doi:10.1016/S0044-8486(01)00584-1

**ARTIGO 1: TEMPERATURE-INDUCED CHANGES IN REPRODUCTIVE
VARIABLES IN THE TELEOST FISH *Lophiosilurus alexandri***

Abstract - The present study evaluates whether increased water temperature induces reproduction by *Lophiosilurus alexandri* under controlled conditions, and investigates the effects of this procedure on sexual steroids, hematological profile and behavior. A 44-week experiment was performed with four wild males and 12 wild females that had been acclimatized to captive conditions. Water temperature was maintained at 24.4 ± 1.0 °C for weeks 1 to 22, and then at 29.0 ± 1.1 °C for weeks 22 to 44. Spawn weight, number of eggs/spawn and hatching rate were satisfactory and ranged 27.5–127.5g, 1209–5183 and 83–89%, respectively. Hematocrit, leukocytes and glucose were not influenced by increased water temperature, while higher values for erythrocytes were observed for both sexes. The lowest value for plasma protein was for females maintained at 29.0 °C, while the lowest value for testosterone was obtained at the end of the study period at a temperature in 29.0 °C. Serum values of 17 β -estradiol were higher in females than in males, however, there was no evidence of variation as a function of experimental temperature or interaction with sex. The reproductive behavior of *L. alexandri* in captivity is described for the first time. The present study demonstrates that adult individuals are able to maintain a stable hematological profile during an increase in mean water temperature from 24.4 °C to 29.0 °C, even during the reproductive period, and still produce good quality larvae. Nonetheless, whether spawning was associated with increased 17 β -estradiol levels could not be determined.

Keywords: Native species; Stress resistance; Rio São Francisco; Siluriformes; Larval viability.

1. Introduction

Among the environmental factors that regulate the reproductive cycle of teleost fish, temperature is most important for controlling physiological and hormonal changes during reproduction (Hermelink et al., 2013; Levy et al., 2011; Nowosad et al., 2014; Unuma et al., 2012). Reproductive dysfunctions occur at different levels of response under adverse temperatures, and include deleterious effects on vitellogenesis, ovulation, egg production and fertility (Pankhurst et al., 1996; King and Pankhurst, 1999; Davies and Bromage, 2001). This is due the fact that fish development is restricted to a particular temperature range (King et al., 2003), as observed in a study with *Prochilodus argenteus*, in which water at 23 °C reduced the number of ovulated females by 33%, compared to water at 26 °C, with 26% of female vitellogenic oocytes not completing or even beginning maturation (Arantes et al., 2011).

Low levels of 17 β -estradiol and testosterone are known to be related to fewer females reaching the final stage of egg maturation and low larval and sperm viability after experiencing water temperatures outside the range of thermal comfort for various species (Arantes et al., 2010; Hermelink et al., 2013, 2011; Mazzeo et al., 2014; Melo et al., 2016; Nowosad et al., 2014). The hematological and plasma biochemistry of broodstock can also be influenced water temperature (Kavadias et al., 2004; Tavares-Dias et al., 2004; Valenzuela et al., 2008; Matsche and Gibbons, 2012). Increased glycemia during the reproductive period was found associated with increased energy demand at the beginning of reproductive activity induced by elevated water temperature for *Dicentrarchus labrax* (Kavadias et al., 2004) and *Acipenser brevirostrum* (Matsche and Gibbons, 2012). Plasma protein has also been found to change under the influence of temperature, such as the reduction found for *Cyprinus carpio* in a controlled environment (Tavares-Dias et al., 2004). Likewise, leukocytes of *Oncorhynchus mykiss* (Valenzuela et al., 2008) and erythrocytes of *D. labrax* (Kavadias et al., 2004), were found negatively affected by conditions outside the thermal breeding range of broodstock. Knowledge of the effects of altered water temperature in captive conditions has been essential for improving breeding protocols for various species of teleost fish, and has enabled spawning throughout the year (Hermelink et al., 2013; Kucharczyk et al., 2008; Mazzeo et al., 2014; Nowosad et al., 2014; Utoh et al., 2013). Therefore, to maximize reproductive potential, it is of paramount importance to understand the reproductive responses of understudied species, such as *Lophiosilurus alexandri*, to increased water temperatures under controlled conditions.

L. alexandri is a carnivorous siluriforme endemic to the Rio São Francisco Basin. The species has high market potential due lacking intramuscular spines and having a taste with great culinary appeal (Sant'Ana et al., 2017). Not only does the species have potential for pisciculture in Brazil (Campeche et al., 2011), it has also attracted the interest of aquarists due to its exotic appearance (Santos and Luz, 2009). *Lophiosilurus alexandri* is on the list of animals vulnerable to extinction (ICMBio, 2016), and so studies on its reproductive biology would make valuable contributions to the conservation of its natural stocks. Spawning of *L. alexandri* is batch (Barros et al., 2007; Melo et al., 2011), and the nest is constructed on sandy substrate, with the male providing parental care (Costa et al., 2015; Sato et al., 2003). In nature, the reproductive period occurs between November and February, which is the rainiest and hottest period for the Rio São Francisco Basin, and when the mean water temperature reaches 28 °C (Sato et al., 2003). Wild *L. alexandri*, captured and acclimatized to conditions of cultivation, can achieve reproduction 30-days after an increase in water temperature from 26 °C to 28 °C (Costa et al., 2015). Despite its importance, information on sexual steroids, hematological profile, and reproductive behavior of *L. alexandri* is still scarce in the literature. Thus, the present study evaluated whether increased water temperature induces reproduction in *L. alexandri* under controlled conditions, and investigated the effects of this procedure on sexual steroids, hematological profile and behavior.

2. Material and Methods

The experiment was conducted at the Aquaculture Laboratory (Laqua) of the Veterinary School of the Federal University of Minas Gerais (UFMG). All procedures were approved by the Ethics Committee of UFMG (Protocol: 25/2010).

Four adult male and 12 adult female *L. alexandri* were captured in a natural environment and acclimatized to culture conditions for study (Costa et al., 2015). Individual sex was determined by cannulation of the genital papilla (Melillo Filho et al., 2016), which was followed by the implantation of a microchip. The weight of broodstock was measured using a scale with 0.5-g precision. The mean weight of males was 3.84 ± 1.2 kg and of females 3.50 ± 1.1 kg. The broodstock was kept in four 5-m³ circular tanks with 2 to 2.5 m³ of useful volume (one male and three females per tank), with a sand substrate, controlled temperature and a diffuser to maintain dissolved oxygen above 5 mg/L. Feeding was

performed once a week with frozen eviscerated tilapia without the head, which was provided at 2% of biomass.

The experimental period lasted 44 weeks. During weeks 1 to 22, corresponding to the period of January to May, the water temperature was maintained at 24.4 ± 1.0 °C; from week 22 to 44, corresponding to the period between June and November, the water temperature was maintained at 29.0 ± 1.1 °C. The water was heated gradually over the course of one week using an 800-w electrical resistor.

2.1.Reproduction and egg and larval viability

After the increase in water temperature, the breeding tanks were assessed daily for the occurrence of spawning. When spawning was confirmed by the presence of a nest and parental care (Costa et al., 2015), the fish that was positioned on the eggs was identified using a microchip reader. The eggs were collected using a dip net and transferred to an incubation system. This system consisted of a box with a useful volume of 150 L, a 100-w heater with a thermostat, aeration and an internal biological filter with a volume of 5 L coupled to a submerged water pump with an average flow rate of 160 L/h. The eggs were incubated in a 25-cm diameter sieve (0.5 mm mesh) fixed to floats. The larvae remained in this system until seven days post-hatching.

During weeks 1 to 22, the temperature (mercury bulb thermometer), pH (Hanna HI98129 digital phagometer) and dissolved oxygen (Hanna HI9146 oximeter) averaged 24.4 ± 1.0 °C, 7.0 ± 0.72 , 7.3 ± 0.4 mg/L, respectively, while during weeks 22 to 44, they averaged 29.0 ± 1.1 °C, 7.8 ± 0.6 and 6.6 ± 0.5 . Temperature was measured daily for all tanks, while pH and dissolved oxygen were measured weekly. Temperature, pH, dissolved oxygen and total ammonia ($\text{NH}_3 + \text{NH}_4$) of the larval incubation and maintenance system were measured daily. Total ammonia was measured using an Alcon® commercial kit. The mean values for the water quality parameters in the incubation system were: temperature 27.8 ± 0.3 °C, pH 7.5 ± 0.9 , dissolved oxygen 7.2 ± 0.3 mg/L and total ammonia 0.28 ± 0.1 mg/L.

The following measurements were made after spawning: spawn weight (SW), egg weight (EW), number of eggs (NE), hatching rate (HR), weight of newly hatched larvae (LW 0 dph), larval weight eight days post hatching (PL 8 dph) and larval survival eight days post hatching. The weight of eggs and larvae were estimated using $n = 20$. Due to the small size and fragility of eggs and larvae, EW and LW 0 dph were weighed for groups of five

individuals and the mean calculated. As a function of the adhesiveness of the eggs, and the lack of a method to accurately estimate their number, the following formulas were adopted for calculating estimates:

NE = total number of larvae+number of eggs attacked by fungi

HR = (total number of larvae / total number of eggs) x 100

2.2.Blood collection and hematological analyses

Blood was collected from broodstock at week 22 (May) and week 44 (November). The fish were restrained using a damp cloth while collection was performed by venipuncture in the caudal with ventral access. About 2 mL of blood was collected, from which 0.5 mL was stored in Eppendorf tubes, filled with sodium heparin (10 % /mL of blood) as anticoagulant, intended for hematocrit, plasma protein, leukocyte, erythrocyte and glucose analyses. Each fish was considered a replicate.

Hematocrit values were determined from capillary tubes filled with approximately 2/3 of previously homogenized and centrifuged (10 min. at 10000 rpm) blood. The reading was performed on the appropriate card, matching the plasma meniscus with the top line of the ruler (line 100) and equating the lower end of the erythrocyte portion with the bottom line of the ruler (line 0), so that the result indicated the value of the line based on the microhematocrit technique validated by Goldenfarb et al. (1971). A Goldenberg optical refractometer was used to measure plasma protein. For erythrocyte and leukocyte counts, blood (10 μ L) was diluted in Dacie solution (1000 μ L) and the cells counted manually in a Neubauer chamber within 12-hours after blood collection. Plasmatic glucose was determined using a commercial COBAS.

An aliquot of about 1500 μ L of blood was collected without anticoagulant, centrifuged for 5 min (1000 rpm for 1 min and 3000 rpm for 4 min) for serum separation and then frozen at -80 °C for further analysis of steroids. Analyses of 17 β -estradiol and testosterone were performed by chemiluminescence using a DXI 800 Immunoassay System manufactured by Beckman Coulter.

2.3.Exposure tests with larvae

Two exposure tests were performed for each spawn following the methodology proposed by Luz et al. (2012); the first test with the newly hatched larvae and the second test

eight days post-hatching. Ten larvae per experimental unit were used with five replicates for each spawn for a total of 50 larvae. The larvae were collected from the incubator, transferred to a sieve (mesh diameter of 0.5 mm) and exposed to air. Blotting paper was used to remove excess moisture. After 30 minutes of air exposure, the larvae were transferred to a beaker with a useful volume of 500 mL and constant aeration, and maintained in a thermostat-controlled bath at 28 °C for another 24 hours. Survival was then determined by direct counts of the animals, and the rate of stress resistance determined.

2.4.Reproductive behavior

The frequency and duration of reproductive behaviors were recorded and evaluated during the last experimental week. Filming took place with lighted conditions for 24-hours using an internal circuit system (cameras and DVR). The filmed behaviors were coded through Solomon Coder Beta® software using the methods of focal sampling and continuous recording. During video analysis, males and females were identified by external characteristics such as color and body size. Only one of the combinations (tanks) experienced spawning during the study period. The duration of the reproductive behaviors of this male and female during the day of spawn were compared with the average durations of the behaviors of males and females in the other three tanks where no spawning occurred.

2.5.Statistical analysis

A split-plot (2x2) design was used. The main plot comprised sex (male and female) and subplot by mean water temperature (24.4 and 29.0 °C). Reproductive parameters were compared between tanks and for the unfolding of the interactions, using the Tukey test ($P < 0.05$). Stress resistance of larvae was compared among different ages using Student's t-test ($P < 0.05$). All data were tested for normality (Kolmogorov-Smirnov) and homogeneity of variances. Because data for duration and frequency of reproductive behavior were not normally distributed, comparisons were made using Kruskal-Wallis and Dunn tests ($P < 0.05$). Statistical analyses were performed using the software Assistat 7.7 (2017).

3. Results

3.1. Reproduction and egg and larval viability

The first spawn occurred in July in tank 1, 26 days after raising the mean water temperature to 29.0 °C (Table 1). The first spawns in tanks 3 and 4 occurred 32 and 34 days after the temperature increase, respectively. The mean intervals between spawns were 38, 29 and 16 days for tanks 1, 3, and 4, respectively. The shortest spawning interval was 12 days for tank 4 while the greatest was 43 days for tank 1. The month with the highest occurrence of spawning was August. Because reproduction occurred at night, and there was more than one female in each tank, it was not possible to determine if the recorded spawns were from the same female. Tank 2 experienced no reproduction during the entire experiment. Males on nests were observed to voluntarily fast on the day that spawning occurred.

Table 1. Frequency of *L. alexandri* spawns in four tanks during the period with a mean water temperature of 29.0 °C.

Month	Tank			
	1	2	3	4
June	-	-	-	-
July	1	-	1	1
August	3	-	1	3
September	1	-	-	-
October	2	-	-	3
November	-	-	-	1
Total	7	0	2	8

Mean values of spawn weight, egg weight, larval weight 0 dph, larval weight 8 dph, number of eggs/spawn, hatching rate and survival 8 dph were similar ($P>0.01$) among tanks (Table 2). Spawn weight ranged from 27.5 to 127.5g. The minimum and maximum number of eggs was 1209 and 5183, respectively. Hatching rate varied between 83 and 89%. Larval survival was equal to or greater than 95%. Larval stress resistance was higher ($P<0.05$) for 8 dph than for newly hatched larvae; however, stress resistance was similar ($P>0.05$) among spawns of the different tanks.

3.2. Hematological parameters and plasma glucose levels

Hematocrit, leukocytes and glucose (Table 3) did not vary according to sex, water temperature, or the interaction between these two factors ($P > 0.05$). The highest value for erythrocytes was obtained at the end of the period with the mean water temperature of 29.0 °C ($P < 0.01$), but there was no effect of sex or interaction ($P > 0.05$) between sex and temperature. Plasma protein was affected by the interaction between temperature and sex ($P < 0.01$). Lower plasma protein was recorded for females maintained at 29.0 °C than for females maintained at 24.4 °C (Table 4). There was no difference in plasma protein between males and females, or between males in the two temperature ranges.

Table 2. Means (\pm SD) for spawn weight, egg weight, larval weight 0 days post hatching (dph), larval weight 8 dph, number of eggs/spawn, hatching rate, survival 8 dph, and stress resistance (Re) for newly hatched larvae and larvae 8 days dph of *L. alexandri*.

Parameters	Tank			
	1	2	3	4
Spawn weight (g) ^{ns}	81.3 \pm 37.8a	-	90.9 \pm 21.5a	81.1 \pm 18.4a
Egg weight (mg) ^{ns}	18.2 \pm 1.7a	-	20.2 \pm 3.3a	17.6 \pm 6.1a
Larval weight 0 dph (mg) ^{ns}	8.5 \pm 0.3a	-	8.0 \pm 0.7a	8.4 \pm 0.14a
Larval weight 8 dph (mg) ^{ns}	20.6 \pm 2.0a	-	20.4 \pm 3.2a	19.8 \pm 0.3a
No. eggs/spawn ^{ns}	3021.2 \pm 1580.9a	-	3399.0 \pm 587.9a	2492.2 \pm 196a
Hatching rate (%) ^{ns}	83.1 \pm 12.4a	-	89.4 \pm 17.5a	87.1 \pm 2.7a
Survival 8 dph (%) ^{ns}	98.51.6a	-	95.3 \pm 1.4a	96.4 \pm 1.4a
Re 0 dph (%)	42.0 \pm 19.8Ba	-	50.0 \pm 32.0Ba	41.0 \pm 36.1Ba
Re 8 dph (%)	67.0 \pm 31.5Aa	-	83.0 \pm 10.6Aa	57.5 \pm 29.7Aa

Means in the same row followed by different lowercase differ significantly according to the Tukey test ($*P < 0.05$). ns = not significant

Means in the same column followed by different capital letters differ significantly according to the Student's t-test ($P < 0.05$).

3.3. Reproductive steroids

Increased water temperature influenced serum testosterone levels ($P < 0.01$), but without an effect of sex or interaction (Table 5). The lowest value for testosterone was

obtained after the period of 22 weeks with the mean water temperature at 29.0 °C. Serum values for 17 β -estradiol were higher in females than in males ($P < 0.05$), however, there was no evidence ($P > 0.05$) of variation as a function of water temperature or the interaction between factors.

Table 3. F-values and means (\pm SD) for hematocrit, plasma protein, leukocytes, erythrocytes and glucose.

Statistics	F-value				
	Hematocrit (%)	Plasma protein g/dL	Leukocytes $\times 10^5/\mu\text{L}$	Erythrocytes $\times 10^5/\mu\text{L}$	Glucose mg/dL
Sex	0.10 ^{ns}	0.00 ^{ns}	0.50 ^{ns}	0.14 ^{ns}	0.25 ^{ns}
Temp.	0.51 ^{ns}	2.75 ^{ns}	0.92 ^{ns}	17.61 ^{**}	3.33 ^{ns}
Sex X Temp.	0.81 ^{ns}	18.75 ^{**}	1.89 ^{ns}	0.41 ^{ns}	3.14 ^{ns}
Means of the Sexes					
Females	20.73 \pm 3.93a	6.51 \pm 0.47a	5.54 \pm 2.67a	5.71 \pm 2.12a	4.53 \pm 3.29a
Males	19.88 \pm 4.12a	6.48 \pm 0.89a	7.41 \pm 4.70a	5.46 \pm 1.79a	3.47 \pm 4.40a
Means of the Temperature Period					
24.4 °C	20.79 \pm 3.97a	6.55 \pm 0.73a	7.82 \pm 7.06a	4.17 \pm 0.84b	2.67 \pm 3.30a
29.0 °C	19.81 \pm 4.12a	6.44 \pm 0.69a	5.12 \pm 3.30a	7.00 \pm 1.57a	5.33 \pm 3.97a

Means in the same column followed by different letters differ significantly (** $P < 0.01$). ns = not significant.

Table 4. Deviation of the interactions (\pm SD) for plasma protein (g/dL).

Sex	Temperature Period	
	24.4 °C	29.0 °C
Females	6.73 \pm 0.60aA	6.29 \pm 0.18aB
Males	6.37 \pm 0.46aA	6.58 \pm 0.28aA

Means in the same column followed by different lowercase letters, and means in the same row followed by different upper case letters, differ significantly.

3.4. Reproductive behavior

The recorded behaviors were grouped into four behavioral categories: inactivity, locomotion, courtship behavior and reproductive behavior. The description of these behavioral categories and what they entail are provided in Table 6. In the tanks where there was no spawning (during filming), the fish spent most of their time sitting on the bottom of the tank or buried in the sand (Figure 1); two individuals remained buried in the sand for up to

seven hours. This burying behavior was not observed for the spawning pair on the day of spawn. The behaviors “pursuit without bite”, “pursuit with bite”, “lateral side position”, “posture and fertilization of eggs” were observed only for the spawning male and female on the day of spawning. “Parental care” was performed only by the male of the spawning pair. “Swim to the bottom” and “overlay” behaviors were exhibited by animals of both sexes, including the non-spawning animals, but with a longer duration for females than males ($P < 0.05$).

Table 5. F-values and means (\pm SD) for testosterone and 17 β -estradiol.

Statistic	F-value	
	Testosterone (ng/dL)	17 β -estradiol (pg/mL)
Sex	0.20 ^{ns}	6.36*
Temp.	38.55**	1.95 ^{ns}
Sex X Temp.	2.38 ^{ns}	0.96 ^{ns}
Mean of the Sexes		
Females	269.46 \pm 121.91a	685.87 \pm 236.78a
Males	291.50 \pm 146.21a	299.62 \pm 386.52b
Means of the Temperature Period		
24.4 °C	381.17 \pm 83.39a	577.58 \pm 373.20a
29.0 °C	179.79 \pm 79.92b	407.92 \pm 367.39a

Means in the columns followed by different letters differ significantly * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$). ns = not significant.

The manifestation of reproductive behavior began with an increase in active swimming at the bottom of the tank by both the male and female, at around 16:00 hours. The female and male then started exhibiting the behaviors of “lateral side position” and “posture and fertilization of eggs” (Figure 2A), the duration of which increased gradually until the end of spawning, which occurred ten hours later. “Overlay” behavior was exhibited by both the male and female during the nine hours prior to spawning (from 16:30 h to 01:30 h). “Overlay” was initiated by, and had a longer duration for, the female ($P < 0.05$). The peak duration of “overlay” for the female occurred during the last three hours prior to spawning. Increase in the duration of “overlay” was associated with the peak of spawning; it subsequently decreased at the end of egg deposition. No “overlay” between individuals was observed after spawning.

Oocytes were deposited and fertilized on the bottom of the tank in a depression in the sand. The choice of spawning site occurred at 17:00 hours, as indicated by the male and

female staying in a specific area of the tank. The formation of the nest was initiated after 23:00 hours by circular movements of the male and female on the sand. After spawning, the female moved away from the male and remained sitting on the sand more than three body-lengths away from him. The male remained on the eggs for the next eleven hours, constantly moving its pectoral fins and rotating its body on its axis (Figure 2B).

Table 6. Description of the behaviors observed for *L. alexandri*.

