

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**PRIMEIRA MATURAÇÃO SEXUAL, CRESCIMENTO E BIOQUÍMICA SANGUÍNEA DE PACAMÃ  
(*Lophiosilurus alexandri*, STEINDACHNER, 1876)  
EM CONDIÇÕES CONTROLADAS**

**REINALDO MELILLO FILHO**

**Belo Horizonte**

**2020**

**REINALDO MELILLO FILHO**

**PRIMEIRA MATURAÇÃO SEXUAL, CRESCIMENTO E BIOQUÍMICA SANGUÍNEA DE PACAMÃ**  
*(Lophiosilurus alexandri, STEINDACHNER, 1876)*  
**EM CONDIÇÕES CONTROLADAS**

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: Produção Animal / Aquacultura

Prof. Orientador: Dr. Ronald Kennedy Luz

Coorientador: Dr. Nilo Bazzoli

**Belo Horizonte**

**2020**

F481p Filho, Reinaldo Melillo – 1986.  
Primeira maturação sexual, crescimento e bioquímica sanguínea de Pacamã (*Lophiosilurus alexandri*, Steindachner, 1876) em condições controladas/ Reinaldo Melillo Filho – 2020.

70p.: il.

Orientador: Ronald Kennedy Luz  
Coorientador: Nilo Bazzoli

Tese de Doutorado apresentado a Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

1- Pacamã- Teses - 2- Maturação - Teses – 3- Aquacultura - Teses - I- Luz, Ronald Kennedy -  
II – Bazzoli, Nilo – III - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – V – Título.

**CDD – 636.31**

**Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
COLEGIADO DO CURSO DE GRADUAÇÃO / PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

### FOLHA DE APROVAÇÃO

PRIMEIRA MATURAÇÃO SEXUAL, CRESCIMENTO E BIOQUÍMICA SANGUÍNEA DE PACAMÃ  
(*Lophiosilurus alexandri*, STEINDACHNER, 1876) EM CONDIÇÕES CONTROLADAS

**REINALDO MELILLO FILHO**

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **dezessete de fevereiro de dois mil e vinte**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Zootecnia da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes professores:

**ELIZETE RIZZO BAZZOLI**

Universidade Federal de Minas Gerais

**GLAUBER DAVID ALMEIDA PALHETA**

Universidade Federal do Pará

**RAFAEL MAGNO COSTA MELO**

Universidade Federal de Minas Gerais

**CINTIA LABUSSIÈRE NAKAYAMA**

Universidade Federal de Minas Gerais

Ronald Kennedy Luz- Orientador

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte, 08 de julho de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Ângela Maria Quintão Lana, Coordenador(a)**, em 08/07/2022, às 14:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1584715** e o código CRC **E4A19D7A**.

---

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esta tese à minha filha Stella, que veio neste último ano para nos trazer mais motivação e encher nossos corações de alegria.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu amigo e orientador, Prof. Dr. Ronald Kennedy Luz, pelo incentivo e constante dedicação ao desenvolvimento pessoal, profissional e científico de seus alunos. Nestes mais de dez anos de convivência sou testemunha do quanto sua orientação tem modificado, para melhor, a vida de muita gente. Muito obrigado!

Agradeço ao coorientador Prof. Dr. Nilo Bazzoli e equipe, pela colaboração valiosa nesta tese com as análises histológicas.

Agradeço à toda a equipe do laboratório de larvicultura da UFMG. A participação da equipe foi fundamental para condução dos experimentos.

Agradeço a amiga Thaiza Campideli pela ajuda com a estatística, formatação e elaboração dos gráficos.

Agradeço à minha esposa Amanda, pelo incentivo, companheirismo e compreensão nos momentos de ausência.

Agradeço aos meus pais e irmãs por sempre incentivarem e apoiarem meu desenvolvimento profissional.

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

## RESUMO

Este trabalho teve por objetivo avaliar o crescimento, tamanho e idade de primeira maturação, níveis hormonais e parâmetros bioquímicos de *Lophiosilurus alexandri*. Foram utilizados 400 juvenis produzidos no Laboratório de Aquicultura da UFMG. Após completar 90 dias pós-eclosão (DPE) foi iniciada a etapa de crescimento, onde os animais foram acompanhados até os 968 DPE. Durante o experimento, foram realizadas sucessivas amostragens de machos e fêmeas para análise histológica das gônadas, acompanhar o crescimento, mensuração dos índices hepatossomático (IHS) e gonadossomático (IGS). A partir da diferenciação macroscópica das gônadas, foram realizadas coleta de sangue, aos 372, 481, 845 e 968 DPE para análises bioquímicas. Análises hormonais (estradiol, testosterona e  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona) foram realizadas aos 845 e 968 DPE, quando já foram detectadas gônadas macroscopicamente desenvolvidas. Os dados obtidos foram sempre comparados entre machos e fêmeas de mesma idade e para indivíduos do mesmo sexo em idades diferentes. Não houve diferença para o crescimento em peso e comprimento entre machos e fêmeas ( $P > 0,05$ ). Machos completamente maduros foram encontrados aos 593 DPE, com  $29,88 \pm 1,76$  cm e  $444,1 \pm 77,03$  g. As fêmeas atingiram maturação avançada aos 845 DPE, com  $36,51 \pm 1,06$  cm e  $783,05 \pm 48,57$  g. Todos os hormônios avaliados apresentaram-se em níveis semelhantes entre machos e fêmeas aos 845 DPE ( $P > 0,05$ ). Contudo, aos 968 DPE houve aumento do nível de E2 nas fêmeas, diferindo também do valor encontrado para os machos neste momento ( $P < 0,05$ ). Para testosterona, aos 968 DPE foi registrado maior nível deste hormônio nas fêmeas ( $P < 0,05$ ). Os dados bioquímicos apresentaram poucas diferenças entre os sexos. Peixes machos apresentaram maiores valores de alanina aminotransferase (ALT) em 372 DPE, magnésio aos 481 DPE e triglicérides aos 372 DPE e 481 DPE, ( $P < 0,05$ ), entretanto a maioria dos dados bioquímicos analisados variou significativamente ( $P < 0,05$ ) para indivíduos do mesmo sexo em diferentes idades. Apenas lactato desidrogenase (LDH) para as fêmeas não apresentou variações ( $P > 0,05$ ). Os resultados do presente trabalho fornecem informações básicas e essenciais para o futuro do manejo da pesca e para o planejamento produção comercial de *L. alexandri*.

**Palavras chaves:** Bioquímica sanguínea, crescimento, pacamã, primeira maturação, reprodução.



## ABSTRACT

This work aimed to evaluate the growth, size and age of first maturation, hormonal levels and biochemical parameters of *Lophiosilurus alexandri*. Four hundred juveniles produced at the UFMG Aquaculture Laboratory were used. After completing 90 days after hatching (DAH), the growth stage began, where the animals were followed up to 968 DAH. During the experiment, successive sampling of males and females were performed for histological analysis of the gonads, monitoring growth, measurement of hepatosomatic (IHS) and gonadosomatic (IGS) indices. From the macroscopic differentiation of the gonads, blood was collected at 372, 481, 845 and 968 DAH for biochemical analysis. Hormonal analyzes (Estradiol, Testosterone and  $17\alpha$ -hydroxyprogesterone) were performed at 845 and 968 DAH, when macroscopically developed gonads were detected. The data obtained were always compared between males and females of the same age and for individuals of the same sex at different ages. There was no difference for growth in weight and length between males and females ( $P > 0.05$ ). Completely mature males were found at 593 DAH, with  $29.88 \pm 1.76$  cm and  $444.1 \pm 77.03$  g. The females reached advanced maturity at 845 DAH, with  $36.51 \pm 1.06$  cm and  $783.05 \pm 48.57$  g. All hormones evaluated were at similar levels between males and females at 845 DAH ( $P > 0.05$ ). However, at 968 DAH there was an increase in the level of E2 in females, also differing from the value found for males at this time ( $P < 0.05$ ). For testosterone, at 968 DAH a higher level of this hormone was recorded in females ( $P < 0.05$ ). Biochemical data showed little difference between sex. Biochemical data showed little difference between genders. Male fish showed higher values of alanine aminotransferase (ALT) in 372 DAH, magnesium at 481 DAH and triglycerides at 372 DAH and 481 DAH, ( $P < 0.05$ ), however most of the biochemical data analyzed varied significantly ( $P < 0, 05$ ) for individuals of the same sex at different ages. Only lactate dehydrogenase (LDH) for females showed no variation ( $P > 0.05$ ). The results of the present work provide basic and essential information for the future of fisheries management and for the commercial production planning of *L. alexandri*.