Behavior	Description
Inactivity	
Sitting on the sand	The fish in a stationary position with the ventral region resting on the sand, while moving the operculum or mouth.
Buried in the sand	The fish is partially or totally buried.
Locomotion	
Burying movement	The fish moves back and forth in a small area removing sand by moving the ventral region and caudal fin, ultimately covering its body with sand by moving the pectoral fins.
Short locomotion	The fish moves from one point to another for a period of less than three seconds, moving its body by a distance of less than one-half a body-length.
Swim to the bottom	The fish moves from one point to another for more than three seconds, through movements of the caudal fin; the ventral region remains within $\frac{1}{4}$ of a body-length from the bottom of the tank. The fish may pass over another fish that is sitting on the sand.
Swim at the side of the tank	The fish moves along the side of the tank, at up to $\frac{1}{4}$ of a body-length away from it, through movements of the caudal fin, which can reach the region of the water-air interface with the body oriented horizontally.
Swim vertically	The fish moves upward along the side of the tank at up to one-half a body-length away from it, through movements of the caudal fin, reaching the region of the water-air interface and moving to the right or left, but with the body oriented vertically.
Courtship behavior	
Pursuit without bite	The fish moves toward another fish, which is also in motion, chasing it by moving the caudal fin for more than four seconds. There is no physical contact.
Pursuit with bite	The fish moves toward another fish, which is also in motion, chasing it by moving the caudal fin for more than four seconds, and biting any region of the body of the other fish.
Bite	The fish bites another fish without moving.
Confrontation	The fish remains positioned in front of another fish, half of a body-length away, biting and moving the caudal fin.
Flight	The fish moves away in response to a chase by another fish by moving its caudal fin.
Overlay	The fish positions itself over another fish and remains there for more than two seconds.
Reproductive behavior	
Lateral side position	The fish remains sitting in lateral physical contact with another fish while facing the opposite position (heads pointed in opposite directions).
Posture and fertilization of eggs	Male and female remain on the nest, with head and fins directed in opposite directions while moving in a circular manner.
Parental care	The fish remains alone on the eggs, constantly moving the pectoral fins and moving in a circle turning its body on its axis.

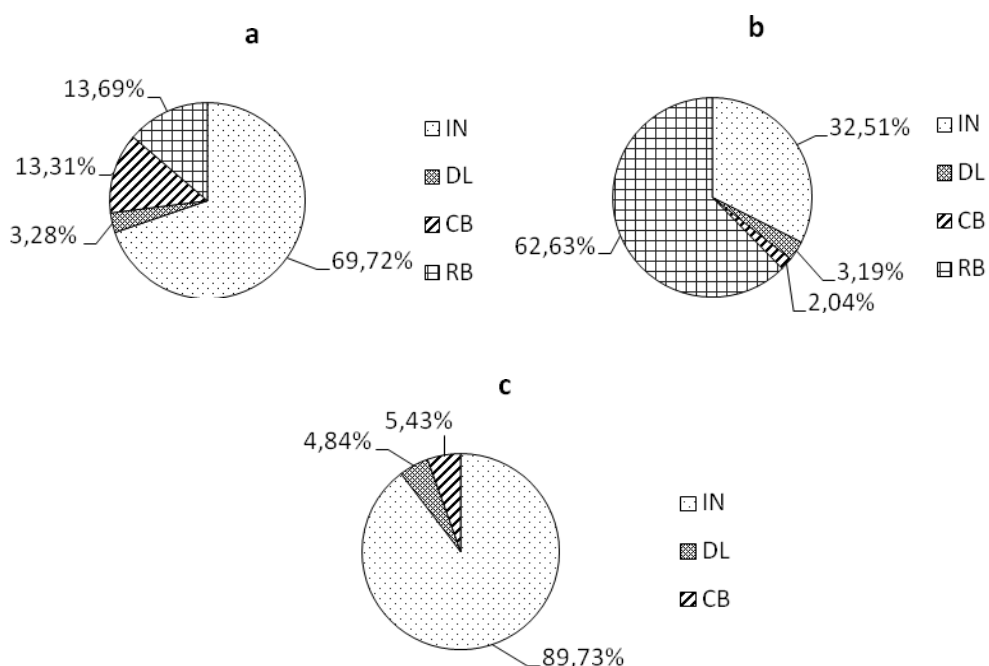


Figure 1. Proportion of behaviors — Inactivity (IN), Locomotion (DL), Courting Behavior (CB) and Reproductive Behavior (RB) — exhibited by the breeding female (a) and male (b) on the night of spawning, and by the non-spawning individuals (c) of *Lophiosilurus alexandri* during the 24 hours of observation.



Figure 2. (A) Male (bottom) and female (top) on the nest prior to spawning. Note their lateral opposite position. (B) Male on eggs in the nest during parental care.

The greatest frequency of bites was performed by the male prior to spawning ($P < 0.05$) (Figure 3). During this period, bites by the male were directed at the spawning female. Non-

spawning individuals and the spawning female did not exhibit biting behavior post-spawn. All bites performed by the male after spawning occurred on individuals other than the spawned female.

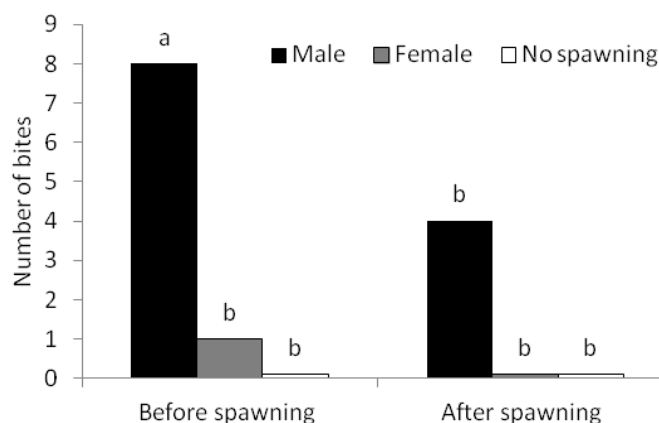


Figure 3. Frequency of biting behavior pre- and post-spawning for the female and male spawning fish and the non-spawning fish of *Lophiosilurus alexandri* during the 24 hours of observation. Bars with different letters represent significant differences ($P < 0.05$).

Discussion

The present study found that increasing the water temperature from 24.4 °C to 29.0 °C stimulated reproduction of *L. alexandri* under controlled conditions with a satisfactory response of larval viability. Fish started exhibiting reproductive behaviors late in the afternoon, with spawning occurring at night. There was no evidence of variation in serum values of 17 β -estradiol as a function of increased water temperature, but there was a decrease in testosterone. Furthermore, adult *L. alexandri* were able to maintain stable hematological levels and glucose responses in this temperature range even during the reproductive period.

In this experiment, the *L. alexandri* broodstock reproduced in a period that did not coincide with the natural breeding period of this species. Reproduction for the species in nature occurs during the hottest and rainiest months of the year (November to February, mean = 28 °C) (Sato et al. 2003). The advance of the reproductive period of *L. alexandri* by four months in controlled conditions was made possible by increasing the water temperature; the first spawn occurred 26 days after the increase. These data confirm the hypothesis that temperature is one of the main factors controlling the reproductive cycle of *L. alexandri*. Costa et al. (2015) found natural reproduction of *L. alexandri* maintained for 20 weeks at 26

°C, to be possible 30 days after increasing the water temperature to 28° C. The most satisfactory results obtained for female *Sander lucioperca* at final maturation was when they were habituated at 12 °C for 12 weeks, followed by an increase and maintenance of the temperature at 14 °C for eight weeks (Hermelink et al., 2013). Maintaining a water temperature of 6 °C was found to be necessary for stimulating initial gonadal maintenance in *Conger myriaster*, with an increase in oocyte diameter from 300 µm to 600 µm; but oocytes with a diameter of 995 µm were obtained only 41 days after the water temperature was raised to 10 °C (Utoh et al., 2013). Final maturation was obtained for *A. anguilla* that were kept for six weeks at 10 °C, followed by an increase to 15 °C (Mazzeo et al., 2014). These studies indicate that the ideal temperature for breeding is species-specific.

The lowest value for testosterone in the present study was obtained after the period of 22 weeks with the mean water temperature at 29.0 °C. This was probably related to it being at the end of the reproductive period, since the largest numbers of spawns were recorded in the months of August and October. Studies on the reproduction of other fish species found the highest values for this steroid during the maturation period, with reductions during the period of ovulation, and a post-ovulatory return to basal levels (Ammar et al., 2015; Arantes et al., 2011, 2010; Honji et al., 2013; Mazzeo et al., 2014; Mori et al., 2003; Pankhurst et al., 1996; Utoh et al., 2013). For example, testosterone levels of female *P. argenteus* varied markedly throughout the reproductive cycle, with the highest values (300 ng/dL) being recorded in the maturation period, when the temperature was 25 °C (Arantes et al., 2010). A modulating effect of temperature on steroid production during gonadal maturation was also reported for *A. anguilla*, where a constant temperature of 18 °C inhibited testosterone synthesis, whereas the highest value (800 ng/dL) was recorded for fish kept for six weeks at 10 °C followed by an increase to 15 °C (Mazzeo et al., 2014).

In females, testosterone acts primarily as a precursor of 17β-estradiol (Hermelink et al., 2011; Mazzeo et al., 2014), which is produced in follicular tissue under the control of hypophyseal gonadotropins, and stimulates the production of vitellogenin by the liver and, consequently, the deposition of vitellin granules in the oocyte (Ammar et al., 2015; Kazeto et al., 2011; Mori et al., 2003). Temperature influences the concentration of 17β-estradiol in broodstock of tropical species, such as *P. argenteus* (Arantes et al., 2011, 2010), as well as temperate species, such as *S. lucioperca* (Hermelink et al., 2013, 2011), *C. myriaster* (Utoh et al., 2013) and *A. anguilla* (Mazzeo et al., 2014). Although temperature determined the

reproductive period of *L. alexandri* in the present study, there was no evidence that spawning was associated with increased 17β -estradiol levels since these levels were the same even after the temperature was increased. This seemingly divergent result is probably due to the asynchronous gonadal maturation of *L. alexandri* (Barros et al., 2007; Melo et al., 2011), which is in contrast to the synchronous development of the previously mentioned fish species.

The results of the present study indicate that within the temperature range of 24.4 to 29° C, adult individuals of *L. alexandri* are able to maintain stable levels of hematocrit and glucose even during the reproductive period. Likewise, juveniles of the same species were found to exhibit no difference in these parameters within the temperature range of 23 to 29 °C (Costa et al., 2016). In contrast, higher erythrocyte values were observed for *L. alexandri* broodstock after the water temperature was increased. A reproductive function is the likely reason for this difference, since changes in hematological profile as a function of gonadal maturation have been previously reported (Fiszbein et al., 2010; Kavadias et al., 2004; Matsche and Gibbons, 2012; Sarameh et al., 2013; Valenzuela et al., 2006;2008). On the other hand, the number of leukocytes was not affected by the reproductive period in *L. alexandri*. As with other vertebrate groups, leukocytes are responsible for the nonspecific immune response in teleosts (Cerezuela et al., 2009; Clerton et al., 2001; Menezes et al., 2006; Shahkar et al., 2015). The lower value for plasma protein recorded for females maintained at 29.0 °C, compared to females maintained at 24.4 °C, suggests a possible deposition of essential proteins necessary for the formation of gametes in the period preceding reproduction, as reported by Tavares-Dias et al. (2004). In addition, plasma protein is an important indicator of the osmotic balance between extracellular and intracellular compartments (Machado and Duncan, 2017), and can be influenced by, among other factors, water temperature (Costa et al., 2016), mainly during the different reproductive phases throughout the year (Matsche and Gibbons, 2012). Males of *L. alexandri* were less sensitive, exhibiting less variation in this parameter as a function of temperature.

The reproductive success of the fish in tanks with spawning was satisfactory. For example, spawn weight, number of eggs/spawn and hatching rate ranged 27.5–127.5g; 1209–5183; and 83–89%, respectively, which are close to the values of 49–191g; 240–4600; and 95% recorded for this same species for natural breeding in captivity (Costa et al., 2015). These results show that increased temperature not only enables reproduction, but also the viable production of eggs and larvae of this species kept in the laboratory. This information is

highly relevant to reproduction since variation in water temperature outside the comfort range can cause thermal stress during gonadal maturation, which can result in disturbances to the reproductive cycle, poor quality eggs (Nowosad et al., 2014; Targońska et al., 2011, 2014; Unuma et al., 2012) and even follicular atresia (Pankhurst et al., 1996; Santos et al., 2008; Thomé et al., 2012). In addition, high mortality rates of embryos have also been reported at such temperatures (Kucharczyk et al., 2008; Sanches et al., 2011).

L. alexandri started exhibiting reproductive behaviors late in the afternoon, with spawning occurring at night. These results are in agreement with previously observations by Costa et al. (2016) and Sato et al. (2003). This nocturnal reproductive behavior — which makes direct observation difficult — is probably why it has remained undescribed until now (Costa et al., 2016). The observations of the present study were made possible by keeping lights on at all times while recording the event, which did not affect breeding. The great amount of swimming, biting and overlaying observed for the breeding pair in the hours prior to spawning suggests that these behaviors are part of the species' courtship repertoire. The high frequency of male bites recorded suggests that this behavior may act as further stimulus for the female to spawn, and may also be important for female selection of a male (Alonso et al., 2012; Araújo et al., 2014; Chellappa et al., 2014; Keller-Costa et al., 2014). Furthermore, the observed post-spawning biting of non-spawned females by the male may be related to parental care, as documented for *Pterophyllum scalare* (Cacho et al., 2007) and *Crenicichla menezesi* (Araújo et al., 2014). Parental care can increase offspring survival, especially for fish with low fecundity due to split spawning (Araújo et al., 2014; Cacho et al., 2007; Mattos et al., 2016; Selz et al., 2014). This first description of *L. alexandri* reproductive behavior, however, should be considered preliminary because it was based on one reproductive event. Nonetheless, it is relevant for captive reproduction since the behaviors described may serve as indicators of the moment of spawning, and as a guide to the behavioral needs for *L. alexandri* reproduction.

4. Conclusion

An increase of mean water temperature from 24.4 °C to 29.0 °C made it possible to advance the reproductive period of *L. alexandri* four months ahead of its natural period, with a satisfactory response for larval viability. We found no evidence that spawning was associated with increased 17 β -estradiol levels. In addition, hematological and glucose

responses indicate that, for this temperature range, adult *L. alexandri* are able to maintain stable levels even during the reproductive period. A great amount of reproductive behavior for *L. alexandri* was documented, some for first time, including courtship and parental care.

6. Acknowledgements

The present research was funded by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq 401117/2014-6 and PQ CNPq-305048/2015-5), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais).

8. References

- Alonso, F., Honji, R.M., Moreira, R.G., Pandolfi, M., 2012. Dominance hierarchies and social status ascent opportunity: anticipatory behavioral and physiological adjustments in a Neotropical cichlid fish. *Physiol. Behav.* 106, 612–618. doi:10.1016/j.physbeh.2012.04.003
- Ammar, I. Ben, Teletchea, F., Milla, S., Ndiaye, W.N., Ledoré, Y., Missaoui, H., Fontaine, P., 2015. Continuous lighting inhibits the onset of reproductive cycle in pikeperch males and females. *Fish Physiol. Biochem.* 41, 345–356. doi:10.1007/s10695-014-9987-7
- Arantes, F.P., Santos, H.B., Rizzo, E., Sato, Y., Bazzoli, N., 2011. Influence of water temperature on induced reproduction by hypophysation, sex steroids concentrations and final oocyte maturation of the “curimatã-pacu” *Prochilodus argenteus* (Pisces: Prochilodontidae). *Gen. Comp. Endocrinol.* 172, 400–408. doi:10.1016/j.ygcen.2011.04.007
- Arantes, F.P., Santos, H.B., Rizzo, E., Sato, Y., Bazzoli, N., 2010. Profiles of sex steroids, fecundity, and spawning of the curimatã-pacu *Prochilodus argenteus* in the São Francisco River, downstream from the Três Marias Dam, Southeastern. Brazil. *Anim. Reprod. Sci.* 118, 330–336. doi:10.1016/j.anireprosci.2009.07.004
- Araújo, A.S., Oliveira, J.C.S., Barros, N.H.C., Yamamoto, M.E., Chellappa, S., 2014. Dinâmica do comportamento territorial de *Crenicichla menezesi* (Osteichthyes: Perciformes: Cichlidae). *Biota Amaz.* 4, 37–44. doi:10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v4n1p37-44

- Barros, M.D.M., Guimarães-Cruz, R.J., Veloso-Júnior, V.C., Santos, J.E. Dos, 2007. Reproductive apparatus and gametogenesis of *Lophiosilurus alexandri* Steindachner (Pisces, Teleostei, Siluriformes). Rev. Bras. Zool. 24, 213–221. doi:10.1590/S0101-81752007000100028
- Cacho, M. do S.R.F., Chellappa, S., Yamamoto, M.E., 2007. Efeitos da experiência de machos no sucesso reprodutivo em acará bandeira, *Pterophyllum scalare* Lichtenstein, 1823 (Osteichthyes, Cichlidae). Rev. Bras. Zoociências 9, 41–47.
- Campeche, D.F.B., Balzana, L., Figueiredo, R.C.R., Barbalho, M.R.S., Reis, F.J.S., Melo, J.F.B., Peixes nativos do Rio São Francisco adaptados para cultivo, 2011, Embrapa.
- Cerezuela, R., Cuesta, A., Meseguer, J., Ángeles Esteban, M., 2009. Effects of dietary vitamin D3 administration on innate immune parameters of seabream (*Sparus aurata* L.). Fish Shellfish Immunol. 26, 243–248. doi:10.1016/j.fsi.2008.11.004
- Chellappa, S., Patrícia, A., Medeiros, T. De, 2014. Dynamics of territorial behaviour and gonad development in the hybrid red tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. mossambicus* (Osteichthyes : Cichlidae). Anim. Biol. J. 3, 5–19.
- Clerton, P., Troutaud, D., Verlhac, V., Gabaudan, J., Deschaux, P., 2001. Dietary vitamin E and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) phagocyte functions: effect on gut and on head kidney leucocytes. Fish Shellfish Immunol. 11, 1–13. doi:10.1006/fsim.2000.0287
- Costa, D.C., de Silva, W. S., Melillo Filho, R., Miranda Filho, K.C., Epaminondas dos Santos, J.C., Kennedy Luz, R., 2015. Capture, adaptation and artificial control of reproduction of *Lophiosilurus alexandri*: A carnivorous freshwater species. Anim. Reprod. Sci. 159, 148–154. doi:10.1016/j.anireprosci.2015.06.009
- Costa, D.P., Oliveira Paes Leme, F., Takata, R., Costa, D.C., Souza, S.W., Melillo Filho, R., Alves, G.M., Luz, R.K., 2016. Effects of temperature on growth, survival and physiological parameters in juveniles of *Lophiosilurus alexandri*, a carnivorous neotropical catfish. Aquac. Res. 47, 1706–1715. doi:10.1111/are.12594
- Davies, B., Bromage, N., 2002. The effects of fluctuating seasonal and constant water temperatures on the photoperiodic advancement of reproduction in female rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture 205, 183–200. doi: 10.1016/S0044-8486(01)00665-2
- Fiszbein, A., Cánepa, M., Vázquez, G.R., Maggese, C., Pandolfi, M., 2010. Photoperiodic modulation of reproductive physiology and behaviour in the cichlid fish *Cichlasoma dimerus*. Physiol. Behav. 99, 425–432. doi:10.1016/j.physbeh.2009.11.017

- Goldenfarb, P.B., Bowyer, F.P., Hall, E., Brosious, E., 1971. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determinations. *Am. J. Clin. Pathol.* 56, 35-39.
- Hermelink, B., Wuertz, S., Rennert, B., Kloas, W., Schulz, C., 2013. Temperature control of pikeperch (*Sander lucioperca*) maturation in recirculating aquaculture systems induction of puberty and course of gametogenesis. *Aquaculture* 400-401, 36-45. doi:10.1016/j.aquaculture.2013.02.026.
- Hermelink, B., Wuertz, S., Trubiroha, A., Rennert, B., Kloas, W., Schulz, C., 2011. Influence of temperature on puberty and maturation of pikeperch, *Sander lucioperca*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 172, 282-292. doi:10.1016/j.yggen.2011.03.013
- Honji, R.M., Nóbrega, R.H., Pandolfi, M., Shimizu, A., Borella, M.I., Moreira, R.G., 2013. Immunohistochemical study of pituitary cells in wild and captive *Salminus hilarii* (Characiformes: Characidae) females during the annual reproductive cycle. *Springerplus* 2, 460. doi:10.1186/2193-1801-2-460
- ICMbio, 2016. Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. Brasília.
- Kavadias, B.S., Dessypris, A., Miliou, H., 2004. Seasonal variation in steroid hormones and blood parameters in cage-farmed European sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*). *J. Appl. Ichthyol.* 20, 58-63.
- Kazeto, Y., Tosaka, R., Matsubara, H., Ijiri, S., Adachi, S., 2011. Ovarian steroidogenesis and the role of sex steroid hormones on ovarian growth and maturation of the Japanese eel. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 127, 149-154. doi:10.1016/j.jsbmb.2011.03.013
- Keller-Costa, T., Hubbard, P.C., Paetz, C., Nakamura, Y., da Silva, J.P., Rato, A., Barata, E.N., Schneider, B., Canario, A.V.M., 2014. Identity of a tilapia pheromone released by dominant males that primes females for reproduction. *Curr. Biol.* 24, 2130-2135. doi:10.1016/j.cub.2014.07.049
- King H.R., Pankhurst, N.W., Watts, M., Pankhurst, P.M. 2002. Effect of elevated summer temperatures on gonadal steroid production, vitellogenesis and egg quality in Tasmanian female Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). *J. Fish Physiol.* 63, 153-167. doi:10.1046/j.1095-8649.2003.00137.x
- King, H.R., Pankhurst, N.W., 1999. Ovulation of Tasmanian Atlantic salmon maintained at elevated temperatures: implications of climate change for sustainable industry

- development. Proceedings from 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish, July 4–9, 1999. University of Bergen, Bergen, Norway, pp. 396–398.
- Kucharczyk, D., Targońska, K., Hliwa, P., Gomułka, P., Kwiatkowski, M., Krejszeff, S., Perkowski, J., 2008. Reproductive parameters of common carp (*Cyprinus carpio*) spawners during natural season and out-of-season spawning. *Reprod. Biol.* 8, 285–289. doi:10.1016/S1642-431X(12)60018-7
- Levy, G., David, D., Degani, G., 2011. Effect of environmental temperature on growth- and reproduction-related hormones gene expression in the female blue gourami (*Trichogaster trichopterus*). *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 160, 381–389. doi:10.1016/j.cbpa.2011.07.007
- Luz, R.K., Adriane, P., Ribeiro, P., Ikeda, A.L., Eduardo, A., Santos, H., Filho, R.M., Turra, E.M., Alencar, E. De, 2012. Performance and stress resistance of Nile tilapias fed different crude protein levels. *Rev. Bras. Zootec.* 41, 457–461.
- Machado, R.N., Duncan, W.P., 2017. Composição química do plasma de peixes teleósteos de um lago de várzea na Amazônia. *ActaFish* 5, 42–47. doi:10.2312/ActaFish.2017.5.2.42-47
- Matsche, M.A., Gibbons, J., 2012. Annual variation of hematology and plasma chemistry in shortnose sturgeon, *Acipenser brevirostrum*, during a dam-impeded spawning run. *Fish Physiol. Biochem.* 38, 1679–1696. doi:10.1007/s10695-012-9664-7
- Mattos, D.D.C., Screnci-Ribeiro, R., Cardoso, L.D., Vazquez, M., Junior, V., 2016. Description of the reproductive behavior of *Symphysodon aequifasciatus* (Cichlidae) in captivity. *Acta Amaz.* 46, 433–438. doi:10.1590/1809-4392201600234
- Mazzeo, I., Peñaranda, D.S., Gallego, V., Baloché, S., Nourizadeh-Lillabadi, R., Tveiten, H., Dufour, S., Asturiano, J.F., Weltzien, F.-A., Pérez, L., 2014. Temperature modulates the progression of vitellogenesis in the *European eel*. *Aquaculture* 434, 38–47. doi:10.1016/j.aquaculture.2014.07.020
- Melillo Filho, R., Gheller, V.A., Chaves, G.V., de Souza e Silva, W., Costa, D.C., Figueiredo, L.G., da Costa Julio, G.S., Luz, R.K., 2016. Early sexing techniques in *Lophiosilurus alexandri* (Steindachner, 1876), a freshwater carnivorous catfish. *Theriogenology* 86, 1523–1529. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.05.011
- Melo, R.M.C., Arantes, F.P., Sato, Y., dos Santos, J.E., Rizzo, E., Bazzoli, N., 2011. Comparative morphology of the gonadal structure related to reproductive strategies in

- six species of neotropical catfishes (Teleostei: siluriformes). *J. Morphol.* 272, 525–535. doi:10.1002/jmor.10931
- Melo, R.M.C., Ribeiro, Y.M., Luz, R.K., Bazzoli, N., Rizzo, E., 2016. Influence of low temperature on structure and dynamics of spermatogenesis during culture of *Oreochromis niloticus*. *Anim. Reprod. Sci.* 172, 148–156. doi:10.1016/j.anireprosci.2016.07.013
- Menezes, G.C., Tavares-Dias, M., Ono, E.A., de Andrade, J.I.A., Brasil, E.M., Roubach, R., Urbinati, E.C., Marcon, J.L., Affonso, E.G., 2006. The influence of dietary vitamin C and E supplementation on the physiological response of pirarucu, *Arapaima gigas*, in net culture. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 145, 274–279. doi:10.1016/j.cbpa.2006.06.035
- Mori, H., Nakagawa, M., Soyano, K., Koya, Y., 2003. Annual reproductive cycle of black rockfish *Sebastes schlegeli* in captivity. *Fish Sci.* 69, 910–923. doi:10.1046/j.1444-2906.2003.00707.x
- Nowosad, J., Targońska, K., Chwaluczyk, R., Kaszubowski, R., Kucharczyk, D., 2014. Effect of temperature on the effectiveness of artificial reproduction of dace [Cyprinidae (*Leuciscus leuciscus* (L.))] under laboratory and field conditions. *J. Therm. Biol.* 45, 62–68. doi:10.1016/j.jtherbio.2014.07.011
- Pankhurst, N.W., Purser, G.J., Van Der Kraak, G., Thomas, P.M. & Forteach, G.N.R. 1996. Effect of holding temperature on ovulation, egg fertility, plasma levels of reproductive hormones and in vitro ovarian steroidogenesis in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 146, 277-290. doi:10.1016/S0044-8486(96)01374-9
- Sanches, E.A., Neumann, G., Baggio, D.M., Bombardelli, R.A., Piana, P.A., Romagosa, E., 2011. Time and temperature on the storage of oocytes from jundiá catfish, *Rhamdia quelen*. *Aquaculture* 319, 453–458. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.07.036
- Sant'Ana L., Melilo Filho R., Silva W.S., Mattioli C.C., Teixeira L.V. and Luz R.K., Aspectos sensoriais do pacamã: uma espécie promissora, 2017, Panorama da Aquicultura, (Ed 158).
- Santos, H.B., Thomé, R.G., Arantes, F.P., Sato, Y., Bazzoli, N., Rizzo, E., 2008. Ovarian follicular atresia is mediated by heterophagy, autophagy, and apoptosis in *Prochilodus argenteus* and *Leporinus taeniatus* (Teleostei: Characiformes). *Theriogenology* 70, 1449–1460. doi:10.1016/j.theriogenology.2008.06.091

- Santos, J.C.E., Luz, R.K., 2009. Effect of salinity and prey concentrations on *Pseudoplatystoma corruscans*, *Prochilodus costatus* and *Lophiosilurus alexandri* larviculture. *Aquaculture* 287, 324–328. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.10.014
- Sarameh, S.P., Falahatkar, B., Azari Takami, G., Efatpanah, I., 2013. Physiological changes in male and female pikeperch *Sander lucioperca* (Linnaeus, 1758) subjected to different photoperiods and handling stress during the reproductive season. *Fish Physiol. Biochem.* 39, 1253–1266. doi:10.1007/s10695-013-9780-z
- Sato, Y., Verani, N.F., Pires, A., Godinho, H.P., Verani, J.R., 2003. Águas, peixes e pescadores do são francisco das minas gerais: Padrões reprodutivos de peixes da bacia do São Francisco.
- Selz, O.M., Pierotti, M.E.R., Maan, M.E., Schmid, C., Seehausen, O., 2014. Female preference for male color is necessary and sufficient for assortative mating in 2 cichlid sister species. *Behav. Ecol.* 25, 612–626. doi:10.1093/beheco/aru024
- Shahkar, E., Yun, H., Kim, D.-J., Kim, S.-K., Lee, B.I., Bai, S.C., 2015. Effects of dietary vitamin C levels on tissue ascorbic acid concentration, hematology, non-specific immune response and gonad histology in broodstock Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture* 438, 115–121. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.01.001
- Targońska, K., Kupren, K., Żarski, D., Król, R., Kucharczyk, D., 2011. Influence of thermal conditions on successful ide (*Leuciscus idus* L.) artificial reproduction during spawning season. *Ital. J. Anim. Sci.* 10, e50. doi:10.4081/ijas.2011.e50
- Targońska, K., Żarski, D., Kupren, K., Palińska-żarska, K., Mamcarz, A., Kujawa, R., Skrzypczak, A., Furgała-Selezniow, G., Czarkowski, T.K., Hakuć-Błazowska, A., Kucharczyk, D., 2014. Influence of temperature during four following spawning seasons on the spawning effectiveness of common bream, *Abramis brama* (L.) under natural and controlled conditions. *J. Therm. Biol.* 39, 17–23. doi:10.1016/j.jtherbio.2013.11.005
- Tavares-Dias, M., Bozzo, F.R., Ferreira, E., Sandrin, S., 2004. Células sanguíneas, eletrólitos séricos, relação hepato e esplenossomática de carpa-comum, *Cyprinus carpio* (Cyprinidae) na primeira maturação gonadal. *Acta Sci. - Biol. Sci.* 26, 73–80.
- Thomé, R.G., Domingos, F.F.T., Santos, H.B., Martinelli, P.M., Sato, Y., Rizzo, E., Bazzoli, N., 2012. Apoptosis, cell proliferation and vitellogenesis during the folliculogenesis and follicular growth in teleost fish. *Tissue Cell* 44, 54–62. doi:10.1016/j.tice.2011.11.002

- Unuma, T., Sawaguchi, S., Hasegawa, N., Tsuda, N., Tanaka, T., Nomura, K., Tanaka, H., 2012. Optimum temperature of rearing water during artificial induction of ovulation in *Japanese eel*. *Aquaculture* 358-359, 216–223. doi:10.1016/j.aquaculture.2012.07.004
- Utoh, T., Horie, N., Okamura, A., Mikawa, N., Yamada, Y., Tanaka, S., Oka, H.P., Tsukamoto, K., 2013. Water temperature manipulation can induce oocyte maturation and ovulation in the common japanese conger, *Conger myriaster*. *Aquaculture* 392-395, 120–127. doi:10.1016/j.aquaculture.2013.02.007
- Valenzuela AE, Silva V.M, Klempau A.E., 2008. Effects of different artificial photoperiods and temperatures on haematological parameters of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiol. Biochem.* 34, 159–167. doi: 10.1007/s10695-007-9156-3
- Valenzuela, A.E., Silva, V.M., Klempau, A.E., 2006. Qualitative and quantitative effects of constant light photoperiod on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) peripheral blood erythrocytes. *Aquaculture* 251, 596–602. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.06.012

**ARTIGO 2: AVALIAÇÃO METABOLÔMICA POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA
NUCLEAR EM REPRODUTORES DO PEIXE TELEÓSTEO *Lophiosilurus alexandri*
SUBMETIDO AO AUMENTO DA TEMPERATURA**

Resumo

O objetivo deste trabalho foi aplicar a abordagem metabolômica por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) na avaliação das respostas metabólicas ao aumento da temperatura em reprodutores de *L. alexandri*. Espectros de ^1H do soro de machos e fêmeas foram obtidos em dois períodos de temperatura. Da semana 1 a 22, a temperatura da água foi mantida em $24,4 \pm 1,0$ °C. Após a semana 22, a temperatura da água foi elevada e mantida em $29,0 \pm 1,1$ °C até a semana 44. As coletas de sangue foram realizadas nas semanas 22 ($24,4$ °C) e 44 (29 °C). Os metabólicos identificados no soro para o período onde a temperatura foi mantida a $24,4$ °C foram caracterizados pelos menores valores da valina, creatina/fosfocreatina e ácidos graxos poli-insaturados. A análise dos componentes principais revelou variação de 11 % entre os espectros em função do efeito do aumento da temperatura. Claramente, não houve contribuição do sexo dos peixes nas tendências dos grupos. Após 154 dias da elevação da temperatura (44 semanas de experimento) o soro foi caracterizado, predominantemente, pelo aumento de unidade de glicerol dos ácidos graxos que compõem a fração lipídica das lipoproteínas e do colesterol total. O colesterol total e a unidade de glicerol das lipoproteínas no soro estiveram associados ao período reprodutivo quando a temperatura da água estava em 29 °C. De maneira geral, a permanência de altas concentrações de lipídios e lipoproteínas no soro ocasionou a sobreposição de sinais de metabólitos com menor teor. A predominância de lipídios no soro foi a principal alteração metabólica em função do aumento da temperatura da água de $24,4$ para 29 °C.

Palavras-chave: Metabolismo; Peixe nativo; Soro; Reprodução; Rio São Francisco.

Introdução

Entre os fatores ambientais, a temperatura exerce influência em todos processos fisiológicos relacionados a reprodução em peixes (Pankhurst e King, 2010). Sabe-se que a manutenção da temperatura fora da faixa de conforto resulta em disfunções reprodutivas e inibição da reprodução, podendo levar à regressão do tecido folicular (Pankhurst et al., 1996; Santos et al., 2008; Thomé et al., 2012). O efeito de regimes de temperatura na reprodução foi elucidado para diferentes espécies nos últimos anos em estudos avaliando a vitelogênese, ovulação, produção de ovos, fertilidade (Davies e Bromage, 2002; King e Pankhurst, 1999; King et al., 2003; Pankhurst et al., 1996), esteroides sexuais (Arantes et al., 2010; Hermelink et al., 2013, 2011; Mazzeo et al., 2014; Melo et al., 2016; Nowosad et al., 2014), perfil hematológico (Kavadias et al., 2004; Tavares-Dias et al., 2004; Valenzuela et al., 2008; Matsche e Gibbons, 2012) e sobrevivência das larvas (Hui et al., 2014; Kucharczyk et al., 2008; Sanches et al., 2011). Desta forma, o controle da temperatura possibilita otimizar a reprodução de peixes em condições de cultivo (Hermelink et al., 2013; Kucharczyk et al., 2008; Mazzeo et al., 2014; Nowosad et al., 2014; Utoh et al., 2013; Costa et al., 2015). Entretanto, há escassez de informações sobre alterações metabólicas ligadas a interação da temperatura com a atividade reprodutiva em peixes.

A análise metabolômica permite avaliar mudanças no perfil de metabólitos do organismo em função da interação com fatores ambientais (Bundy et al., 2009; Viant, 2009) e a identificação de marcadores biológicos (Allen et al., 2015; Cheng et al., 2014; Guo et al., 2014). Metabólitos constituem uma diversidade de moléculas resultante do produto final do metabolismo, com variação nas propriedades físicas e químicas como peso molecular, polaridade, solubilidade e volatilidade (Low et al., 2017). Para estas análises, as principais técnicas analíticas utilizadas em experimentos envolvendo metabolômica em organismos aquáticos são as espectroscopias de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e de Massa (Young and Alfaro, 2018). Em peixes, os protocolos analíticos já são conhecidos em trabalhos avaliando os metabólitos de diferentes tecidos como músculo, fígado (Lin et al., 2007; Wu et al., 2008), rins (Allen et al., 2015), plasma (Bembenek Bailey et al., 2017; Prathomya et al., 2017), soro (Hajirezaee et al., 2018), ovos e larvas (Cai et al., 2014; Huang et al., 2013; Soanes et al., 2011). Apesar dos trabalhos citados, não há relatos de estudos utilizando a abordagem metabolômica em reprodutores de peixes.

O *Lophiosilurus alexandri* é uma espécie pertencente a ordem dos Siluriformes que está entre os peixes endêmicos da bacia do Rio São Francisco na lista dos animais vulneráveis a extinção (ICMbio, 2016). Sua reprodução natural foi obtida em laboratório, sendo verificadas desovas trinta dias após o aumento da temperatura da água de 23 para 28° C (Costa et al., 2015) fato que demonstra a importância desse fator ambiental na reprodução desta espécie. Além disso, com elevação da temperatura da água os reprodutores foram capazes de manter estável o perfil hematológico, sem evidência de variação nos valores séricos de 17 β -estradiol, mas houve uma diminuição na testosterona (Gonçalves Junior et al., 2019). Desta forma, estudos relacionados a avaliação das respostas metabólicas nesta espécie poderão contribuir com informações para aprimorar o protocolo de manutenção de lotes de reprodutores mantidos em cativeiro. Além disso, a análise dos metabólitos séricos indicará as alterações relacionadas ao aumento da temperatura, informação com importância produtiva e biológica.

O objetivo deste trabalho é aplicar a abordagem metabolômica por RMN na avaliação das respostas metabólicas ao aumento da temperatura em reprodutores de *L. alexandri*.

Material e Métodos

Desenho experimental

O experimento foi conduzido no Laboratório de Aquicultura (Laqua) da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Todos os processos foram aprovados pelo Comitê de Ética da UFMG (Protocolo: 25/2010).

Quatro machos e 12 fêmeas adultos de *L. alexandri* foram capturados em ambiente natural e aclimatizados em condições de cultivo para o estudo (Costa et al., 2015). A identificação do sexo foi determinada pela canulação da papila genital (Melillo Filho et al., 2016), seguido pela implantação de um microchip. O peso dos reprodutores foi mensurado utilizando balança com precisão de 0,5 g. A média dos pesos dos machos foi 3,84 \pm 1,2 kg e das fêmeas 3,50 \pm 1,1 kg. Os reprodutores foram mantidos em quatro tanques circulares de 5 m³ com 2 a 2,5 m³ de volume útil (um macho e três fêmeas por tanque), com fundo preenchido com areia, temperatura controlada e difusor de ar que permitiu manter o oxigênio dissolvido acima de 5 mg/L. A alimentação foi realizada uma vez por semana e consistiu de tilápia congelada, eviscerada e sem a cabeça, fornecida com base em 2% da biomassa.

O período experimental teve duração de 44 semanas. Da semana 1 a 22, correspondendo ao período de janeiro a maio, a temperatura da água foi mantida em $24,4 \pm 1,0$ °C. Após a semana 22, a temperatura da água foi elevada gradativamente durante sete dias e mantida em $29,0 \pm 1,1$ °C até a semana 44, correspondendo ao período entre junho e novembro. A temperatura da água foi controlada por meio do uso de aquecedores (resistência elétrica com 800 w de potência).

Coleta de Sangue

O sangue foi coletado dos reprodutores na semana 22 (maio – Temperatura média de 24,4 °C) e na semana 44 (novembro - Temperatura média de 29°C). Para coleta, os peixes foram retidos usando um pano úmido. A coleta foi realizada por venopunção caudal com acesso ventral. Cerca de 1 mL de sangue foi recolhido sem anticoagulante, centrifugado durante 5 min (1000 rpm durante 1 min e 3000 rpm durante 4 min) para separação do soro e depois congelado a -80 °C para posterior análise do perfil metabólico.

Aquisição dos espectros de RMN

A aquisição dos espectros de RMN foi realizada no laboratório da Central de Análise de Fármacos, Medicamentos e Alimentos (CAFMA) da Universidade Federal do Vale do São Francisco, *campus* Petrolina. As amostras foram preparadas pela mistura de 200 µL de soro do peixe com 400 µL da solução tampão de fosfato preparada em D₂O (pH = 7,4), contendo 10 mmol/L de ácido fórmico. A mistura foi então vortexada por 30 s e 550 µL dela foi transferida para um tubo de RMN (5 mm) para a aquisição dos espectros de hidrogênio. Os espectros de RMN de ¹H foram obtidos em um espectrômetro de RMN Bruker AVANCE 400, operando a 9,4 Tesla, observando o núcleo de hidrogênio a 400,13 MHz, equipado com uma sonda de alta resolução. A aquisição dos espectros de hidrogênio com sequência de pulsos noesypr1d com *relaxation delay* (d1) de 3,0 s, *mixing time* (d8) de 20 ms, 64 K de número de pontos (TD), 512 transientes (NS), janela espectral de 12.019,230 Hz, tempo de aquisição (AQ) igual a 2,7 s e temperatura de 298 K. Os espectros foram processados no programa TOPSPIN com 64K pontos aplicando-se uma multiplicação exponencial dos FIDs por um fator de 0,3Hz. Os deslocamentos químicos foram calibrados em relação ao sinal do ácido fórmico (δ 8,22). Para a confirmação da atribuição dos sinais nos espectros de ¹H, experimentos de correlação direta, bem como a longa distância (HSQC e HMBC), foram

adquiridos em um espectrômetro Bruker AVANCE 400, operando a 14,1 Tesla, observando o núcleo de ^1H a 400 MHz e o núcleo de ^{13}C a 150 MHz, respectivamente. Os deslocamentos químicos foram reportados em ppm usando o sinal do ácido fórmico como referência interna. O tempo experimental total foi de 60 min para cada amostra, incluindo o tempo utilizado para o preparo da amostra.

Análise de componentes principais (ACP)

Para análise de componentes principais (ACP) dos dados utilizou-se o programa AMIX® (versão 3.9.12, Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany). A região do espectro utilizada foi de δ 0,0-9,0 divididas em intervalos (denominados buckets) de δ 0,02. As áreas referentes aos sinais residuais da água (δ 4,5-5,5) e do ácido fórmico (δ 8,17-8,30) foram excluídas gerando uma matriz de dados composta de 24 amostras (linhas) e 397 variáveis (colunas). A área de cada bucket foi integrada usando o modo de integração especial (*special integration mode*). Em seguida, os espectros foram escalados com relação a intensidade total (*scaled to total intensity*), ou seja, a intensidade do sinal medido para cada *bucket* foi dividida pela integral de todos os sinais do espectro. Foi aplicado o Pareto nas colunas, que reduz a importância de valores altos das variáveis fazendo com que a estrutura dos dados se mantenha parcialmente inalterada. Foram gerados gráficos de escores para comparar as mudanças químicas frente a variação da temperatura dos peixes reprodutores machos e fêmeas. A identificação dos metabólitos responsáveis pela separação entre os grupos foi realizada através dos gráficos de influências *loadings*, que mostram o peso relativo de cada *bucket*.

Resultados

A análise de RMN permitiu explorar as respostas metabólicas de reprodutores de *L. alexandri* frente à mudança de temperatura. A Figura 1 mostra espectros representativos de ^1H do soro de reprodutores de *L. alexandri* machos e fêmeas expostos a 24,4 °C e 29 °C. Os sinais foram atribuídos a presença de creatina/fosfocreatina, valina, colesterol total, componentes estruturais de lipoproteínas e de ácidos graxos poli-insaturados. O soro de machos e fêmeas de *L. alexandri*, nas duas condições de temperatura, apresentou perfil espectral semelhante. Diferenças podem ser detectadas pela comparação visual, incluindo os sinais da creatina/fosfocreatina, dos hidrogenios alílicos e olefínicos.