**Key words:** Blood biochemistry, growth, pacamã, first maturation, reproduction.

---

## LISTA DE FIGURAS

---

### Revisão de literatura

Figura 1. Desenho esquemático do eixo hipotálamo-hipofisário em peixes.....	15 16
Figura 2. Desenvolvimento oocitário em <i>Hoplias malabaricus</i> .....	
<b>Artigo 1:</b> Rearing and maturation of <i>Lophiosilurus alexandri</i> (Steindachner, 1876) in controlled conditions: first reports and future perspective	
Figure 1. (A) growth in weight of <i>L. alexandri</i> from 278 to 968 DAH; (B) growth in length of <i>L. alexandri</i> , from 278 to 968 DAH.....	38
Figure 2. (A) Gonadosomatic index (GSI %) of <i>Lophiosilurus alexandri</i> , from 481 to 968 DAH; (B) hepatosomatic index (HIS %) of <i>L. alexandri</i> , from 481 to 968 DAH.....	40
Figure 3. Transverse sections of testes of <i>Lophiosilurus alexandri</i> .....	43
Figure 4. Transverse sections of ovaries of <i>Lophiosilurus alexandri</i> .....	46
Figure 5. Levels of estradiol (E2) in <i>Lophiosilurus alexandri</i> at 845 and 968 DAH. (B) Levels of 17 $\alpha$ -OHP in <i>L. alexandri</i> at 845 and 968 DAH. (C) Levels of testosterone in <i>L. alexandri</i> at 845 and 968 DAH.....	48
<b>Artigo 2:</b> Parâmetros bioquímicos sanguíneos de <i>Lophiosilurus alexandri</i> (Steindachner, 1876), durante a fase de crescimento e primeira maturação sexual	
Figura 1. Valores médios de alanina aminotransferase (ALT) (A), aspartato transaminase (AST) (B), lactato desidrogenase (LDH) (C), cálcio (D), cloro (E) e magnésio (F) de <i>Lophiosilurus alexandri</i> em quatro idades após a eclosão (DAE).....	61
Figura 2. Valores médios de proteínas totais (A), albumina (B), ureia (C), glicose (D), triglicerídeos (E) e colesterol (F) de <i>Lophiosilurus alexandri</i> em quatro idades após a eclosão (DAE).....	62

---

## LISTA DE TABELAS

---

<b>Artigo 1:</b> Rearing and maturation of <i>Lophiosilurus alexandri</i> (Steindachner, 1876) in controlled conditions: first reports and future perspective	
Table 1. Distribution of <i>Lophiosilurus alexandri</i> among the different phases of the experiment and the different diets provided.....	34
Table 2. Descriptive data for growth, feed conversion rate and survival evaluated according to growth phase of <i>Lophiosilurus alexandri</i> fed commercial diet in a recirculation aquaculture system.....	37
Table 3. Histological characteristics of the testes of <i>Lophiosilurus alexandri</i> during growth at different stages of gonadal maturation.....	41
Table 4. Histological characteristics of the ovaries of <i>Lophiosilurus alexandri</i> during growth at different stages of gonadal maturation.....	44
<b>Artigo 2:</b> Parâmetros bioquímicos sanguíneos de <i>Lophiosilurus alexandri</i> (Steindachner, 1876), durante a fase de crescimento e primeira maturação sexual	
Tabela 1. Distribuição do <i>Lophiosilurus alexandri</i> entre as diferentes fases do experimento e as diferentes dietas fornecidas.....	58