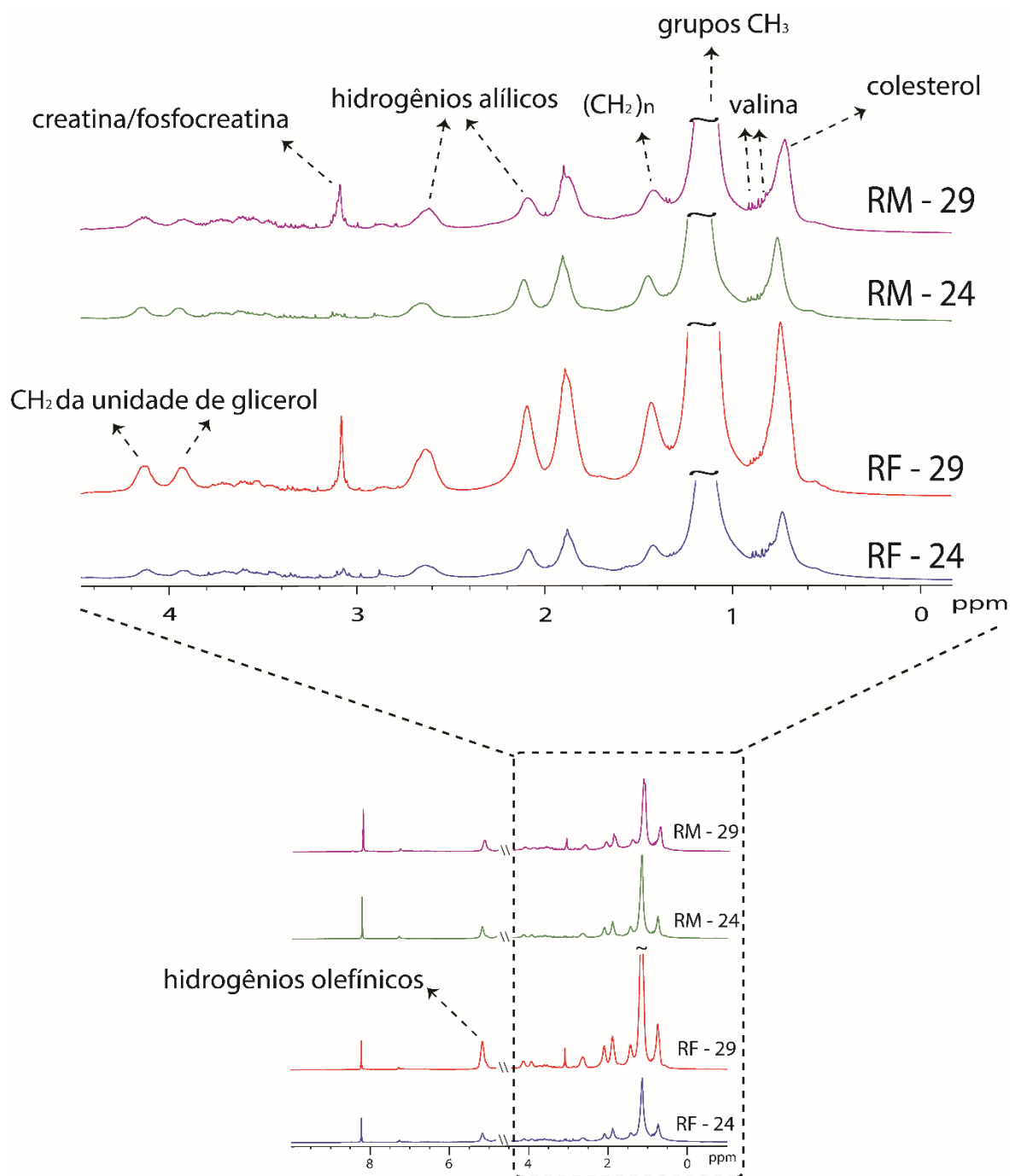


Figura 1: Espectros de ^1H representativos do soro dos peixes analisados sendo: RF 24 (reprodutor fêmea a 24°C), RF 29 (reprodutor fêmea a 29°C), RM 24 (reprodutor macho a 24°C) e RM 29 (reprodutor macho a 29°C).

A análise do gráfico de escores (Figura 2), formado por PC3 x PC4, com PC3 explicando uma variância total de 11,5 %, revelou a formação de duas tendências. No lado positivo de PC3 encontra-se a maior parte dos espectros provenientes dos peixes reprodutores machos e fêmeas mantidos a 29°C . Enquanto que, no lado negativo de PC3, discriminou-se

um grupo contendo a maior parte dos peixes reprodutores mantidos a 24°C, com exceção de apenas duas amostras referentes a duas fêmeas. Claramente, não houve contribuição do sexo dos peixes nas tendências dos grupos.

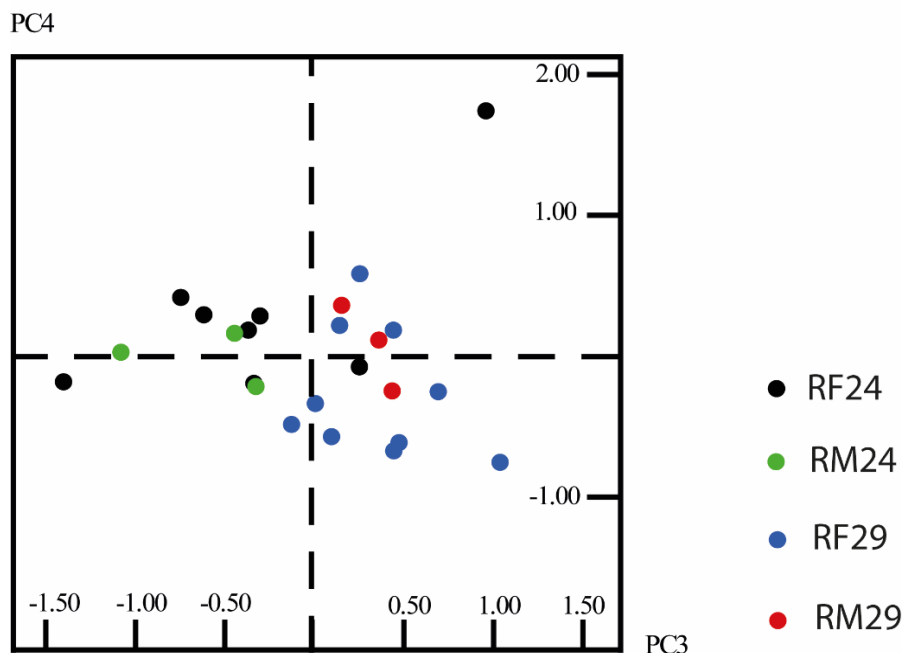


Figura 2: Gráfico de escores (PC3 x PC4) das amostras de soro dos peixes analisados sendo: RF 24 (reprodutor fêmea a 24,4 °C), RF 29 (reprodutor fêmea a 29 °C), RM 24 (reprodutor macho a 24,4 °C) e RM 29 (reprodutor macho a 29°C).

A avaliação do gráfico de *loadings* 1 D para o eixo PC3 permitiu a identificação dos compostos com maior impacto na variância dos dados em função do aumento da temperatura da água (Figura 3). Os sinais negativos indicam os *buckets* que contribuíram para a diferença de metabólitos no soro dos peixes mantidos a 24,4 °C da semana 1 a 22, sendo caracterizados pela redução da valina (*buckets* em δ 0,82 – 0,92), dos residuais gerais de aminoácidos e carboidratos (δ 3,50 – 3,80), da creatina/fosfocreatina (δ 3,09) e por ácidos graxos poli-insaturados (*buckets* em δ 2,63 referente aos hidrogênios alílicos que estão entre duplas ligações e em δ 5,1 característico de hidrogênios olefínicos). Os sinais positivos indicam os *buckets* que contribuíram para a diferença de metabólitos no soro dos peixes mantidos a 29 °C durante o período da semana 22 a 44, sendo caracterizado pelo aumento dos *buckets* δ 1,08-1,15, δ 1,42, δ 2,08, δ 3,92 e δ 4,12 relacionados respectivamente aos grupos CH_3 , $(\text{CH}_2)_n$, hidrogênios alílicos e grupos CH_2 da unidade de glicerol dos ácidos graxos que compõem a fração lipídica das lipoproteínas e pelo *bucket* em δ 0,7 referente ao colesterol total.

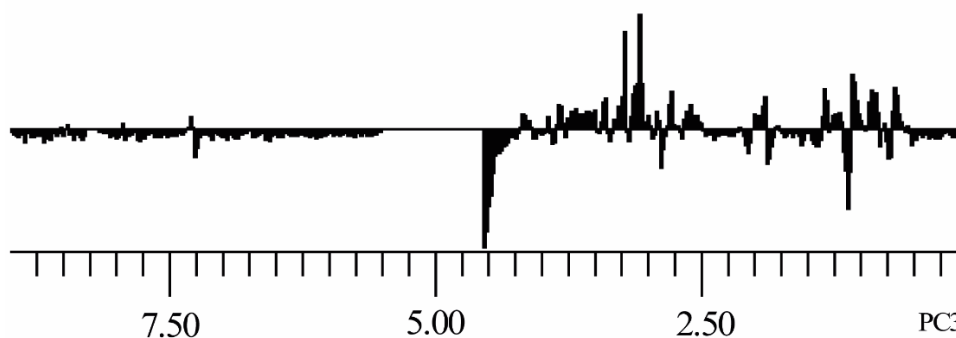


Figura 3: Gráfico de loadings 1 D da PC3 das amostras de soro dos reprodutores de *Lophiosilurus alexandri* analisados, com identificação dos sinais com maior impacto na variação dos dados. Os sinais negativos indicam os *buckets* que contribuíram para a diferença dos escores dos peixes mantidos a 24,4 °C. Os sinais positivos indicam os *buckets* que contribuíram para a diferença dos escores dos peixes mantidos a 29 °C.

Discussão

A análise dos espectros permitiu obter um panorama geral da bioquímica do soro de reprodutores de *L. alexandri* em duas temperaturas, com predominância de sinais de macromoléculas, principalmente da porção lipídica das lipoproteínas. O fato dessa tendência de discriminação ser expressa nas PCs maiores (3 e 4) demonstra que os espectros analisados são similares. Essa mesma observação pode ser confirmada pelo tipo de pré-tratamento utilizado nas colunas da matriz utilizada na análise quimiométrica, o pareto. Tal procedimento faz com que as variáveis minoritárias também tenham peso na discriminação das amostras. Após 22 semanas com temperatura média de 24,4 °C a predominância de lipídios no soro foi a principal alteração metabólica em função do aumento da temperatura da água de 24,4 para 29 °C.

Neste estudo, é provável que os menores valores de creatina/fosfocreatina e valina sejam parte do mecanismo de ajuste metabólico a temperatura mais baixa. A redução da valina e a creatina/fosfocreatina vem sendo associadas ao estresse (Viant et al., 2003; Lardon et al., 2013), no entanto, poucos estudos de metabolôma do estresse térmico em organismos aquáticos foram relatados e nenhum analisou os efeitos do estresse pelo frio (Bundy et al., 2009; Young and Alfaro, 2018). A exposição por 10 semanas a 15°C (controle) e 20°C para *Oncorhynchus mykiss* revelou que a redução da fosfocreatina esteve ligada ao aumento da

demanda energética na resposta metabólica pelo estresse a temperatura mais alta (Viant et al., 2003). A fosfocreatina também foi reduzida durante a resposta ao estresse por anóxia em *Carassius carassius* (Lardon et al., 2013). A creatina está diretamente relacionada ao transporte de fonte de energia celular, transformando ADP em ATP pela hidrólise da fosfocreatina e produção de um grupo fosfato (Allen et al., 2015; Prathomya et al., 2017; Wagner et al., 2014). Esta via de obtenção de energia alternativa é ativada para manter a atividade celular estável durante a insuficiência do metabolismo aeróbico (Waarde et al., 1990), que pode ter ocorrido nos peixes mantidos a 24°C. Assim como a creatina/fosfocreatina, a alteração na abundância da valina foi apontada como biomarcador na resposta imunológica durante o estresse térmico ao calor em embriões de *O. mykiss* (Turner et al., 2007), em *O. niloticus* durante o desafio sanitário frente à infecção com *Streptococcus* sp. (Cheng et al., 2014) e na resposta ao estresse oxidativo em *Ictalurus punctatus* com quadro clínico de anemia (Allen et al., 2015). A valina é um aminoácido essencial formando com a leucina e isoleucina o grupo dos aminoácidos ramificados (Li et al., 2009). Previamente já foi demonstrado que a valina, além de desempenhar funções no metabolismo de lipídios e síntese de proteína muscular, também atua na resposta imunológica (Zhang et al., 2017). Porém, os reprodutores de *L. alexandri* mantiveram parâmetros hematológicos estáveis a 24,4° C, especificamente para contagem de leucócitos e glicose (Gonçalves Junior et al., 2019), indicando ausência de alteração da resposta imunológica.

Adicionalmente, a temperatura de 23 °C foi utilizada com sucesso para a manutenção de *L. alexandri* capturados em ambiente natural a condição de cultivo e posterior reprodução (Costa et al., 2015). Entretanto, a temperatura utilizada no presente estudo, de 24,4 °C está abaixo da faixa ideal do reportado em estudos anteriores, sendo de 29-32 °C para máximo crescimento das larvas (Takata et al., 2014) e 27-28 °C para ótima resposta fisiológica e crescimento em juvenis (Costa et al., 2016). Isto sugere que a temperatura ideal do *L. alexandri* varia em função da fase fisiológica, podendo ser considerado 24 °C adequado para a manutenção de reprodutores desta espécie fora da estação reprodutiva. De fato, em seu ambiente natural a temperatura da água pode atingir valores menores que 24 °C nos meses de inverno (Arantes et al., 2010). Além disso, em estudos anteriores para diferentes espécies, foi relatado que o período de temperatura mais baixa seguida de ligeiro aumento favorece a maturação gonadal, sendo necessário para regulação do ciclo reprodutivo (Kucharczyk et al.,

2008; Hermelink et al., 2011; 2013; Utoh et al., 2013; Mazzeo et al., 2014; Nowosad et al., 2014).

Outra importante resposta à temperatura de 24,4 °C para o *L. alexandri* foi a menor abundância de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs). Este resultado pode ser atribuído, principalmente, ao aumento da utilização destes ácidos graxos como mecanismo fisiológico para manter a integridade e fluidez das membranas a temperatura mais baixa, resultando em menor concentração no soro (Ren et al., 2013). Em contrapartida, os maiores valores para os PUFAs observado no soro dos peixes mantidos a 29 °C, estão provavelmente relacionados às funções reprodutivas. Este resultado é consistente com o verificado para variação sazonal de lipídios nas gônadas de fêmeas de *Leptoclinus maculatus*, com aumento durante o verão e esgotamento do armazenamento de lipídios durante o inverno (Murzina et al., 2012). Apesar de não mensurados, os PUFAs de maior importância biológica são o ácido eicosapentaenóico 20:5n-3 (EPA), ácido docosahexaenóico 22:6n-3 (DHA) e o ácido araquidônico 20:4n-6 (ARA) (Tocher, 2010). As espécies de água doce apresentam a capacidade de aumentar o grau de insaturação e o tamanho da cadeia carbônica a partir dos ácidos graxos com 18 carbonos por meio da ação das enzimas dessaturase e elongase, respectivamente (Kuah et al., 2015; Tocher, 2010). A alteração do perfil de ácidos graxos no soro e tecidos ocorre para manter o equilíbrio de PUFAs, sendo regulada principalmente pela composição de ácidos graxos da dieta e pela temperatura da água (Ren et al., 2013). A alteração do perfil de PUFAs também ocorre em função da atividade reprodutiva, sendo verificado aumento do requerimento durante a gametogênese (Tocher, 2010). Fato que explica os valores elevados encontrados para o *L. alexandri* mantidos a 29 °C. A função dos PUFAs na reprodução em peixes foi amplamente investigada, sendo considerado fator nutricional que afeta a qualidade dos ovos e larvas (Furuita et al., 2007, 2003; Lazzarotto et al., 2015; Murzina et al., 2012; Mustonen et al., 2002; Ng and Wang, 2011; Zakeri et al., 2011; Zhou et al., 2011). Especificamente o ARA, atua como precursor da prostaglandina, um importante metabólico regulador da maturação e ovulação (Lister and Kraak, 2008). Os PUFAs também são incorporados nos ovócitos na forma de grânulos de vitelo, sendo esta reserva a única fonte deste nutriente para a formação das membranas celulares durante o desenvolvimento embrionário e larval (Furuita et al., 2007; Kazeto et al., 2011; Pittman et al., 2013; Costa et al., 2018).

Após 22 semanas da elevação da temperatura da água para 29 °C, a predominância do colesterol total e da unidade de glicerol dos ácidos graxos que compõem a fração lipídica das lipoproteínas no soro dos peixes pode ser atribuída ao aumento da atividade de síntese destes metabólitos (Wedemeyer, 1973; Costa et al., 2016; Hu et al., 2014). Esta hipótese é sustentada pelo fato do nível de colesterol total e lipídios no soro serem afetados pela síntese endógena ou alimentação (Maita et al., 2006; Prathomya et al., 2017; Wagner et al., 2014), apesar de no presente estudo ter sido adotado o mesmo manejo alimentar nos dois períodos de temperatura. Isto sugere que o metabolismo dos reprodutores é diferenciado em diferentes temperaturas. Resultado similar para colesterol foi previamente reportado em juvenis de *L. alexandri*, com aumento para os peixes mantidos a 29 °C em relação aos peixes mantidos a 23 °C (Costa et al., 2016). Contudo, resultado diferente foi verificado para *Salmo salar* onde o colesterol não foi afetado entre as temperaturas de 12 e 20 °C (Tromp et al., 2018). Em contrapartida, para o *Oncorhynchus kisutch* e *Salmo gairdneri* o choque térmico de 10 para 20 °C resultou em redução do colesterol total em função do aumento do metabolismo hepático e secreção biliar (Wedemeyer, 1973). Assim, fica evidente que o colesterol pode variar em função da idade, sexo, dieta e fase reprodutiva (Wallaert e Babin, 1994). Entretanto, não está completamente esclarecido o efeito da temperatura na homeostase do colesterol em peixes (Tromp et al., 2018). É conhecido que o colesterol é responsável por diferentes funções no organismo, entre elas: regular a fluidez e flexibilidade das membranas celulares em diferentes condições de temperatura (Hu et al., 2014), fazer parte do conteúdo da bile (Yun et al., 2018) e ser precursor da síntese de hormônios, incluindo corticosteroides e esteroides (Milla et al., 2009; Nagahama and Yamashita, 2008). Esta última função é interessante, uma vez que os corticosteroides (Milla et al., 2009) e esteroides (Arantes et al., 2010; Hermelink et al., 2013, 2011; Mazzeo et al., 2014; Melo et al., 2016; Nowosad et al., 2014) são reguladores do processo reprodutivo. Assim como o colesterol total, uma das possíveis explicações para a abundância de unidades de glicerol ligados a lipoproteínas nos peixes mantidos a 29 °C está associado a atividade reprodutiva (Fremont e Marion, 1982; Wallaert e Babin, 1994;). De fato, em *S. gairdneri* (Fremont e Marion, 1982) e em *Lota lota* (Mustonen et al., 2002) a produção de lipoproteínas esteve relacionada à formação de tecido gonadal. Em *O. mykiss* ocorreu variações sazonais das diferentes classes das lipoproteínas no soro dos peixes, sendo verificado aumento em função da progressão da maturação gonadal, elevação da concentração de esteroides sexuais e vitelogenina (Wallaert e Babinl, 1994). A principal função de

lipoproteínas no soro é o transporte de moléculas hidrofóbicas, entre elas o colesterol, triglicerídeos, PUFA, fosfolípidios, ácidos graxos e vitaminas lipossolúveis (MacFarlane et al., 1990; Maita et al., 2006; Zhu et al., 2014). Estes fatos podem explicar a predominância destes grupos de metabólicos no presente experimento, uma vez que o período reprodutivo requer maior atividade do metabolismo de lipídios (Wallaert e Babin, 1994; Wiegand, 1996). Em estudo prévio, as desovas de *L. alexandri* iniciaram 26 dias após o aumento da temperatura da água para 29 °C e os peixes mantiveram atividade reprodutiva por mais cinco meses, totalizando 17 desovas neste período (Gonçalves Junior et al., 2019).

Apesar da RMN ser amplamente aplicada para estudos metabolômicos de biofluidos humanos, existem poucos trabalhos com avaliação sanguínea de peixes (Solanky et al., 2005; Karakach et al., 2009; Samuelsson et al., 2006; Samuelsson et al., 2011). No presente trabalho optou-se pelo mínimo de manuseio da amostra, ou seja, análise direta do soro, sem extrações. Tal abordagem é interessante visto o caráter inicial da temática, o que garante manter o estado natural das amostras através do manuseio restrito. Apesar dessa vantagem, a análise direta acarretou na permanência de altas concentrações de lipídios e lipoproteínas nas amostras, sobrepondo os sinais de substâncias com menor teor. Alguns procedimentos de micro extração publicados na literatura foram testados antes da aquisição dos dados de RMN (Tiziani et al., 2008). No entanto, essas metodologias não foram eficazes para a remoção da fração lipídica do soro do *L. alexandri*. O uso de técnicas que permitam extrair maiores informações sobre a porção lipídica do soro de peixes, como cromatografia gasosa, também pode ser uma escolha promissora para melhor avaliar a influência do metabolismo lipídico no processo de reprodução frente a variação da temperatura.

Conclusões

A predominância de PUFA, colesterol total e a unidade de glicerol das lipoproteínas no soro foram as principais alterações metabólicas em função do aumento da temperatura da água de 24,4 para 29 °C. A permanência de altas concentrações de lipídios e lipoproteínas no soro ocasionou a sobreposição de sinais de metabólitos com menor teor.

Referências

- Allen, P.J., Wise, D., Greenway, T., Khoo, L., Griffin, M.J., Jablonsky, M., 2015. Using 1-D 1H and 2-D 1H J-resolved NMR metabolomics to understand the effects of anemia in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Metabolomics* 11, 1131–1143. doi:10.1007/s11306-014-0767-2
- Arantes, F.P., Santos, H.B., Rizzo, E., Sato, Y., Bazzoli, N., 2010. Profiles of sex steroids, fecundity, and spawning of the curimatã-pacu *Prochilodus argenteus* in the São Francisco River, downstream from the Três Marias Dam, Southeastern. Brazil. *Anim. Reprod. Sci.* 118, 330–336. doi:10.1016/j.anireprosci.2009.07.004
- Barros, M.D.M., Guimarães-Cruz, R.J., Veloso-Júnior, V.C., Santos, J.E., 2007. Reproductive apparatus and gametogenesis of *Lophiosilurus alexandri* Steindachner (Pisces, Teleostei, Siluriformes). *Rev. Bras. Zool.* 24, 213–221. doi:10.1590/S0101-81752007000100028
- Bailey, S.A.B., Niemuth, J.N., McClellan-Green, P.D., Godfrey, M.H., Harms, C.A., Stoskopf, M.K., 2017. 1 H-NMR metabolomic study of whole blood from hatchling loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) exposed to crude oil and/or Corexit. *R. Soc. Open Sci.* 4, 171433. doi:10.1098/rsos.171433
- Bundy, J.G., Davey, M.P., Viant, M.R., 2009. Environmental metabolomics: a critical review and future perspectives. *Metabolomics* 5, 3–21. doi:10.1007/s11306-008-0152-0
- Cai, H., Chen, Y., Cui, X., Cai, S., Chen, Z., 2014. High-resolution 1H NMR spectroscopy of fish muscle, eggs and small whole fish via Hadamard-Encoded Intermolecular Multiple-Quantum Coherence. *PLoS One* 9, e86422. doi:10.1371/journal.pone.0086422
- Cheng, Z., Ma, Y., Li, H., Peng, X., 2014. N-acetylglucosamine enhances survival ability of tilapias infected by *Streptococcus iniae*. *Fish Shellfish Immunol.* 40, 524–530. doi:10.1016/j.fsi.2014.08.008
- Costa, D.C., Silva, W.S., Melillo Filho, R., Miranda Filho, K.C., Santos, J.C.E., Kennedy Luz, R., 2015. Capture, adaptation and artificial control of reproduction of *Lophiosilurus alexandri*: A carnivorous freshwater species. *Anim. Reprod. Sci.* 159, 148–154. doi:10.1016/j.anireprosci.2015.06.009
- Costa, D.P., Leme, F.O.P., Takata, R., Costa, D.C., Souza, S.W., Melillo Filho, R., Alves, G.M., Luz, R.K., 2016. Effects of temperature on growth, survival and physiological

- parameters in juveniles of *Lophiosilurus alexandri*, a carnivorous neotropical catfish. *Aquac. Res.* 47, 1706–1715. doi:10.1111/are.12594
- Davies, B., Bromage, N., 2002. The effects of fluctuating seasonal and constant water temperatures on the photoperiodic advancement of reproduction in female rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 205, 183-200. doi: 10.1016/S0044-8486(01)00665-2
- Furuita, H., Hori, K., Suzuki, N., Sugita, T., Yamamoto, T., 2007. Effect of n-3 and n-6 fatty acids in broodstock diet on reproduction and fatty acid composition of broodstock and eggs in the Japanese eel *Anguilla japonica*. *Aquaculture* 267, 55–61. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.01.039
- Furuita, H., Yamamoto, T., Shima, T., Suzuki, N., Takeuchi, T., 2003. Effect of arachidonic acid levels in broodstock diet on larval and egg quality of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 220, 725–735. doi:10.1016/S0044-8486(02)00617-8
- Guo, C., Huang, X., Yang, M., Wang, S., Ren, S., Li, H., Peng, X., 2014. GC/MS-based metabolomics approach to identify biomarkers differentiating survivals from death in crucian carps infected by *Edwardsiella tarda*. *Fish Shellfish Immunol.* 39, 215–222. doi:10.1016/j.fsi.2014.04.017
- Hajirezaee, S., Mirvaghefi, A.R., Farahmand, H., Agh, N., 2018. A metabolic approach to understanding adaptation to sea water by endangered Persian sturgeon, *Acipenser persicus* fingerlings. *Aquac. Res.* 49, 341–351. doi:10.1111/are.13464
- Hermelink, B., Wuertz, S., Rennert, B., Kloas, W., Schulz, C., 2013. Temperature control of pikeperch (*Sander lucioperca*) maturation in recirculating aquaculture systems—induction of puberty and course of gametogenesis. *Aquaculture* 400-401, 36–45. doi:10.1016/j.aquaculture.2013.02.026
- Hermelink, B., Wuertz, S., Trubiroha, A., Rennert, B., Kloas, W., Schulz, C., 2011. Influence of temperature on puberty and maturation of pikeperch, *Sander lucioperca*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 172, 282–292. doi:10.1016/j.ygcen.2011.03.013
- Hu, J., You, F., Wang, Q., Weng, S., Liu, H., Wang, L., Zhang, P.J., Tan, X., 2014. Transcriptional responses of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) to low temperature. *PLoS One* 9. doi:10.1371/journal.pone.0108582

- Huang, S.-M., Xu, F., Lam, S.H., Gong, Z., Ong, C.N., 2013. Metabolomics of developing zebrafish embryos using gas chromatography- and liquid chromatography-mass spectrometry. *Mol. Biosyst.* 9, 1372. doi:10.1039/c3mb25450j
- Hui, W., Xiaowen, Z., Haizhen, W., Jun, Q., Pao, X., Ruiwei, L., 2014. Joint effect of temperature, salinity and pH on the percentage fertilization and hatching of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquac. Res.* 45, 259–269. doi:10.1111/j.1365-2109.2012.03222.x
- ICMbio, 2016. Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. Brasília.
- Karakach, T.K., Huenupi, E.C., Soo, E.C., Walter, J.A., Afonso, L.O., 2009. ¹H-NMR and mass spectrometric characterization of the metabolic response of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) to long-term handling stress. *Metabolomics* 5, 123–137. doi:10.1007/s11306-008-0144-0
- Kavadias, B.S., Dessypris, A., Miliou, H., 2004. Seasonal variation in steroid hormones and blood parameters in cage-farmed European sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*). *J. Appl. Ichthyol.* 20, 58–63. doi: 10.1111/j.1439-0426.2004.00497.x
- Kazeto, Y., Tosaka, R., Matsubara, H., Ijiri, S., Adachi, S., 2011. Ovarian steroidogenesis and the role of sex steroid hormones on ovarian growth and maturation of the Japanese eel. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 127, 149–154. doi:10.1016/j.jsbmb.2011.03.013
- King, H.R., Pankhurst, N.W., 1999. Ovulation of Tasmanian Atlantic salmon maintained at elevated temperatures: implications of climate change for sustainable industry development. *Proceedings from 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*, July 4–9, 1999. University of Bergen, Bergen, Norway, pp. 396–398.
- King, H.R., Pankhurst, N.W., Watts, M., Pankhurst, P.M., 2003. Effect of elevated summer temperatures on gonadal steroid production, vitellogenesis and egg quality in female Atlantic salmon. *J. Fish Biol.* 63, 153–167. doi:10.1046/j.1095-8649.2003.00137.x
- Kuah, M.K., Jaya-Ram, A., Shu-Chien, A.C., 2015. The capacity for long-chain polyunsaturated fatty acid synthesis in a carnivorous vertebrate: Functional characterisation and nutritional regulation of a Fads2 fatty acyl desaturase with $\Delta 4$ activity and an Elovl5 elongase in striped snakehead. *Biochim. Biophys. Acta* 1851, 248–260. doi:10.1016/j.bbali.2014.12.012

- Kucharczyk, D., Targońska, K., Hliwa, P., Gomułka, P., Kwiatkowski, M., Krejszeff, S., Perkowski, J., 2008. Reproductive parameters of common carp (*Cyprinus carpio*) spawners during natural season and out-of-season spawning. *Reprod. Biol.* 8, 285–289. doi:10.1016/S1642-431X(12)60018-7
- Lardon, I., Nilsson, G.E., Stecyk, J.A.W., Vu, T.N., Laukens, K., Dommissie, R., Boeck, G., 2013. 1H-NMR study of the metabolome of an exceptionally anoxia tolerant vertebrate, the crucian carp (*Carassius carassius*). *Metabolomics* 9, 311–323. doi:10.1007/s11306-012-0448-y
- Lazarotto, V., Corraze, G., Leprevost, A., Quillet, E., Dupont-Nivet, M., Médale, F., 2015. Three-year breeding cycle of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed a plant-based diet, totally free of marine resources: consequences for reproduction, fatty acid composition and progeny survival. *PLoS One* 10, 1–17. doi:10.1371/journal.pone.0117609
- Li, P., Mai, K., Trushenski, J., Wu, G., 2009. New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds. *Amino Acids* 37, 43–53. doi:10.1007/s00726-008-0171-1
- Lin, C.Y., Wu, H., Tjeerdema, R.S., Viant, M.R., 2007. Evaluation of metabolite extraction strategies from tissue samples using NMR metabolomics. *Metabolomics* 3, 55–67. doi:10.1007/s11306-006-0043-1
- Lister, A.L., Kraak, G.V.D., 2008. An investigation into the role of prostaglandins in zebrafish oocyte maturation and ovulation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 159, 46–57. doi:10.1016/j.ygcen.2008.07.017
- Low, C.F., Rozaini, M.Z.H., Musa, N., Nataqain, B.S., 2017. Current knowledge of metabolomic approach in infectious fish disease studies. *J. Fish Dis.* 40, 1267–1277. doi:10.1111/jfd.12610
- Fremont, L., Marion, D., A comparison of the lipoprotein profiles in male trout (*Salmo gairdneri*) before maturity and during spermiation, 1982. *Biochem. Physiol. B Comp. Biochem.* 73, 849-55. doi: 10.1016/0305-0491(82)90328-5
- MacFarlane, R.B., Harvey, H.R., Bowers, M.J., Patton, J.S., 1990. Serum lipoproteins in striped bass (*Morone saxatilis*) - effects of starvation. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 47, 739–745. doi:10.1139/f90-084

- Maita, M., Maekawa, J., Satoh, K.I., Futami, K., Satoh, S., 2006. Disease resistance and hypocholesterolemia in yellowtail *Seriola quinqueradiata* fed a non-fishmeal diet. *Fish. Sci.* 72, 513–519. doi:10.1111/j.1444-2906.2006.01179.x
- Matsche, M.A., Gibbons, J., 2012. Annual variation of hematology and plasma chemistry in shortnose sturgeon, *Acipenser brevirostrum*, during a dam-impeded spawning run. *Fish Physiol. Biochem.* 38, 1679–1696. doi:10.1007/s10695-012-9664-7
- Mazzeo, I., Peñaranda, D.S., Gallego, V., Baloché, S., Nourizadeh-Lillabadi, R., Tveiten, H., Dufour, S., Asturiano, J.F., Weltzien, F.-A., Pérez, L., 2014. Temperature modulates the progression of vitellogenesis in the *European eel*. *Aquaculture* 434, 38–47. doi:10.1016/j.aquaculture.2014.07.020
- Melillo Filho, R., Gheller, V.A., Chaves, G.V., Silva, W.S., Costa, D.C., Figueiredo, L.G., da Costa Julio, G.S., Luz, R.K., 2016. Early sexing techniques in *Lophiosilurus alexandri* (Steindachner, 1876), a freshwater carnivorous catfish. *Theriogenology* 86, 1523–1529. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.05.011
- Melo, R.M.C., Arantes, F.P., Sato, Y., Santos, J.E., Rizzo, E., Bazzoli, N., 2011. Comparative morphology of the gonadal structure related to reproductive strategies in six species of neotropical catfishes (Teleostei: siluriformes). *J. Morphol.* 272, 525–535. doi:10.1002/jmor.10931
- Melo, R.M.C., Ribeiro, Y.M., Luz, R.K., Bazzoli, N., Rizzo, E., 2016. Influence of low temperature on structure and dynamics of spermatogenesis during culture of *Oreochromis niloticus*. *Anim. Reprod. Sci.* 172, 148–156. doi:10.1016/j.anireprosci.2016.07.013
- Milla, S., Wang, N., Mandiki, S.N.M., Kestemont, P., 2009. Corticosteroids: Friends or foes of teleost fish reproduction? *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 153, 242–251. doi:10.1016/j.cbpa.2009.02.027
- Murzina, S.A., Ottesen, C.A.M., Falk-Petersen, S., Hop, H., Nemova, N.N., Poluektova, O.G., 2012. Oogenesis and lipids in gonad and liver of daubed shanny (*Leptoclinus maculatus*) females from Svalbard waters. *Fish Physiol. Biochem.* 38, 1393–1407. doi:10.1007/s10695-012-9627-z
- Mustonen, A.M., Nieminen, P., Hyvaurinen, H., 2002. Liver and plasma lipids of spawning burbot. *J. Fish Biol.* 61, 1318–1322. doi:10.1111/j.1095-8649.2002.tb02476.x

- Nagahama, Y., Yamashita, M., 2008. Regulation of oocyte maturation in fish. *Dev. Growth Differ.* 50, S195–S219. doi:10.1111/j.1440-169X.2008.01019.x
- Ng, W.-K., Wang, Y., 2011. Inclusion of crude palm oil in the broodstock diets of female Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, resulted in enhanced reproductive performance compared to broodfish fed diets with added fish oil or linseed oil. *Aquaculture* 314, 122–131. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.01.034
- Nowosad, J., Targońska, K., Chwaluczyk, R., Kaszubowski, R., Kucharczyk, D., 2014. Effect of temperature on the effectiveness of artificial reproduction of dace [Cyprinidae (*Leuciscus leuciscus* (L.))] under laboratory and field conditions. *J. Therm. Biol.* 45, 62–68. doi:10.1016/j.jtherbio.2014.07.011
- Pankhurst, N.W., Purser, G.J., Van Der Kraak, G., Thomas, P.M.; Forreath, G.N.R. 1996. Effect of holding temperature on ovulation, egg fertility, plasma levels of reproductive hormones and in vitro ovarian steroidogenesis in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 146, 277-290. doi:10.1016/S0044-8486(96)01374-9
- Pankhurst, N.W., King, H.R., 2010. Temperature and salmonid reproduction: Implications for aquaculture. *J. Fish Biol.* 76, 69–85. doi:10.1111/j.1095-8649.2009.02484.x
- Pittman, K., Yúfera, M., Pavlidis, M., Geffen, A.J., Koven, W., Ribeiro, L., Zambonino-Infante, J.L., Tandler, A., 2013. Fantastically plastic: fish larvae equipped for a new world. *Rev. Aquac.* 5, S224–S267. doi:10.1111/raq.12034
- Prathomya, P., Prisingkorn, W., Jakovlić, I., Deng, F.Y., Zhao, Y.H., Wang, W.M., 2017. 1H NMR-based metabolomics approach reveals metabolic alterations in response to dietary imbalances in *Megalobrama amblycephala*. *Metabolomics* 13, 17. doi:10.1007/s11306-016-1158-7
- Ren, H.T., Zhang, G.Q., Li, J.L., Tang, Y.K., Li, H.X., Yu, J.H., Xu, P., 2013. Two $\delta 6$ -desaturase-like genes in common carp (*Cyprinus carpio* var. Jian): Structure characterization, mRNA expression, temperature and nutritional regulation. *Gene* 525, 11–17. doi:10.1016/j.gene.2013.04.073
- Samuelsson, L.M., Björlenius, B., Förlin, L., Larsson, D.J., 2011. Reproducible ^1H NMR-based metabolomic responses in fish exposed to different sewage effluents in two separate studies. *Environ. Sci. Technol.*, 45, 1703–1710. doi: 10.1021/es104111x

- Samuelsson, L.M., Förlin, L., Karlsson, G., Adolfsson-Erici, M., Larsson, D.J., Using NMR metabolomics to identify responses of an environmental estrogen in blood plasma of fish. *Aquat. Toxicol.* 78, 341–349, 2006. doi: 10.1016/j.aquatox.2006.04.008
- Sanches, E.A., Neumann, G., Baggio, D.M., Bombardelli, R.A., Piana, P.A., Romagosa, E., 2011. Time and temperature on the storage of oocytes from jundiá catfish, *Rhamdia quelen*. *Aquaculture* 319, 453–458. doi:10.1016/j.aquaculture.2011.07.036
- Santos, H.B., Thomé, R.G., Arantes, F.P., Sato, Y., Bazzoli, N., Rizzo, E., 2008. Ovarian follicular atresia is mediated by heterophagy, autophagy, and apoptosis in *Prochilodus argenteus* and *Leporinus taeniatus* (Teleostei: Characiformes). *Theriogenology* 70, 1449–1460. doi:10.1016/j.theriogenology.2008.06.091
- Sato, Y., Verani, N.F., Pires, A., Godinho, H.P., Verani, J.R., 2003. Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais: Padrões reprodutivos de peixes da bacia do São Francisco.
- Soanes, K.H., Achenbach, J.C., Burton, I.W., Hui, J.P.M., Penny, S.L., Karakach, T.K., 2011. molecular characterization of zebrafish embryogenesis via DNA microarrays and multiplatform time course metabolomics studies. *J. Proteome Res.* 10, 5102–5117. doi:10.1021/pr2005549
- Solanky, K.S., Burton, I.W., MacKinnon, S.L., Walter, J.A., Dacanay, A., 2005. Metabolic changes in Atlantic salmon exposed to *Aeromonas salmonicida* detected by ¹H-nuclear magnetic resonance spectroscopy of plasma. *Dis. Aquat. Org.* 65, 107–114. doi: 10.3354/dao065107
- Takata, R., Silva, W.D.S.E., Costa, D.C., Melillo Filho, R., Luz, R.K., 2014. Effect of water temperature and prey concentrations on initial development of *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1876 (Siluriformes: Pseudopimelodidae), a freshwater fish. *Neotrop. Ichthyol.* 12, 853–859. doi:10.1590/1982-0224-20140063
- Tavares-Dias, M., Bozzo, F.R., Ferreira, E., Sandrin, S., 2004. Células sanguíneas, eletrólitos séricos, relação hepato e esplenossomática de carpa-comum, *Cyprinus carpio* (Cyprinidae) na primeira maturação gonadal. *Acta Sci. - Biol. Sci.* 26, 73–80.
- Thomé, R.G., Domingos, F.F.T., Santos, H.B., Martinelli, P.M., Sato, Y., Rizzo, E., Bazzoli, N., 2012. Apoptosis, cell proliferation and vitellogenesis during the folliculogenesis and follicular growth in teleost fish. *Tissue Cell* 44, 54–62. doi:10.1016/j.tice.2011.11.002

- Tiziani, S., Emwas, A., Lodi, A., Ludwig, C., Bunce, C.M., Viant, M.R., Gunther, U.L., 2008. Optimized metabolite extraction from blood serum for ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Anal. Biochem.* 377, 16–23, 2008. doi: 10.1016/j.ab.2008.01.037
- Tocher, D.R., 2010. Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. *Aquac. Res.* 41, 717–732. doi:10.1111/j.1365-2109.2008.02150.x
- Tromp, J.J., Jones, P.L., Brown, M.S., Donald, J.A., Biro, P.A., Afonso, L.O.B., 2018. Chronic exposure to increased water temperature reveals few impacts on stress physiology and growth responses in juvenile Atlantic salmon. *Aquaculture* 495, 196–204. doi:10.1016/j.aquaculture.2018.05.042
- Turner, M.A., Viant, M.R., Teh, S.J., Johnson, M.L., 2007. Developmental rates, structural asymmetry, and metabolic fingerprints of steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs incubated at two temperatures. *Fish Physiol. Biochem.* 33, 59–72. doi:10.1007/s10695-006-9117-2
- Utoh, T., Horie, N., Okamura, A., Mikawa, N., Yamada, Y., Tanaka, S., Oka, H.P., Tsukamoto, K., 2013. Water temperature manipulation can induce oocyte maturation and ovulation in the common Japanese conger, *Conger myriaster*. *Aquaculture* 392-395, 120–127. doi:10.1016/j.aquaculture.2013.02.007
- Valenzuela AE, Silva V.M, Klempau A.E., 2008. Effects of different artificial photoperiods and temperatures on haematological parameters of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiol. Biochem.* 34, 159–167. doi: 10.1007/s10695-007-9156-3
- Van Waarde, A., Thillart, G.V.D., Erkelens, C., Addink, A., Lugtenburg, J., 1990. Functional coupling of glycolysis and phosphocreatine utilization in anoxic fish muscle. An in vivo ^{31}P NMR study. *J. Biol. Chem.* 265, 914–923.
- Viant, M.R., 2009. Applications of metabolomics to the environmental sciences. *Metabolomics* 5, 1–2. doi:10.1007/s11306-009-0157-3
- Viant, M.R., Werner, I., Rosenblum, E.S., Gantner, A.S., Tjeerdema, R.S., Johnson, M.L., 2003. Correlation between heat-shock protein induction and reduced metabolic condition in juvenile steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) chronically exposed to elevated temperature. *Fish Physiol. Biochem.* 29, 159–171. doi:10.1023/B:FISH.0000035938.92027.81

- Wagner, L., Trattner, S., Pickova, J., Gómez-Requeni, P., Moazzami, A.A., 2014. 1H NMR-based metabolomics studies on the effect of sesamin in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Food Chem. 147, 98–105. doi:10.1016/j.foodchem.2013.09.128
- Wallaert, C., Babinl, P.J., 1994. Plasma lipoprotein concentrations in Trout. J. Lipid Res. 35.
- Wu, H., Southam, A.D., Hines, A., Viant, M.R., 2008. High-throughput tissue extraction protocol for NMR- and MS-based metabolomics. Anal. Biochem. 372, 204–212. doi:10.1016/j.ab.2007.10.002
- Young, T., Alfaro, A.C., 2018. Metabolomic strategies for aquaculture research: a primer. Rev. Aquac. 10, 26–56. doi:10.1111/raq.12146
- Yun, B., Mai, K., Xu, W., 2018. Effect of dietary cholesterol and phospholipids on feed intake, growth performance and cholesterol metabolism in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Aquaculture 495, 443–451. doi:10.1016/j.aquaculture.2018.06.002
- Zakeri, M., Kochanian, P., Marammazi, J.G., Yavari, V., Savari, A., Haghi, M., 2011. Effects of dietary n-3 HUFA concentrations on spawning performance and fatty acids composition of broodstock, eggs and larvae in yellowfin sea bream, *Acanthopagrus latus*. Aquaculture 310, 388–394. doi:10.1016/j.aquaculture.2010.11.009
- Zhang, S., Zeng, X., Ren, M., Mao, X., Qiao, S., 2017. Novel metabolic and physiological functions of branched chain amino acids: A review. J. Anim. Sci. Biotechnol. 8, 4–15. doi:10.1186/s40104-016-0139-z
- Zhou, Q.B., Wu, H.D., Zhu, C.S., Yan, X.H., 2011. Effects of dietary lipids on tissue fatty acids profile, growth and reproductive performance of female rice field eel (*Monopterus albus*). Fish Physiol. Biochem. 37, 433–445. doi:10.1007/s10695-010-9444-1
- Zhu, T., Ai, Q., Mai, K., Xu, W., Zhou, H., Liufu, Z., 2014. Feed intake, growth performance and cholesterol metabolism in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) fed defatted fish meal diets with graded levels of cholesterol. Aquaculture 428-429, 290–296. doi:10.1016/j.aquaculture.2014.03.027

**ARTIGO 3: EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE O CONSUMO E DIGESTÃO DE
NÁUPLIOS DE ARTÊMIA NAS FASES INICIAS DE VIDA DO *Lophosilurus*
*alexandri***

Resumo

O objetivo deste estudo foi elucidar o efeito de diferentes temperaturas no consumo de alimento e a interação com o tempo para digestão em larvas de *L. alexandri* em diferentes idades. Para o experimento foi utilizado delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 4x4x8, sendo quatro diferentes temperaturas: 23, 26, 29 e 32 °C; quatro diferentes idades: 8, 13, 18 e 23 dias pós-eclosão (DPE); e oito diferentes tempos de coleta: 5, 15, 30, 45, 60, 120, 180 e 300 minutos após a alimentação. O número de náuplios de artêmia ingeridos, o consumo em porcentagem do peso vivo e a taxa de digestão em larvas de *L. alexandri* foram influenciados ($P<0,01$) pela temperatura, idade e tempo, assim como pela interação entre estes três fatores. O efeito da temperatura é mais evidente nas idades de 18 e 23 dias pós-eclosão, com maiores consumos predominantemente observados em 29 °C, entre os tempos de 5 e 60 minutos. Os maiores consumos em porcentagem do peso vivo ocorreram com as larvas de 8 DPE, no tempo de 180 minutos, em todas as temperaturas. Em função do aumento da idade e da temperatura há redução do tempo necessário para atingir a maior taxa de náuplios digeridos. Além disso, foi possível estimar que as larvas são capazes de ingerir até $0,30\pm 0,10$ MJ/larva de energia quando a temperatura foi de 32 °C. As temperaturas de 29 e 32 °C foram as que proporcionaram os resultados mais satisfatórios para consumo de náuplios de artêmia, taxa de digestão e consumo em porcentagem do peso vivo em larvas de *L. alexandri* de diferentes idades, em função do tempo de coleta pós a alimentação.