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>14</b>
2.1. O pacamã.....	14
2.2 Maturação sexual em peixes .....	15
2.3 Índice gonadossomático .....	18
2.4 Índice hepatossomático .....	18
2.5 Fator de condição .....	19
2.6 Parâmetros bioquímicos .....	20
2.6.1 ALT e AST.....	20
2.6.2 LDH.....	21
2.6.3 Cálcio, Magnésio e Cloro.....	21
2.6.4 Proteína total e Albumina.....	22
2.6.5 Ureia.....	22
2.6.6 Glicose.....	23
2.6.7 Triglicérides e Colesterol .....	23
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>24</b>
3.1. Objetivo geral.....	24
3.2. Objetivos específicos.....	24
<b>4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>25</b>
<b>5. ARTIGO 1 .....</b>	<b>32</b>
<b>Rearing and maturation of <i>Lophiosilurus alexandri</i> (Steindachner, 1876) in controlled conditions: first reports and future perspective .....</b>	<b>32</b>
<b>6. ARTIGO 2.....</b>	<b>56</b>
<b>Parâmetros bioquímicos sanguíneos de <i>Lophiosilurus alexandri</i> (Steindachner, 1876), durante a fase de crescimento e primeira maturação sexual .....</b>	<b>56</b>
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>70</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O pacamã (*Lophiosilurus alexandri*) é um peixe nativo da bacia do Rio São Francisco que apresenta potencial de cultivo. Porém, seu crescimento e morfofisiologia reprodutiva até o momento foram pouco estudados.

Estudos sobre o desenvolvimento sexual em peixes são importantes, tanto para a cadeia produtiva da aquicultura, quanto para o monitoramento ambiental (Budd et al., 2015). Sob o ponto de vista ambiental, o conhecimento do tamanho à primeira maturação gonadal é fundamental para se determinar o tamanho mínimo de pesca para as espécies de vida livre (Da Silva Santos et al., 2015). Em zootecnia pode ser utilizado para se determinar o momento ideal para selecionar e compor lotes de reprodutores, evitando-se assim a subutilização de mão de obra e estruturas de cultivo (Sanches et al., 2011).

O controle da reprodução é essencial para peixes de interesse comercial. A manipulação de fatores bióticos e abióticos, a aplicação de tratamentos hormonais, o uso de técnicas de fertilização *in vitro* e de criopreservação de sêmen consistem em estratégias para promover ou aumentar a reprodução de peixes em cativeiro (Alvarenga et al., 2015). Desta maneira, a determinação de parâmetros quantitativos é fundamental, pois permite controlar e otimizar as taxas de fertilização e, conseqüentemente, promover o uso racional dos reprodutores em sistemas de cultivo (Sanches et al., 2011). Essa otimização pode ocorrer através do emprego de correta relação entre espermatozoides e ovócitos durante o processo de fertilização, pela seleção de reprodutores mais aptos à reprodução, pela identificação exata do período reprodutivo, ou até mesmo através da identificação de falhas de manejo que comprometam a viabilidade dos gametas (Leite et al., 2013). Além disso, o controle de parâmetros reprodutivos permite selecionar e manter no plantel indivíduos mais prolíficos e, também permite, determinar o momento ideal para substituição dos mesmos (Kodama et al., 2011).

A revisão a seguir tem por objetivo abordar os principais fatores que interferem no processo de maturação sexual, além de conceituar alguns parâmetros reprodutivos e bioquímicos de *L. alexandri*, que podem ser utilizados tanto em estudos com enfoque ambiental quanto para prática de reprodução assistida em peixes de interesse zootécnico.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. O pacamã

O *Lophiosilurus alexandri* (Steindachner, 1876) é um peixe carnívoro de água doce, da ordem Siluriformes, endêmico da bacia do rio São Francisco, onde é conhecido como pacamã, pacumã, pacamão ou niquin (Campeche et al., 2011). Sua carne é de excelente sabor (Sant'Ana et al., 2016), sem espinhos intramusculares e também desperta interesse no mercado de peixes ornamentais, devido à sua aparência exótica e peculiar (Santos e Luz, 2009). Essas características têm incentivado sua introdução na aquicultura (Lucanus e Mischook, 1997; Ribeiro et al., 2013). Em sua região de ocorrência sofre grande pressão de captura sobre os estoques naturais, o que o coloca na lista oficial de espécies ameaçadas de extinção, na categoria vulnerável (MMA, 2014). Foi introduzido na bacia do rio Doce, mas seu efeito sobre as espécies nativas não foi estudado (Barros et al., 2007).