Palavras-chave: Alimento vivo, conteúdo estomacal, lavicultura, pacamã.

Introdução

A temperatura é um importante fator abiótico que afeta a vida de organismos aquáticos. Esta variável pode influenciar a reprodução de peixes (Pankhurst e King, 2010), o desenvolvimento larval (Cingi et al., 2010) e o crescimento (Abbink et al., 2011). Em condições ideais de temperatura da água os peixes apresentam aumento nas taxas de alimentação (Wang, 2009; Peng et al., 2014), digestão dos alimentos (Kofuji et al., 2005; Miegel, 2010) e absorção de nutrientes (Kehoe e Volkoff, 2008; Savoie et al., 2008). Já, quando submetidos a condições de baixa temperatura ocorre diminuição do consumo alimentar em função da redução da taxa metabólica (Linløkken et al., 2010; Pang et al., 2011). Além do consumo, a temperatura também apresenta efeito sobre a digestibilidade dos alimentos, quando os animais são submetidos a condições fora da faixa ótima (Hardewig e Van Dijk, 2003; Kofuji et al., 2005). Esta resposta está relacionada a dois fatores principais: a alteração do tempo de trânsito gástrico intestinal (Sun e Chen, 2009; Miegel et al., 2010) e a atividade das enzimas digestivas (Hardewig e Van Dijk, 2003; Savoie et al., 2008; Bowyer et al., 2014).

Durante a fase larval a temperatura também influencia o consumo de alimento e a eficiência de digestão (Johnston e Mathias, 1994; Legler et al., 2010; Baras et al., 2011; Ma et al. 2014; Takata et al., 2014; McLeod e Clark, 2016). É provável que as diferentes espécies apresentem temperatura específica para ótima eficiência alimentar. Por exemplo, larvas de *Seriola lalandi* com 19 dias após a eclosão ingeriram maior quantidade de artêmia quando a temperatura da água estava em 25°C em relação as temperaturas de 21 e 23 °C (Ma et al., 2014). Além da ingestão, para espécies como *Lepomis macrochirus* e *Perca flavescens* as taxas de digestão ocorrem de forma acentuada a 22°C comparados aos animais alimentados a 7°C (Legler et al., 2010). Por outro lado, estudos de alimentação por meio da avaliação do conteúdo estomacal de larvas podem contribuir com informações que melhorem a eficiência produtiva (Olsen et al., 2000; Ribeiro e Nuñez, 2008; Zhang et al., 2015), especificamente sobre o efeito da temperatura durante o período da primeira alimentação exógena (Legler et al., 2010; Ma et al., 2014), momento crítico da larvicultura em peixes (Lombardi e Gomes, 2008; Menossi et al., 2012).

O pacamã *Lophiosilurus alexandri* é uma espécie de água doce, pertencente a ordem dos Siluriformes que está entre os peixes endêmicos da bacia do Rio São Francisco na lista dos animais vulneráveis a extinção (ICMbio, 2016). Neste sentido, a espécie tem recebido

especial atenção em estudos para desenvolver tecnologia de produção de juvenis em larvicultura intensiva testando salinidade (Luz e Santos 2008; Santos e Luz, 2009), densidade de estocagem (López e Sampaio, 2000; Cordeiro et al., 2016) e o desenvolvimento de sistemas para a larvicultura (Pedreira et al., 2009; Melillo Filho et al., 2014). Além disso, está estabelecido que apesar do *L. alexandri* apresentar hábito alimentar carnívoro, as larvas podem ser alimentadas com náuplios de artêmia como alimento vivo nos primeiros 15 dias de alimentação exógena, com a concentração de presas inicial entre 1300 a 1.600 náuplios de artêmia/larva/dia (Santos e Luz, 2009; Luz et al, 2011; Takata et al, 2014; Santos et al., 2015). No entanto, o efeito da temperatura na digestão em diferentes idades das larvas ainda não é conhecido para o *L. alexandri*.

O objetivo deste estudo foi elucidar o efeito de diferentes temperaturas no consumo de alimento e a interação com o tempo para digestão em larvas de *L. alexandri* em diferentes idades.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Aquicultura da Universidade Federal de Minas Gerais (LAQUA), Brazil e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da UFMG (protocolo 153/2013).

Manutenção das larvas de peixes

Larvas de *L. alexandri* foram obtidas por meio de reprodução natural no LAQUA. Neste estudo, as larvas foram mantidas em dois tanques de 30 L com renovação diária de água de 50% do volume total. As larvas mortas foram removidas para evitar o canibalismo. No início da alimentação exógena e durante o estudo as larvas foram alimentadas três vezes ao dia com náuplios de artêmia, seguindo o recomendado por Luz et al. (2011). A temperatura se manteve em $27,72 \pm 0,36$ °C, o pH em $8,43 \pm 0,09$, o oxigênio dissolvido em $5,86 \pm 0,34$ mg L⁻¹, o nitrito inferior a 1 mg L⁻¹ e amônia total inferior a 0,2 mg L⁻¹. A salinidade, pH (HI98129) e o oxigênio dissolvido (modelo HI9146) foram mensurados por medidor portátil digital Hanna®. Para análise da amônia total e nitrito foi utilizado *Standard Methods* (2005).

Ingestão e digestão do alimento vivo

Para o experimento foi utilizado delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 4x4x8 (Tabela 1). Foram realizadas avaliações sobre a taxa de ingestão dos náuplios de artêmia por larvas *L. alexandri* em diferentes temperaturas: 23, 26, 29 e 32 °C. Para cada temperatura foram utilizadas larvas com oito dias após a eclosão (DPE) (primeiro dia da alimentação exógena, com $21,19 \pm 1,03$ mg e $14,01 \pm 0,91$ mm), 13 DPE (cinco dias de alimentação exógena, com $46,29 \pm 8,64$ mg e $18,06 \pm 0,85$ mm), 18 DPE (décimo dia de alimentação exógena, com $81,96 \pm 8,48$ mg e $18,06 \pm 0,85$ mm) e 23 DPE (décimo quinto dia de alimentação exógena, com $150,28 \pm 5,95$ mg e $24,70 \pm 0,38$ mm). Para cada temperatura e idade, foram recolhidas amostras nos tempos de 5, 15, 30, 45, 60, 120, 180 e 300 minutos pós-alimentação.

Tabela 1. Ilustração do desenho das unidades experimentais em esquema fatorial 4x4x8 (idade, temperatura e tempo de avaliação do conteúdo estomacal).

Tempo min	Idade															
	8 dias pós Eclosão				13 dias pós eclosão				18 dias pós eclosão				23 dias pós eclosão			
	Temperatura °C															
	23	26	29	32	23	26	29	32	23	26	29	32	23	26	29	32
5	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
15	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
30	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
45	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
60	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
120	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
180	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
300	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

Para as coletas, os animais foram mantidos em béqueres de 500 mL e estocados na densidade de 10 larvas por béquer. Cada béquer foi considerado uma unidade experimental e cada larva como uma repetição (n = 10 animais por idade, temperatura e tempo). Para cada idade, as larvas foram aclimatadas gradualmente a partir de 28 °C para as respectivas temperaturas (tratamentos), e este processo ocorreu 48 horas antes dos ensaios. Durante a aclimação as larvas foram alimentadas três vezes ao dia com náuplios de artêmia até

saciedade aparente nas primeiras 24 h. Em seguida, a água foi trocada e nenhum alimento foi fornecido até o início dos testes. As exceções foram as larvas na primeira alimentação exógena (8 DPE), que não tiveram acesso a alimentação antes dos ensaios. Aeração artificial foi adicionada em cada unidade durante todo o período de experimento (teste de aclimação e consumo) e a temperatura foi mantida constante através do uso de aquecedores de água com termostato (Atman[®]). Durante as observações o pH foi de $8,41 \pm 0,13$, o oxigênio dissolvido foi de $6,64 \pm 0,34 \text{ mg L}^{-1}$ e amônia total foi inferior a $0,25 \text{ mg L}^{-1}$.

As larvas foram alimentadas na proporção de 1.300 náuplios larva⁻¹ para as idades de 8 e 13 DPE; e 1950 náuplios larva⁻¹ e 2.600 náuplios larva⁻¹ para as larvas com 18 e 23 DPE, respectivamente (Luz et al. 2011). Para obtenção dos náuplios de artêmia, os cistos foram incubados a 28 °C e com aeração durante 24 horas. No final de cada tempo de amostragem, as larvas foram sacrificadas em gelo e, posteriormente, fixadas em formalina 5%. As larvas foram usadas para determinar o número de náuplios ingeridos. O trato digestivo foi separado do corpo e aberto para se realizar a contagem dos náuplios de artêmia sob microscópio estereoscópico de acordo com metodologia de Olsen et al., (2000) e Ribeiro e Nuñez (2006). A avaliação da digestão dos náuplios de artêmia foi adaptado de Olsen et al. (2000). Neste caso, o alimento vivo foi classificado como sem sinais visíveis de digestão (ND) e parcialmente digerido (PD). O início da digestão dos náuplios de artêmia foi considerado quando uma parte da artêmia tinha desaparecido, tal como a antena, olho, exoesqueleto ou algum tecido do corpo. Já a digestão total foi atribuída quando não era possível identificar as estruturas e havia a presença de uma massa homogênea.

Estimativa do consumo em porcentagem do peso vivo e energia

O peso seco de uma amostra de 100 náuplios foi determinado em balança analítica (Marte[®], modelo: AY220), após os indivíduos terem sido lavados com água destilada, secos a 60 °C durante 24 h em estufa e mantidos em dessecador durante 1 hora (Vanhaecke e Sorgeloos, 1980). A energia bruta foi determinada utilizando bomba calorimétrica (modelo Parr 6200, Moline, IL, USA). Os consumos em função da porcentagem do peso vivo e energia foram estimados com base no peso seco dos náuplios e expressas em porcentagem do consumo em função do peso vivo das larvas e ingestão de energia em MJ.larva⁻¹, respectivamente.

Estatística

Os dados foram analisados usando ANOVA em esquema fatorial no programa Minitab (Versão, 2018). A comparação das médias nos desdobramentos das interações foi realizada utilizando o teste de Tukey ($P < 0,05$) no programa R. Os procedimentos de avaliação da normalidade (Teste de Levene) e igualdade das variâncias (Teste de Cramer-von Mises) foram testadas previamente. Todos os valores expressos em porcentagem foram transformados em arco-seno antes da comparação estatística.

Resultados

O número de náuplios de artêmia ingeridos, a taxa de digestão e o consumo em porcentagem do peso vivo das larvas de *L. alexandri* foram influenciados ($P < 0,01$) pela temperatura, idade e tempo, assim como pela interação entre estes três fatores (Tabela 2). A diferença de consumo entre as idades ocorre a partir do tempo de 15 minutos para as temperaturas de 23, 26 e 32 °C, sendo esta diferença mais evidente a partir do tempo 30 min (Tabela 3). Esta resposta foi alterada pela interação com a temperatura, uma vez que para 29 °C a diferença no consumo entre as idades ocorreu no tempo de 5 min, sendo necessário menor tempo de contato da larva com os náuplios de artêmia. Com 8 DPE, o consumo entre as temperaturas é semelhante para maioria das observações, com valores mais elevados para os tempos a partir de 45 minutos. Esta resposta começa a ser alterada com 13 DPE, onde é possível identificar o menor consumo a 23 °C, na maioria dos tempos, exceto 5, 15 e 300 minutos. O efeito da temperatura é mais evidente nas idades de 18 e 23 DPE, sendo os maiores consumos predominantemente observados para a temperatura de 29 °C, entre os tempos de 5 e 60 minutos. Após o tempo de 60 minutos, nas idades de 18 e 23 DPE, para a temperatura de 29 °C foi verificado valores mais baixos de consumo.

Com 8 DPE o maior consumo de náuplios foi de $277,3 \pm 70,8$, em 32 °C e com tempo de 180 minutos (Tabela 3), equivalente a $0,11 \pm 0,03$ MJ/larva de ingestão de energia. Com 13 DPE o maior consumo de náuplios foi de $611,7 \pm 168,4$, em 29 °C e com tempo de 120 minutos, equivalente a $0,25 \pm 0,07$ MJ/larva de ingestão de energia. Com 18 DPE o maior consumo de náuplios foi de $747,2 \pm 240$, em 32 °C e com tempo de 180 minutos, equivalente a $0,30 \pm 0,10$ MJ/larva de ingestão de energia. Com 23 DPE o maior consumo foi de $606,9 \pm 165,8$ em 32 °C e com tempo de 180 minutos, equivalente a $0,24 \pm 0,06$ MJ/larva de ingestão de energia. As maiores taxas de consumo em porcentagem do peso vivo das larvas

ocorreram com 8 DPE, no tempo de 180 minutos, em todas as temperaturas (Tabela 4). Ainda para as larvas com 8 DPE, entre os tempos de 5 a 300 minutos, os maiores valores para consumo em relação ao peso vivo foram verificados na temperatura de 32 °C. Esta resposta se repete para idade de 13 DPE, exceto para os tempos de 120 e 300 minutos. Já para as idades de 18 e 23 DPE, o comportamento da resposta é diferente, uma vez que o maior consumo em porcentagem do peso vivo ocorreu entre os tempos de 5 e 60 minutos para as larvas mantidas a 29 °C.

Tabela 2. Valores de F para consumo de náuplios, taxa de digestão e consumo em porcentagem do peso vivo de larvas de *L. alexandri* em diferentes idades, temperaturas e tempos de coleta.

Fatores	Valor de F		
	Náuplio ingerido	Taxa de digestão	% Peso vivo
Temperatura	10,33**	204,31**	60,61**
Idade	432,29**	213,88**	340,62**
Tempo	128,88**	161,86**	181,35**
Tempe. X Idade	6,23**	7,56**	24,66**
Tempe. X Tempo	31,51**	18,01**	21,15**
Idade X Tempo	14,72**	31,29**	18,63**
Tempe. X Idade X Tempo	14,42**	8,05**	12,87**
CV (%)	36,31	35,44	31,79

**Efeito significativo ($P < 0,01$). CV= Coeficiente de variação.

Para as larvas com 8 DPE mantidas a 23 °C, a digestão dos náuplios iniciou-se cerca de 30 minutos após a alimentação, enquanto nas demais temperaturas e idades, a digestão iniciou-se 5 minutos após a ingestão (Tabela 3). Nas idades 13 e 18 DPE, a maior taxa de digestão entre os tempos de 5 e 60 minutos ocorreu para a temperatura de 29 e 32 °C. Para as larvas com 23 dias, a % de digestão é diferente entre as temperaturas a partir do tempo de 15 minutos, sendo os maiores valores a 32°C. Entre 5 e 60 minutos, os valores mais elevados para taxa de náuplios digeridos foi verificado para as larvas com 18 dias após eclosão, principalmente para as temperaturas de 29 e 32 °C. Para os tempos de 120, 180 e 300 minutos, a resposta foi alterada, sendo verificado redução do número de náuplios digeridos para as larvas com 18 DPE e aumento para as larvas com 8, 13 e 23 DPE.

Tabela 3. Desdobramento da interação temperatura, idade e tempo para consumo de náuplios de artêmia por larvas de *L. alexandri* em diferentes idades, temperaturas e tempo de coletas. Média (\pm desvio padrão).

8° Dia pós eclosão								
T (°C)	5	15	30	45	60	120	180	300
23°	18,2 \pm 13,9aA ¹	28,2 \pm 18,9bB ¹	78,0 \pm 11,8aC ¹	87,0 \pm 28,8aC ¹	107 \pm 22,7aC ¹	123,8 \pm 25,1aC ¹	117,4 \pm 22,9bC ¹	91,9 \pm 32,9aC ¹
26°	39,7 \pm 8,5aA ²	127,0 \pm 16,1abA ¹²	127,8 \pm 25,9aB ¹²	112,0 \pm 11,7aC ¹²	136,4 \pm 22,6aC ¹²	156,8 \pm 31,0aB ¹²	201,7 \pm 25,3abB ¹	111,1 \pm 39,0aB ¹²
29°	81,1 \pm 25,0aC ³	103,0 \pm 34,9abB ¹²	91,7 \pm 27,6aB ¹²	147,6 \pm 17,8aB ¹²	150,4 \pm 15,2aC ¹²	164,4 \pm 48,8aB ¹²	213,8 \pm 45,6abBa ¹	170,22 \pm 43,3aB ¹²
32°	87,5 \pm 16,8aA ²	143,1 \pm 41,9aA ²	94,3 \pm 26,8aC ²	155,7 \pm 20,4aC ¹²	183,7 \pm 43,1aB ¹²	190,6 \pm 22,7aB ¹²	277,3 \pm 70,8aD ¹	152,1 \pm 72,4aB ¹²
13° Dia pós eclosão								
23°	98,0 \pm 32,0aA ²	132,0 \pm 28,0aAB ²	130,2 \pm 48,8bBC ²	163,0 \pm 64,0bBC ¹²	178,4 \pm 43,2bBC ¹²	224,9 \pm 48,5cBC ¹²	191 \pm 82,5bC ¹²	222,0 \pm 127,3aB ¹
26°	97,2 \pm 32,4aA ³	176,2 \pm 20,2aA ³	169,2 \pm 32,8abB ²³	252,9 \pm 33,9aB ²	234,2 \pm 31,5abB ²	417 \pm 162,5bAA ¹	216,2 \pm 37,5bB ²³	118,1 \pm 69,2bB ³
29°	114,2 \pm 17,4aC ⁴⁵	172,6 \pm 48,9aB ³⁴	228,0 \pm 53,4abB ³⁴	303,5 \pm 52,2aB ²³⁴	290,7 \pm 57,7aB ²³	611,7 \pm 168,4aB ¹	357,9 \pm 30,9aA ²	87,8 \pm 64,6bB ⁵
32°	99,9 \pm 11,6aA ³	162,6 \pm 32,9aA ²³	282,2 \pm 28,6aBC ¹²	276,7 \pm 39,7aBC ¹²	289,0 \pm 39,6abB ¹²	271,1 \pm 67,8cB ¹²	400 \pm 102,4aC ¹	102,2 \pm 97,8bB ³
18° Dia pós eclosão								
23°	75,5 \pm 11,5bA ⁵	134,1 \pm 28,9bAB ⁴⁵	196,4 \pm 26,2bB ³⁴⁵	232,0 \pm 71,1bB ²³	255,2 \pm 53,5cB ¹²³	315,9 \pm 107,3bB ¹²	381,6 \pm 108,8dB ²	721,1 \pm 112,4aA ¹
26°	47,4 \pm 31,9bA ⁴	130,3 \pm 66,8bA ³⁴	199,9 \pm 51,2bAB ²³	240,9 \pm 46,5bB ²³	317,1 \pm 112,8cB ²	491,9 \pm 69,2aA ¹	502,2 \pm 113,3cA ¹	614,6 \pm 188,2aA ¹
29°	268,1 \pm 27,4aB ³	416,0 \pm 31,1aA ²	544,4 \pm 79,9aA ¹²	530,0 \pm 99,63aA ¹²	584,6 \pm 41,9aA ¹	242,7 \pm 85,4bB ³⁴	98,5 \pm 33,1bC ⁵	115,2 \pm 16,0bB ⁴⁵
32°	35,0 \pm 28,2bA ⁶	61,4 \pm 35,1bA ⁵⁶	177,5 \pm 59,5bB ⁴⁵	231,6 \pm 103,5bB ⁴	510,1 \pm 61,7bA ²³	652,7 \pm 177,9aA ²	747,2 \pm 240,1aA ¹	363,4 \pm 132,2cA ³
23° Dia pós eclosão								
23°	85,4 \pm 20,5bA ⁴	171,9 \pm 53,1bA ⁴	329,4 \pm 26,5bA ³	372,0 \pm 74,5bA ³	539,3 \pm 95,8aA ²	582,1 \pm 144,6aA ²	636,8 \pm 248,8aA ¹²	767,4 \pm 276,8aA ¹
26°	40,8 \pm 30,2bA ⁴	83,1 \pm 51,4bA ⁴	309,7 \pm 46,8bA ³	409,3 \pm 98,9bA ²³	508,3 \pm 100,2aA ²	508,0 \pm 169,7aA ¹²	529,0 \pm 141,4aA ¹²	591,6 \pm 120,6aA ¹
29°	407,2 \pm 63,8aA ²³	483,8 \pm 65,6aA ¹²	563,0 \pm 106,7aA ¹	525,2 \pm 65,5aA ¹²	470,6 \pm 77,5aA ¹²	262,7 \pm 127,6bB ⁴	119,9 \pm 141,6bBC ⁵	317,7 \pm 137,2bA ³⁴
32°	52,9 \pm 17,0bA ⁴	99,3 \pm 71,6bA ⁴	394,8 \pm 107,5bA ³	449,6 \pm 56,2abA ²³	488,0 \pm 73,2aA ¹²³	549,9 \pm 99,8aA ¹²	606,9 \pm 165,8aB ¹	432,9 \pm 117,8aA ²³

Letras minúsculas na vertical representam o efeito da temperatura em cada nível dos fatores idade e tempo; Letras maiúsculas na vertical representam o efeito da idade em cada nível dos fatores temperatura e tempo; Números sobrescrito na horizontal representam o efeito do tempo em cada nível dos fatores temperatura e idade. Teste de Tukey (P<0,05).