Esta espécie apresenta desova parcelada e comportamento sedentário (Travassos, 1959). Libera seus ovos no substrato arenoso, onde o macho é geralmente o responsável pelo cuidado parental (Sato et al., 2003; Costa et al. 2015). Macroscopicamente, as gônadas de pacamã são pares, franjadas nos machos e saculiformes nas fêmeas (Barros et al., 2007). Sua larvicultura é realizada com sucesso através do emprego de alimento vivo (Melillo Filho et al., 2014; Santos et al., 2015).

Alguns autores afirmam que pacamã não apresenta dimorfismo sexual (Travassos, 1959; Sato et al., 2003). Entretanto, Lopes et al. (2013) descreveram diferenças entre as papilas urogenitais de machos e fêmeas adultos, que podem ser observadas a partir da inserção de uma sonda uretral na papila, com o intuito de identificar a presença do oviduto nas fêmeas (terceiro orifício). Melillo Filho et al. (2016) obtiveram melhor precisão para sexagem de pacamã por técnica cirúrgica de celiotomia, com observação direta das gônadas e precisão acima de 90% para ambos os sexos, enquanto que, para sexagem por sonda uretral, a taxa de precisão foi de 67,8% e 81,8% para machos e fêmeas, respectivamente. Contudo, a idade de primeira maturação gonadal nesta espécie ainda não foi descrita.

## 2.2 Maturação sexual em peixes

A maturação gonadal em peixes é desencadeada por sinais ambientais como fotoperíodo e temperatura, além de mecanismos genéticos que ativam sinais endócrinos (Zmora et al., 2014). O eixo hipotálamo-hipófise-gônadas atua como um papel central na regulação sobre o desenvolvimento reprodutivo em peixes de forma similar a outros vertebrados (Norris e Jones, 2012). Os sinais ambientais, como aumento da temperatura da água para espécies tropicais, estimulam a liberação de kisspeptina por regiões do encéfalo, incluindo o hipotálamo, a qual determina a produção e liberação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) pelo hipotálamo. O GnRH, por sua vez, estimula a adenohipófise a produzir e liberar gonadotrofinas, hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH). A kisspeptina também tem a capacidade de estimular diretamente na liberação de FSH e LH pela adenohipófise (Zmora et al., 2014). Estas gonadotrofinas atuam nas gônadas estimulando a produção de andrógenos, estrógenos e progestágenos, que promovem a maturação sexual (Figura 1). Nas fêmeas, o estímulo inicial se dá, principalmente, pela ação do FSH, que é responsável pelo crescimento do oócito e desenvolvimento folicular. O FSH estimula a síntese de aromatase pelas células da granulosa, que convertem a testosterona produzida pelas células da teca em estradiol. O estradiol, por sua vez, estimula a síntese hepática de vitelogenina, responsável pela vitelogênese ou acúmulo de vitelo nos oócitos, ocasionando o crescimento dos mesmos (Lister e van der Kraak, 2008). Nos machos, o FSH é responsável, via células de Sertoli, pela proliferação espermatogonial que representa a primeira fase da espermatogênese. Ao mesmo tempo, o FSH ativa receptores presentes nas células de Leydig estimulando a síntese e secreção de andrógenos (Ohta et al., 2007; García-Lopes et al., 2009). Nessa fase inicial, a testosterona é o principal andrógeno produzido nos testículos dos peixes e, possivelmente, auxilia no apoio à fase proliferativa, porém indiretamente, prevenindo a apoptose das células germinativas durante as primeiras divisões celulares (Almeida, 2013). Também nos machos a progesterona desempenha funções durante a maturação final, estimulando a meiose, espermiogênese e hidratação dos espermatozoides. Em ambos os sexos, a elevação dos níveis destes esteroides gonadais em conjunto com as gonadotrofinas circulantes causam a inibição da síntese de GnRH, controlando o processo por meio de feedback negativo (Norris e Jones, 2012).