Tabela 4. Desdobramento da interação temperatura, idade e tempo para consumo em porcentagem do peso vivo para larvas de *L. alexandri* em diferentes idades, temperaturas e tempo de coletas. Média (\pm desvio padrão).

T (°C)	8° Dia pós eclosão							
	5	15	30	45	60	120	180	300
23	0,18 \pm 0,14bA ³	0,27 \pm 0,17cAB ³	0,79 \pm 0,11bA ²	0,86 \pm 0,29bA ¹²	1,10 \pm 0,21cA ¹²	1,22 \pm 0,26cA ¹	1,15 \pm 0,24cA ¹²	0,91 \pm 0,33bC ¹²
26	0,39 \pm 0,08bA ⁴	1,26 \pm 0,16abA ²³	1,24 \pm 0,25aA ²³	1,11 \pm 0,11bA ³	1,35 \pm 0,21bcA ²³	1,55 \pm 0,31bcB ²	2,00 \pm 0,25bA ¹	1,16 \pm 0,36bA ³
29	0,79 \pm 0,17aA ³	1,05 \pm 0,33bA ³	0,91 \pm 0,27bB ³	1,43 \pm 0,16aA ²	1,49 \pm 0,14abA ²	1,62 \pm 0,48abB ²	2,14 \pm 0,47bA ¹	1,75 \pm 0,38aA ²
32	0,85 \pm 0,15aA ⁴	1,42 \pm 0,39aA ³	0,93 \pm 0,27abA ⁴	1,57 \pm 0,19aA ²³	1,85 \pm 0,44aA ²	1,91 \pm 0,23aA ²	2,73 \pm 0,70aA ¹	1,55 \pm 0,74aA ²³
13° Dia pós eclosão								
23	0,44 \pm 0,15aA ⁴	0,60 \pm 0,12aA ³⁴	0,60 \pm 0,23bA ³⁴	0,74 \pm 0,27bAB ²³⁴	0,80 \pm 0,21bAB ²³⁴	1,13 \pm 0,70cAB ¹²	0,95 \pm 0,60bA ¹²³	1,28 \pm 0,59aAB ¹
26	0,44 \pm 0,16aA ³	0,80 \pm 0,16aB ²³	0,79 \pm 0,13bB ²³	1,13 \pm 0,16abA ²	1,14 \pm 0,11aA ²	1,99 \pm 0,71bA ¹	0,99 \pm 0,18bBC ²	0,51 \pm 0,28bBC ³
29	0,52 \pm 0,08aA ⁵⁶	0,78 \pm 0,23aAB ⁴⁵⁶	0,88 \pm 0,28bB ⁴⁵	1,02 \pm 0,25aBC ³⁴	1,38 \pm 0,25aA ²³	2,85 \pm 0,77aA ¹	1,65 \pm 0,13aB ²	0,41 \pm 0,17bB ⁶
32	0,44 \pm 0,05aB ³	0,74 \pm 0,16aB ³	1,30 \pm 0,11aB ²	1,25 \pm 0,19aA ²	1,31 \pm 0,18aB ²	1,24 \pm 0,32cB ²	1,81 \pm 0,46aB ¹	0,46 \pm 0,31bB ³
18° Dia pós eclosão								
23	0,19 \pm 0,03bA ⁵	0,34 \pm 0,08bAB ⁴⁵	0,49 \pm 0,06bA ³⁴⁵	0,59 \pm 0,18bAB ²³⁴	0,65 \pm 0,14bB ²³⁴	0,81 \pm 0,28bB ²³	1,01 \pm 0,28bA ²	1,85 \pm 0,25aA ¹
26	0,13 \pm 0,07bAB ⁴	0,33 \pm 0,18bC ³⁴	0,50 \pm 0,13bBC ²³⁴	0,62 \pm 0,13bB ²³	0,80 \pm 0,30bB ²	1,25 \pm 0,18aB ¹	1,30 \pm 0,31bB ¹	1,59 \pm 0,51aB ¹
29	0,65 \pm 0,19aA ³⁴	1,07 \pm 0,26aA ²³	1,42 \pm 0,26aA ¹²	1,33 \pm 0,37aAB ¹²	1,49 \pm 0,63aA ¹	0,66 \pm 0,74b ⁴⁵	0,26 \pm 0,41cC ⁵	0,29 \pm 0,13cB ⁴⁵
32	0,09 \pm 0,06bC ⁵	0,15 \pm 0,09bC ⁵	0,45 \pm 0,16bC ⁴⁵	0,63 \pm 0,26bB ³⁴	1,24 \pm 0,41aB ²	1,30 \pm 0,17aB ²	1,94 \pm 0,66aB ¹	0,90 \pm 0,33bBC ²³
23 Dia pós eclosão								
23	0,12 \pm 0,03bA ⁵	0,24 \pm 0,08bB ⁴⁵	0,46 \pm 0,04abA ³⁴⁵	0,52 \pm 0,11aB ²³⁴	0,75 \pm 0,14aAB ¹²³	0,81 \pm 0,2aB ¹²³	0,90 \pm 0,37aA ¹²	1,07 \pm 0,39aBC ¹
26	0,06 \pm 0,04bB ³	0,12 \pm 0,08bC ³	0,43 \pm 0,07bC ²³	0,57 \pm 0,14aB ¹²	0,62 \pm 0,24aB ¹²	0,72 \pm 0,15aC ¹²	0,74 \pm 0,18aC ¹²	0,84 \pm 0,18abC ¹
29	0,55 \pm 0,19aA ¹²	0,67 \pm 0,18aB ¹²	0,76 \pm 0,19aB ¹	0,69 \pm 0,20aC ¹²	0,73 \pm 0,20aB ¹²	0,39 \pm 0,40b ²³	0,17 \pm 0,12bC ³	0,42 \pm 0,25cB ¹²³
32	0,07 \pm 0,03bC ²	0,14 \pm 0,10bC ²	0,55 \pm 0,16abC ¹	0,63 \pm 0,08aB ¹	0,68 \pm 0,08aC ¹	0,77 \pm 0,15aC ¹	0,85 \pm 0,22aC ¹	0,63 \pm 0,15bcC ¹

Letras minúsculas na vertical representam o efeito da temperatura em cada nível dos fatores idade e tempo; Letras maiúsculas na vertical representam o efeito da idade em cada nível dos fatores temperatura e tempo; Números sobrescrito na horizontal representam o efeito do tempo em cada nível dos fatores temperatura e idade. Teste de Tukey (P<0,05).

Tabela 5. Desdobramento da interação temperatura, idade e tempo para taxa de digestão de náuplios de artêmia por larvas de *L. alexandri* em diferentes idades, temperaturas e tempo de coletas. Média (\pm desvio padrão).

T (°C)	8° Dia pós eclosão							
	5	15	30	45	60	120	180	300
23	0,00 \pm 0,00aB ²	0,00 \pm 0,00aB ²	4,70 \pm 1,45bA ¹²	9,08 \pm 1,39aB ¹²	8,74 \pm 1,68bC ¹²	8,96 \pm 1,57bB ¹²	12,62 \pm 5,02bB ¹	14,39 \pm 4,72bB ¹
26	2,87 \pm 1,93aB ²	4,17 \pm 1,28aB ²	7,14 \pm 6,61bB ¹²	12,02 \pm 5,25aB ¹²	13,88 \pm 9,98abB ¹²	12,55 \pm 2,79bC ¹²	15,52 \pm 6,24bB ¹	14,86 \pm 8,21bC ¹
29	4,38 \pm 3,66aC ³	5,61 \pm 4,27aC ²³	17,42 \pm 4,23aB ¹	12,34 \pm 2,34aC ¹²³	12,49 \pm 2,69abC ¹²³	15,03 \pm 7,23abB ¹²³	15,43 \pm 4,68bB ¹²	19,10 \pm 2,18bB ¹
32	3,61 \pm 2,01aB ³	4,75 \pm 1,62aB ³	20,22 \pm 8,52aA ²	17,06 \pm 3,52aB ²	21,03 \pm 2,90aB ²	21,01 \pm 8,69aC ²	33,30 \pm 7,06aB ¹	41,22 \pm 26,59aB ¹
13° Dia pós eclosão								
23	0,55 \pm 1,15aAB ³	7,10 \pm 3,07aAB ³	9,29 \pm 2,23bA ²³	21,08 \pm 4,48abA ¹	20,59 \pm 13,47bcB ¹²	23,99 \pm 9,88dA ¹	27,88 \pm 30,53cA ¹	28,56 \pm 8,07cA ¹
26	3,56 \pm 1,97aAB ⁴	13,29 \pm 1,20aAB ³⁴	16,49 \pm 2,97abAB ³	14,66 \pm 4,94bB ³	18,70 \pm 5,26cB ³	65,44 \pm 9,35aA ¹	16,04 \pm 4,03dB ³	41,18 \pm 35,35cA ²
29	3,22 \pm 2,18aC ⁴	8,19 \pm 3,17aC ⁴	11,63 \pm 3,70bB ⁴	23,82 \pm 8,54aAB ³	28,25 \pm 6,81abAB ³	34,04 \pm 8,58cA ³	47,02 \pm 2,36bA ²	96,49 \pm 7,02aA ¹
32	9,52 \pm 3,34aAB ⁶	14,20 \pm 5,03aAB ⁵⁶	22,88 \pm 7,08aA ⁴⁵	24,64 \pm 5,60aAB ³⁴	35,35 \pm 6,87aA ³	49,51 \pm 4,54bA ²	53,53 \pm 2,73aA ²	94,06 \pm 9,93aA ¹
18° Dia pós eclosão								
23	9,58 \pm 2,35bA ⁴	11,45 \pm 3,35cA ³⁴	13,63 \pm 2,49cA ³⁴	21,01 \pm 6,63aA ¹²³	27,22 \pm 11,62aA ¹²	25,69 \pm 10,05abA ¹²	28,54 \pm 10,37aA ¹	18,28 \pm 10,55bB ²³⁴
26	11,40 \pm 5,96bAB ³	20,25 \pm 11,45bcA ²³	20,04 \pm 7,21bcA ²³	25,84 \pm 3,92aA ¹²	34,66 \pm 5,67aA ¹	30,57 \pm 3,56aB ¹²	29,83 \pm 5,28aA ¹²	25,34 \pm 4,28bB ¹²
29	30,96 \pm 6,22aA ¹²	30,49 \pm 5,84aA ¹²	30,47 \pm 5,81aA ¹²³	27,74 \pm 5,19aA ¹²³⁴	33,95 \pm 9,94aA ¹	21,03 \pm 15,42bB ³⁴	17,02 \pm 8,35bB ⁴	20,74 \pm 5,59bB ²³⁴
32	18,68 \pm 7,70bA ⁵	21,18 \pm 6,73bA ⁴⁵	23,99 \pm 4,82abA ⁴⁵	28,92 \pm 5,37aA ²³⁴	36,78 \pm 25,13aA ¹²	23,86 \pm 5,46bBC ³⁴⁵	35,47 \pm 12,07aB ²³	46,95 \pm 8,36aB ¹
23° Dia pós eclosão								
23	5,96 \pm 3,35aAB ²	7,58 \pm 1,62bAB ¹²	10,04 \pm 2,65cA ¹²	10,10 \pm 3,26bB ¹²	18,18 \pm 2,63bB ¹	17,36 \pm 3,79bAB ¹	17,00 \pm 6,45bB ¹	16,82 \pm 6,23bB ¹²
26	12,58 \pm 7,58aA ¹	15,51 \pm 3,42abAB ¹	21,14 \pm 6,02abA ¹	14,15 \pm 4,47bB ¹	14,10 \pm 3,90bB ¹	17,15 \pm 7,78bC ¹	17,36 \pm 5,43bB ¹	16,92 \pm 4,92bBC ¹
29	14,13 \pm 4,30aB ¹	18,30 \pm 6,73aB ¹	14,44 \pm 5,35bcB ¹	17,33 \pm 3,07bBC ¹	20,64 \pm 8,26abBC ¹	18,30 \pm 8,55bB ¹	21,48 \pm 4,77bB ¹	23,88 \pm 4,71bB ¹
32	14,54 \pm 1,41aA ⁴	21,61 \pm 4,06aA ³⁴	26,79 \pm 9,03aA ²³	26,40 \pm 7,34aA ²³	31,16 \pm 9,91aA ²³	31,31 \pm 6,85aB ²³	33,32 \pm 6,65aB ²	43,09 \pm 8,20aB ¹

Letras minúsculas na vertical representam o efeito da temperatura em cada nível dos fatores idade e tempo; Letras maiúsculas na vertical representam o efeito da idade em cada nível dos fatores temperatura e tempo; Números sobrescrito na horizontal representam o efeito do tempo em cada nível dos fatores temperatura e idade. Teste de Tukey (P<0,05).

Nas figuras 1, 2 e 3 são apresentadas as tendências dos resultados para o total de náuplios ingerido, consumo em porcentagem do peso vivo e taxa de digestão, respectivamente, em função da interação temperatura, idade e tempo. O consumo de náuplios aumentou em função da idade. O máximo consumo foi observado para os tempos entre 60 e 180 minutos. Os maiores consumos em porcentagem do peso vivo foram obtidos para as larvas com 8 DPE, em função dos tempos de coleta, quando a temperatura estava em 29 e 32 °C. Aumento da taxa de digestão ocorreu em função da elevação da temperatura e tempo pós alimentação. A maior taxa de digestão ocorreu para a idade de 13 DPE na temperatura de 32 °C e tempo de 300 minutos. As constantes das equações de predições que descrevem a interação entre os fatores foram altamente significativas ($P < 0,01$) e são descritas a seguir.

Consumo de náuplios = $- 194 + 4,65.Temperatura + 17,9.Idade + 0,614.Tempo$

Cons. % do peso vivo = $0,622 + 0,0306.Temperatura - 0,0461.Idade + 0,00172.Tempo$

Taxa de náuplios digeridos = $- 35,1 + 1,60.Temperatura + 0,338.Idade + 0,0757.Tempo$

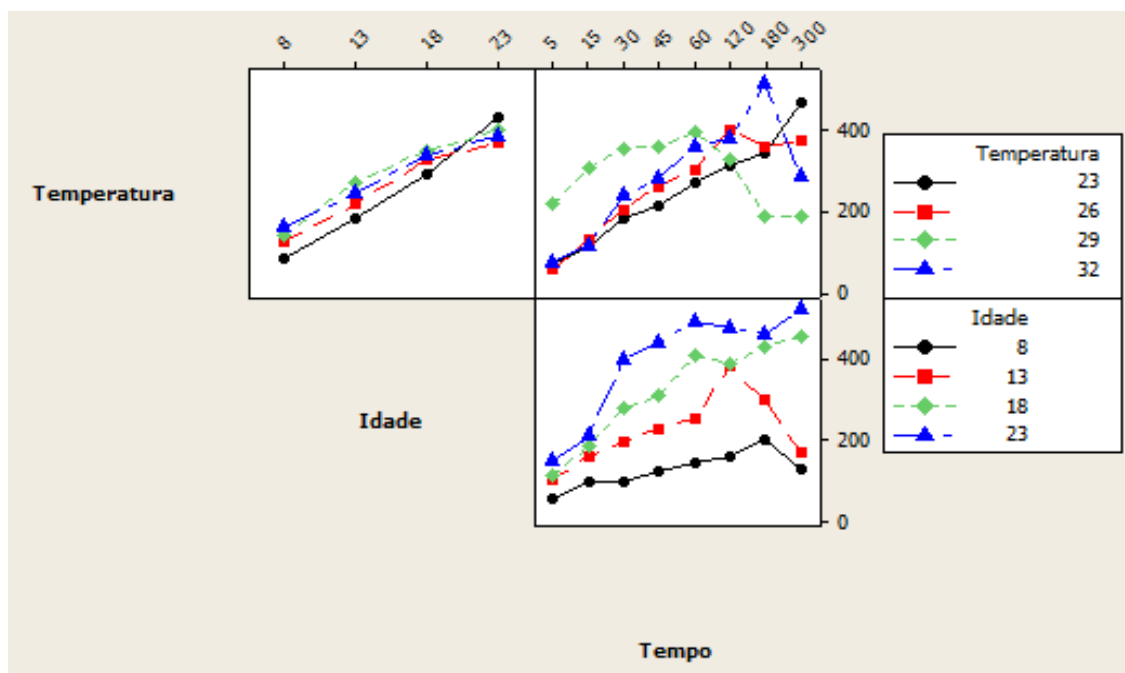


Figura 1. Interação entre temperatura, idade e tempo para consumo total de náuplios de artêmia por larvas de *L. alexandri*. (A) Interação temperatura x idade. (B) Interação temperatura x tempo. (C) Interação idade x tempo.

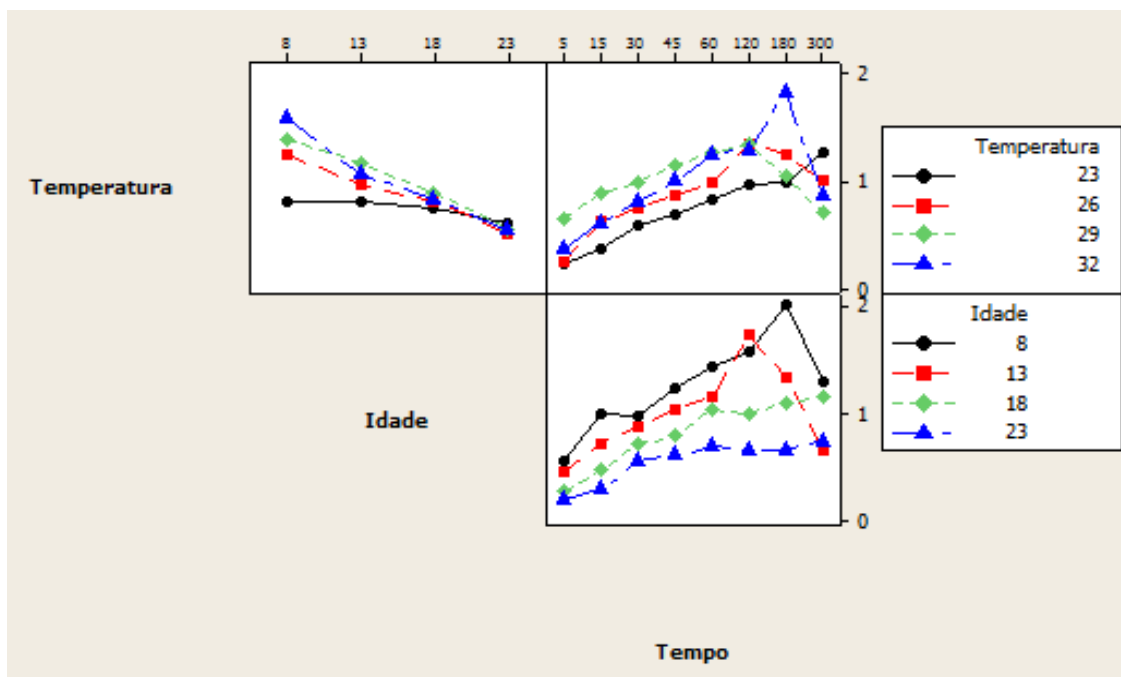


Figura 2. Interação entre temperatura, idade e tempo para taxa de consumo em porcentagem do peso vivo para larvas de *L. alexandri*. (A) Interação temperatura x idade. (B) Interação temperatura x tempo. (C) Interação idade x tempo.

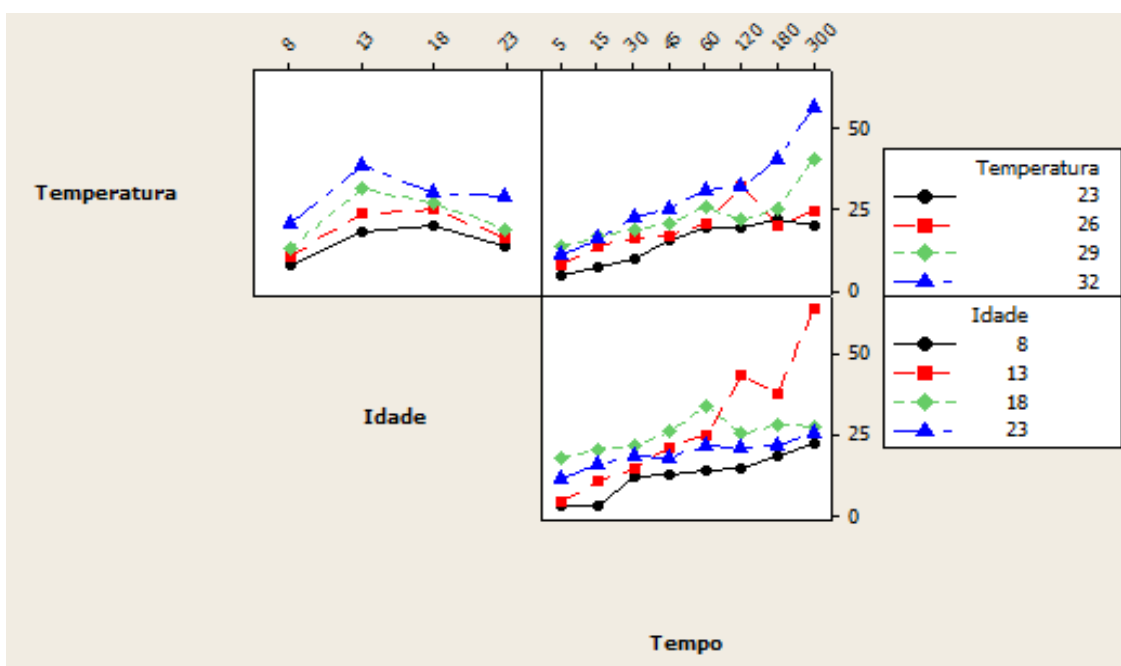


Figura 3. Interação entre temperatura, idade e tempo para taxa de náuplios digeridos para larvas de *L. alexandri*. (A) Interação temperatura x idade. (B) Interação temperatura x tempo. (C) Interação idade x tempo.

Discussão

A temperatura, idade e tempo apresentaram efeito de interação no consumo, consumo em porcentagem do peso vivo e taxa de digestão dos náuplios de artêmia. O efeito da temperatura é mais evidente nas idades de 18 e 23 DPE, com maiores consumos predominantemente observados em 29 °C, entre os tempos de 5 e 60 minutos. Este resultado é consistente com o relatado previamente em outro estudo para o *L. alexandri*, sendo recomendado temperaturas entre 29-32 °C para a alimentação durante os primeiros 15 dias de alimentação exógena para melhor desempenho (Takata et al., 2014).

Em função do aumento da idade e da temperatura há redução do tempo necessário para atingir a maior taxa de náuplios digeridos. Além disso, foi possível estimar com base no consumo de náuplios de artêmia que as larvas com 18 DPE são capazes de ingerir até $1,94 \pm 0,66$ % do peso vivo e $0,30 \pm 0,10$ MJ/larva de energia quando a temperatura foi mantida a 32 °C. A elevação da temperatura da água geralmente promove o aumento da demanda energética para manter o metabolismo (Pang et al., 2011; Fu et al., 2011). Assim, taxas de alimentação altas são normalmente necessárias para atender o requerimento em energia (Buentello et al., 2000). Similar ao presente estudo, a temperatura afetou o consumo de presas em traíras (*Hoplias mnalabaricus*) com redução à 14, 18 e 34 °C em relação a temperatura de 30 °C, apresentando um comportamento típico de espécies neotropicais (Petry et al., 2006). A redução nos níveis de alimentação em temperaturas reduzidas é uma das consequências do estresse pelo frio observado para as espécies *Piaractus mesopotamicus* (Dias-Koberstein et al., 2004), *Lates calcarifer* (Katersky e Carter, 2005; Bermudes et al., 2010), *Amphiprion clarkii* (Le et al., 2011) e *Cyprinus carpio* (Oyugi et al., 2012).

O consumo em relação ao peso vivo das larvas de *L. alexandri* apresentou comportamento diferente ao observado para o consumo de náuplios de artêmia. As temperaturas de 29 e 32 °C também proporcionaram as maiores taxas de ingestão. No entanto, as larvas com 8 DPE foram as que ingeriram a maior porcentagem do peso vivo quando comparado com as larvas com 13, 18 e 23 DPE. É conhecido que em larvas de peixes, a taxa de alimentação em relação ao peso vivo normalmente reduz com o aumento da idade (Deng et al., 2003). Por outro lado, é provável que neste estudo a diminuição da ingestão em relação ao peso vivo também ocorreu em função da redução da atratividade dos náuplios de artêmia, uma vez que o tamanho da larva do *L. alexandri* aumentou de $14,01 \pm 0,91$ mm com 8 DPE para $24,70 \pm 0,38$ mm com 23

DPE. Esta hipótese é sustentada pelo fato de apesar da disponibilidade de náuplios ter sido aumentada entre as fases, o tamanho do náuplio de artêmia foi o mesmo. Se sabe que o tamanho do predador em relação a presa é um importante fator determinante do sucesso de captura do alimento (Olsen et al., 2000; Legler et al., 2010).

No primeiro dia de alimentação as larvas de *L. alexandri* alimentadas na temperatura de 23 °C iniciam a digestão dos náuplios de artêmia cerca de 30 minutos após a ingestão. Nas demais temperaturas, o processo de digestão iniciou-se a partir de cinco minutos. Já no quinto dia de alimentação exógena, as larvas de *L. alexandri* iniciaram o processo de digestão dos náuplios de artêmia cerca de cinco minutos após a alimentação em todas as temperaturas testadas. Segundo Guimarães-Cruz et al. (2009) no momento da primeira alimentação exógena, as larvas de *L. alexandri* já apresentam esôfago, estômago, pâncreas, fígado e intestino com mucosa dobrada e células caliciformes, no entanto não se sabe ao certo sobre a real funcionalidade destas estruturas à nível enzimático. O presente estudo demonstra que no momento da primeira alimentação exógena as larvas já apresentam capacidade digestória dos náuplios de artêmia, com aceleração do processo digestivo nas temperaturas mais elevadas.

A digestão torna-se mais acentuada no decorrer do tempo a 29 °C e 32 °C, para todas as idades indicando que, nestas temperaturas, as larvas de *L. alexandri* são capazes de ingerir os náuplios e realizar a digestão ao mesmo tempo, contrário às larvas mantidas a 23 °C e 26 °C que acumulam os náuplios no estômago em função do baixo metabolismo para digestão. Este comportamento explica a grande quantidade de náuplios encontrados no tempo de 300 minutos, para as larvas com 13, 18 e 23 DPE nas temperaturas de 23 °C e 26 °C. Em peixes, a atividade enzimática digestiva (Kofuji et al., 2005) e a digestibilidade dos alimentos é afetada pela temperatura (Katersky e Carter, 2005; Legler et al., 2010), podendo assim explicar os resultados do presente trabalho para as larvas mantidas 23° e 26°C. O efeito negativo da temperatura está associado à redução da atividade enzimática de proteases, tripsina e quimiotripsina, lipase, alfa-amilase, enzimas glicolíticas e aspartato aminotransferase (AST) (Van Dijk et al., 2002; Hardewig e Van Dijk, 2003; Kofuji et al., 2005; Savoie et al., 2008; Bowyer et al., 2014) tornando o processo de digestão mais lento. Segundo Ibarz et al. (2010), a redução nos processos de digestão em temperaturas reduzidas também pode ocorrer devido ao desequilíbrio de íons plasmáticos e redução da atividade de Na^+/K^+ - ATPase no intestino. Além disso, já foi previamente relatado que a temperatura afeta a velocidade de passagem da digesta e, conseqüentemente, o tempo de digestão do

alimento (Sun e Chen, 2009; Pang et al., 2011). Por exemplo, em juvenis de *Salmo salar* a taxa de esvaziamento estomacal ocorreu de forma acentuada quando os animais foram alimentados a 18 °C, de modo à proporção de refeição que permanece no estômago diminuir de 100 para menos de 5% após 24 horas, enquanto nos animais alimentados a 6 °C esta proporção de alimento no estômago estava em torno de 50% (Handeland et al., 2008). Em *Seriola lalandi* o processo completo de digestão do alimento dura cerca de 12 a 16 horas quando os animais são mantidos a temperatura de 20,8 °C e de 36 á 48 horas quando a temperatura é reduzida para 12,6 °C (Miegel et al. 2010). Para espécies como *Lepomis macrochirus* e *Perca flavescens* as taxas de digestão ocorrem de forma acentuada a 22°C comparados aos animais alimentados a 7°C, onde a digesta permaneceu intacta (Legler et al., 2010).

Conclusões

O consumo de náuplios de artemia e a taxa de digestão em larvas de *L. alexandri* de diferentes idades ocorre de forma mais acentuada entre os tempos de 5 e 60 minutos quando a temperatura da água está em 29 °C. O consumo em porcentagem do peso vivo é mais elevado nas fases iniciais de alimentação. Em função do aumento da idade e da temperatura há redução do tempo necessário para atingir a maior taxa de náuplios digeridos. As temperaturas de 29 e 32 °C foram as que proporcionaram os resultados mais satisfatórios para consumo de náuplios de artemia, consumo em porcentagem do peso vivo e a taxa de digestão em larvas de *L. alexandri* de diferentes idades, em função do tempo de coleta pós alimentação.

Referências

- Abbink, W., Garcia, A. B., Roques, J. A. C., Partridge, G. J., Kloet, K., Schneider, O. 2011 The effect of temperature and pH on the growth and physiological response of juvenile yellowtail kingfish *Seriola lalandi* in recirculating aquaculture systems. *Aquaculture* 330-333,130-135. doi: 10.1016/j.aquaculture.2011.11.043
- Baras, E., Raynaud, T., Slembrouck, J., Caruso, D., Cochet, C., Legendre, M., 2011. Interactions between temperature and size on the growth, size heterogeneity, mortality and cannibalism in cultured larvae and juveniles of the Asian catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage). *Aquac. Res.* 42, 260–276. doi:10.1111/j.1365-2109.2010.02619.x

- Bermudes, M., Glencross, B., Austen, K., Hawkins, W. 2010. The effects of temperature and size on the growth, energy budget and waste outputs of barramundi (*Lates calcarifer*). *Aquaculture* 306, 160-166. doi: 10.1016/j.aquaculture.2010.05.031
- Buentello, J.A., Gatlin, D.M.III., Neill, W.H. 2000. Effects of water temperature and dissolved oxygen on daily feed consumption feed utilization and growth of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture* 182, 339-352. doi: 10.1016/S0044-8486(99)00274-4
- Bowyer, J. N., Qin, J. G., Adams, L. R., Thomson, M. J. S., David A.J., Stone, D. A.J. 2012. The response of digestive enzyme activities and gut histology in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) to dietary fish oil substitution at different temperatures. *Aquaculture* 368–369, 19–28. doi: 10.1016/j.aquaculture.2012.09.012
- Cingi, S., Keinanen, M., Vuorinen, P. J. 2010. Elevated water temperature impairs fertilization and embryonic development of whitefish *Coregonus lavaretus*. *J. Fish Biol.* 76, 502-521. doi: 10.1111/j.1095-8649.2009.02502.x
- Cordeiro, N.I.S., Costa, D.C., Silva, W.S.S., Takata, R., Miranda-Filho, K.C., Luz, R.K., 2016. High stocking density during larviculture and effect of size and diet on production of juvenile *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1876 (Siluriformes: Pseudopimelodidae). *J. Appl. Ichthyol.* 32, 61–66. doi:10.1111/jai.12963
- Dias-Koberstein, T. C. R., Carneiro, D. J., Urbinati, E. C. 2004. Comportamento alimentar de alevinos de pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) por meio das observações do tempo de retorno do apetite e do tempo de saciação dos peixes em duas temperaturas de cultivo. *Acta Sci. Anim. Sci.* 26, 339-344.
- Deng, D.F., Koshio, S., Yokoyama, S., Bai, S.C., Shao, Q., Cui, Y., Hung, S.S.O., 2003. Effects of feeding rate on growth performance of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) larvae. *Aquaculture* 217, 589–598. doi:10.1016/S0044-8486(02)00461-1
- Fu, S.J., Pang, X, Cao, ZD., Peng, J.L., Ya, G. 2011. The effects of fasting on the metabolic interaction between digestion and locomotion in juvenile southern catfish (*Silurus meridionalis*). *Comp. Biochem. Physiol. Part D* 158, 498–505. doi: 10.1016/j.cbpa.2010.12.013
- Guimarães-Cruz, R.J., Santos, J.E., Sato, Y., Veloso-Júnior, V.C. 2009. Early development stages of the catfish *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1877

- (Pisces: Pseudopimelodi) from the São Francisco River basin Brazil. *J. App. Ichthyol.* 25, 321–327. doi: 10.1111/j.1439-0426.2008.01153.x
- Handeland, S. O., Inslund, A. K., Stefansson, S. O. 2008. The effect of temperature and fish size on growth, feed intake, food conversion efficiency and stomach evacuation rate of Atlantic salmon post-smolts. *Aquaculture* 283, 36-42. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.06.042
- Hardewig, I., Van Dijk, P.L.M. 2003. Is digestive capacity limiting growth at low temperatures in roach? *J. Fish Biol.* 62, 358–374. doi: 10.1046/j.1095-8649.2003.00027.x
- Ibarz, A., Padrós, F., Gallardo, M.A., Fernández-Borrás, J., Blasco, J., Tort, L. 2010. Low-temperature challenges to gilthead sea bream culture: review of cold-induced alterations and ‘Winter Syndrome. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 20, 539-556.
- ICMbio, 2016. Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. Brasília.
- Johnston, T.A., Mathias, J.A., 1994. The effects of temperature on feeding in zooplanktivorous walleye, *Stizostedion vitreum*, larvae. *Environ. Biol. Fishes* 40, 189–198. doi:10.1007/BF00002545
- Katersky, R. S., Carter, C. G. 2005. Growth efficiency of juvenile barramundi, *Lates calcarifer*, at high temperatures. *Aquaculture*, 250, 775-780. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.05.008
- Kehoe, A.S., Volkoff, H., 2008. The effects of temperature on feeding and expression of two appetite-related factors, neuropeptide Y and cocaine- and amphetamine-regulated transcript, in Atlantic cod, *Gadus morhua*. *J. World Aquacult. Soc.* 39, 790-796. doi: 10.1111/j.1749-7345.2008.00215.x
- Kofuji, P. Y. M., Akimoto, A., Hosokawa, H., Masumoto, T. 2005. Seasonal changes in proteolytic enzymes of yellowtail *Seriola quinqueradiata* (Temminck & Schlegel; Carangidae) fed extruded diets containing different protein and energy levels. *Aquac. Res.* 36, 696-703. doi: 10.1111/j.1365-2109.2005.01276.x
- Le., Y. Yang, S.-Y., Zhu, X.-M., Liu, M., Lin, J.-Y., Wu, K.-C., 2011. Effects of temperature on survival, development, growth and feeding of larvae of Yellowtail clownfish *Amphiprion clarkii* (Pisces: Perciformes). *Acta Ecol. Sin.* 31, 241–245. doi:10.1016/j.chnaes.2011.06.003
- Legler, N.D., Johnson, T.B., Heath, D.D., Ludsin, S.A., 2010. Water temperature and prey size effects on the rate of digestion of larval and early juvenile fish. *Trans. Am. Fish. Soc.* 139, 868–875. doi:10.1577/T09-212.1

- Linløkken, A. N., Bergman, E., Greenberg, L. 2010. Effect of temperature and roach *Rutilus rutilus* group size on swimming speed and prey capture rate of perch *Perca fluviatilis* and *R. rutilus*. J. Fish Biol. 76, 900-912. doi: 10.1111/j.1095-8649.2010.02545.x
- Lombardi, D. C., Gomes, L. C., 2008. Substituição de alimento vivo por alimento inerte na larvicultura intensiva do tambacu (♀ *Colossoma macropomum* X ♂ *Piaractus mesopotamicus*). Acta Sci. Anim. Sci. 30, 467-472. doi: 10.4025/actascianimsci.v30i4.3835
- López, C.M., Edson, E., Sampaio, V., 2000. Sobrevivência e crescimento larval do pacamã *Lophiosilurus alexandri* Steindachner 1876 (Siluriformes, Pimelodidae), em função de três densidades de estocagem em laboratório. Acta Sci. 22, 491–494. doi: 10.4025/actascibiolsoci.v22i0.2934
- Luz, R.K., Santos, J.C.E., 2008. Densidade de estocagem e salinidade da água na larvicultura do pacamã. Pesqui. Agropecu. Bras. 43, 903–909. doi: 10.1590/S0100-204X2008000700015
- Luz, R. K., Santos, J. C. E. Pedreira, M.M., Teixeira, E.A. 2011. Effect of water flow rate and feed training on “pacamã” (Siluriforme: PseudopimelodiDPE) juvenile production. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 63, 973-979. doi: 10.1590/S0102-09352011000400024
- Ma, Z., 2014. Food ingestion, prey selectivity, feeding incidence, and performance of yellowtail kingfish *Seriola lalandi* larvae under constant and varying temperatures. Aquac. Int. 22, 1317–1330. doi:10.1007/s10499-013-9749-z
- McLeod, I.M., Clark, T.D., 2016. Limited capacity for faster digestion in larval coral reef fish at an elevated temperature. PLoS One 11, e0155360. doi:10.1371/journal.pone.0155360
- Melillo Filho, R., Takata, R., Santos, A.E.H., Silva, W.S., Ikeda, A.L., Rodrigues, L.A., dos Santos, J.C.E., Salaro, A.L., Luz, R.K., 2014. Draining system and feeding rate during the initial development of *Lophiosilurus alexandri* (Steindachner, 1877), a carnivorous freshwater fish. Aquac. Res. 45, 1913–1920. doi:10.1111/are.12139
- Menossi, O. C.C., Takata, R., Sánchez-Amaya, M.I., Freitas, T.M., Yúfera, M., Portella, M.C., 2012 Crescimento e estruturas do sistema digestório de larvas de pacu alimentadas com dieta microencapsulada produzida experimentalmente, R. Bras. Zootec. 41, 1-10.

- Miegel, R.P., Pain, S.J., Van Wettere, W.H.E.J., Howarth, G.S., Stone, D.A.J. 2010. Effect of water temperature on gut transit time, digestive enzyme activity and nutrient digestibility in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*). *Aquaculture* 308, 145-151. doi: 10.1016/j.aquaculture.2010.07.036
- Olsen, A.I., Attramadal, Y., Reitan, K.I., Olsen, Y. 2000. Food selection and digestion characteristic of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) larvae fed cultivated prey organisms. *Aquaculture*, 181, 293-310. doi: 10.1016/S0044-8486(99)00230-6
- Oyugi, D.O., Cucherousset, J., Baker, D.J., Britton, J.R. 2012. Effects of temperature on the foraging and growth rate of juvenile common carp, *Cyprinus carpio*. *J. Therm. Biol.*, 37, 89-94. doi: 10.1016/j.jtherbio.2011.11.005
- Pankhurst, N.W., King, H.R., 2010. Temperature and salmonid reproduction: Implications for aquaculture. *J. Fish Biol.* 76, 69–85. doi:10.1111/j.1095-8649.2009.02484.x
- Pang, X., Cao, Z-D, Peng, L.J, Fu, S-J. 2011. The effects of temperature on metabolic interaction between digestion and locomotion in juveniles of three cyprinid fish (*Carassius auratus*, *Cyprinus carpio* and *Spinibarbus sinensis*). *Comp. Biochem. Physiol. Part A* 159, 253-260. doi: 10.1016/j.cbpa.2011.03.013
- Pedreira, M.M., Luz, R.K., Santos, J.C.E., Sampaio, E.V., Silva, R.S.F., 2009. Biofiltração da água e tipos de substrato na larvicultura do pacamã. *Pesqui. Agropec. Bras.* 44, 511–518. doi:10.1590/S0100-204X2009000500011
- Peng, J., Zhen-Dong C., Shi-Jian F. 2014. The effects of constant and diel-fluctuating temperature acclimation on the thermal tolerance, swimming capacity, specific dynamic action and growth performance of juvenile Chinese bream. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 176, 32-40. doi: 10.1016/j.cbpa.2014.07.005. Epub 2014 Jul 12.
- Petry, A. C., Agostinho, A.A., Piana, P. A., Gomes, L. C. 2007. Effects of temperature on prey consumption and growth in mass of juvenile trahira *Hoplias aff. malabaricus* (Bloch, 1794). *J. Fish Biol.* 70, 1855-1864. doi: 10.1111/j.1095-8649.2007.01461.x

- Ribeiro, D.F.O., Nuñez, A.P.O. 2006. Feed preferences of *Salminus brasiliensis* (Pisces, Characidae) larvae in fish ponds. *Aquaculture*, 274, 65–71. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.11.012
- Santos, J.C.E., Luz, R.K. 2009. Effect of salinity and prey concentrations on *Pseudoplatystoma corruscans*, *Prochilodus costatus* and *Lophiosilurus alexandri* larviculture. *Aquaculture*, 287, 324-328. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.10.014
- Santos, J.C.E., Correia, E.S., Luz, R.K., 2015. Effect of daily artemia nauplii concentrations during juvenile production of *Lophiosilurus alexandri*. *Bol. Inst. Pesca* 41, 771–776.
- Savoie, A., Le François, N. R., Cahu, C., Blier, P. U. 2008. Metabolic and digestive enzyme activity profiles of newly hatched spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olafsen): effect of temperature. *Aquac. Res.* 39, 382-389. doi: 10.1111/j.1365-2109.2007.01797.
- Sun, L., Chen, H. 2009. Effects of ration and temperature on growth, fecal production, nitrogenous excretion and energy budget of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture*, 292, 197-206. doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.04.041
- Takata, R., Silva, W.D.S.E., Costa, D.C., Melillo Filho, R., Luz, R.K., 2014. Effect of water temperature and prey concentrations on initial development of *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1876 (Siluriformes: Pseudopimelodidae), a freshwater fish. *Neotrop. Ichthyol.* 12, 853–859. doi:10.1590/1982-0224-20140063
- Van Dijk, P. L. M., Staaks, G., Hardewig, L. 2002. The effect of fasting and refeeding on temperature preference, activity and growth of roach, *Rutilus rutilus*. *Oecologia*, 130, 496-504. doi: 10.1007/s00442-001-0830-3
- Vanhaecke, P., Steyaert, H. & Sorgeloos, P. 1980. International Study on Artemia. 3. The use of Coulter Counter equipment for the biometrical analysis of Artemia cysts. Methodology and mathematics. In: Persoone, G., Sorgeloos, P. Roels, O. & Jaspers, E. (eds.). The brine shrimp Artemia, 1. Universa Press, Wetteren: 107–115.
- Wang, N., Xu, X., Kestemont, P. 2009. Effect of temperature and feeding frequency on growth performances, feed efficiency and body composition of pikeperch

juveniles (*Sander lucioperca*). *Aquaculture*, 289, 70-73. doi:
10.1016/j.aquaculture.2009.01.002

Zhang, J., Guo, H., Ma, Z., Jiang, S., Wu, K., Li, Y., Qin, J.G., 2015. Effects of prey color, wall color and water color on food ingestion of larval orange-spotted grouper *Epinephelus coioides* (Hamilton, 1822). *Aquac. Int.* 23, 1377–1386. doi:10.1007/s10499-015-9890-y

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo constatou que o aumento da temperatura média da água de 24,4 °C para 29,0 °C estimulou a reprodução de *L. alexandri* sob condições controladas com resposta satisfatória para número de ovos, taxa de eclosão e sobrevivência das larvas.

Em trabalhos futuros, a utilização de maior número de coletas de sangue distribuídas em intervalos mais curtos, poderá ajudar a elucidar a dinâmica dos esteroides sexuais em reprodutores. Além disso, o manejo alimentar dos reprodutores não está completamente definido para o *L. alexandri*, principalmente em relação ao efeito da composição da dieta, frequência e taxa alimentar.

Com a análise do comportamento foi possível elaborar o primeiro etograma de comportamento reprodutivo para espécie. O comportamento dos reprodutores foi dividido em quatro categorias: inatividade; locomoção; comportamento de corte; comportamento reprodutivo.

A análise de Ressonância Magnética Nuclear demonstrou ser uma técnica com potencial na avaliação das respostas fisiológicas em função da variação de fatores ambientais. Em estudos futuros, a otimização de procedimentos de extração de metabólitos do soro e de diferentes tecidos, possibilitará obter maiores informações sobre metabolômica em *L. alexandri*.

Neste experimento foi possível determinar o padrão de consumo e digestão das larvas, informação que contribuirá para a melhoria do protocolo de larvicultura da espécie. A utilização das temperaturas de 29 e 32 °C no início da alimentação exógena mostrou-se vantajoso, por proporcionar o aumento do consumo alimentar e eficiência de digestão.