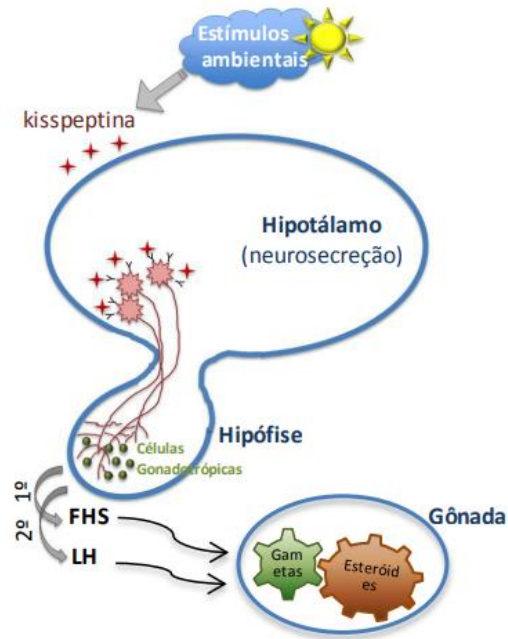


Figura 1: Desenho esquemático do eixo hipotálamo-hipofisário em peixes (Almeida, 2013).

Bazzoli (2003) sugere a classificação das gônadas em desenvolvimento nas seguintes classes:

**Imaturo:** Os ovários se apresentam em tamanho reduzido, ocupando menos de 1/3 da cavidade celomática, filamentosos, translúcidos, sem sinais de vascularização, os ovócitos não são vistos a olho nu e microscopicamente observam-se ovócitos na fase de ovogônia e em fase perinucleolar inicial, organizados em lamelas;

**Repouso:** as gônadas estão com o menor tamanho do ciclo, são delgadas e translúcidas, com pequena vascularização, ovários sem ovócito perceptível e microscopicamente observam-se lamelas ovulíferas e predomínio de ovócitos perinucleolares. Os testículos nesta fase apresentam-se reduzidos, filiformes e translúcidos e microscopicamente apresentam espermatogônias primárias isoladas e alguns cistos de espermatogônias secundárias e espermatócitos primários;

**Maturação inicial:** as gônadas iniciam a gametogênese e acumulam gradualmente seus produtos, fazendo aumentar seu peso, nos ovários os vasos sanguíneos e ovócitos são visíveis a olho nu. Microscopicamente observa-se maior incidência de ovócitos vitelogênicos de tamanhos variados, perinucleolares e alvéolo-corticais, além de alguns ovócitos atrésicos. Os testículos apresentam-se desenvolvidos, com forma lobulada e com certa pressão sua membrana se rompe, eliminando esperma leitoso e viscoso. Microscopicamente, apresentam cistos com células da linhagem germinativa em diferentes fases de desenvolvimento, sendo



observadas espermatogônias primárias e secundárias, assim como espermatócitos primários e espermatídes; no lume dos túbulos seminíferos observa-se uma pequena quantidade de espermatozoides;

**Maturação avançada/maduro:** Nas fêmeas as papilas genitais apresentam-se avermelhadas e o ventre abaulado e microscopicamente as gônadas apresentam lamelas ovulíferas preenchidas por ovócitos grandes em vitelogênese e pós-vitelogênese, com migração progressiva do núcleo para a periferia da célula (Figura 2). Ocorre a presença de reduzido número de ovócitos pré-vitelogênicos e cromatina-nucléolo. Já os machos apresentam testículos túrgidos, esbranquiçados, e ocupam grande parte da cavidade celomática; com fraca pressão rompe-se sua membrana, fluindo esperma, menos viscoso que no estágio anterior e microscopicamente observam-se cistos de espermatócitos primários e de espermatogônias secundárias, e os lumes dos túbulos seminíferos carregados de espermatozoides;

**Desovado:** Observado nas fêmeas, período seguinte à reprodução, após a eliminação dos gametas, as gônadas estão reduzidas em tamanho, flácidas e sanguinolentas e com ovócitos visíveis a olho nu. Microscopicamente há presença de muitos ovócitos perinucleolares e alguns ovócitos atrésicos nas lamelas ovulíferas com intensa reorganização das gônadas;

**Espermiado:** Nos machos, testículos flácidos, com aparência hemorrágica; a membrana não se rompe com pressão e microscopicamente os túbulos seminíferos encontram-se com lume aberto, podendo conter espermatozoides residuais e parede composta somente de espermatogônia.

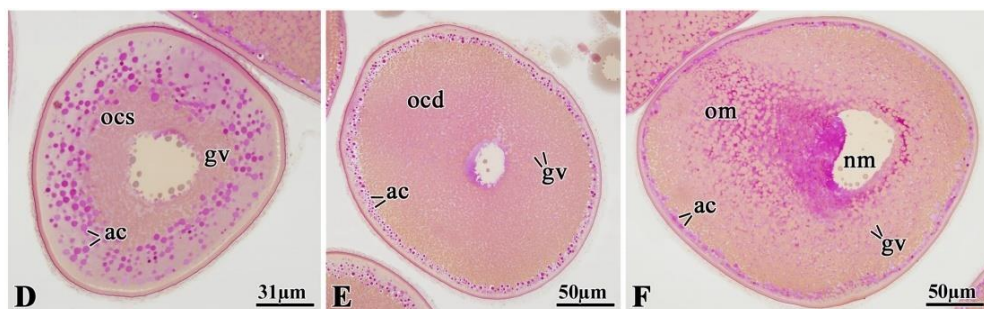


Figura 2. Desenvolvimento oocitário em *Hoplias malabaricus*, adaptado de Quagio-Grassiotto et al. (2013).

<sup>D</sup> Oócito em crescimento secundário com início de deposição de vitelo.

<sup>E</sup> Oócito completamente desenvolvido, com núcleo ligeiramente excêntrico e citoplasma repleto de grânulos de vitelo.

<sup>F</sup> Oócito em maturação avançada. Notar a migração do núcleo para a periferia da célula.

### 2.3 Índice gonadossomático

O índice gonadossomático (IGS) é um indicador eficiente do estado funcional dos ovários, devido à maturação das células reprodutivas ocorrer concomitantemente com o aumento do peso das gônadas (Andrade et al., 2006). Segundo Vazzoler (1996), o índice gonadossomático pode ser calculado de dois modos distintos:

- $IGS1 = (\text{peso da gônada (g)} / \text{peso do corpo (g)}) \times 100$
- $IGS2 = (\text{peso da gônada (g)} / \text{peso do corpo (g)} - \text{peso da gônada (g)}) \times 100$

Entretanto, os valores de IGS2 mostram de maneira mais acentuada as variações do estado fisiológico dos ovários.

Este índice é utilizado em estudos de primeira maturação sexual (Rodrigues-Filho et al., 2011) como também para melhor compreender a biologia reprodutiva de peixes em ambiente natural (Erthal et al., 2015).

Romagosa et al. (2018) em estudo de primeira maturação de cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* (Siluriformes, Pimelodidae), em condições de cultivo, encontraram maiores valores de IGS coincidindo com o período de maturação sexual das fêmeas e maiores valores de temperatura da água entre os meses de novembro a fevereiro. Durante o ciclo reprodutivo de *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae) em cativeiro, Tolussi et al. (2018) encontraram correlação direta entre altos níveis de proteína e lipídios nos ovários e o IGS.

Ao correlacionar o IGS com níveis de hormônios esteroides sexuais de *Eremophilus mutisii* (Siluriformes: Trichomyteridae), Landines et al. (2017) observaram que nas fêmeas, os picos de estradiol coincidiram com os maiores valores de IGS, enquanto a testosterona manteve seu valor baixo, independentemente desse índice. Já nos machos, a relação entre testosterona e IGS também foi coincidente, embora não tenha sido tão evidente quanto nas fêmeas. Não foi observada tendência clara entre a razão estradiol e IGS para os machos.

A utilização do IGS na prática de reprodução assistida em aquicultura fica limitada uma vez que é necessário sacrificar o animal para obtê-lo.

### 2.4 Índice hepatossomático

O índice hepatossomático (IHS) é obtido pela seguinte equação:

- $IHS = (\text{peso do fígado (g)} / \text{peso total (g)}) \times 100$

Este índice reflete a proporção existente entre o peso do fígado e o peso total do animal, que tende a diminuir frente à mobilização de reservas energéticas (glicogênio hepático), transferidas para as gônadas no final do processo de maturação ovocitária e espermiacão, apresentando assim correlação negativa com IGS (Andrade et al., 2006). Costa et al. (2005) observaram correlação negativa entre IHS e índice de gordura celomática para *L. copelandii*, demonstrando uma possível hipertrofia hepática para o catabolismo das reservas lipídicas, que seriam, então, direcionadas ao processo de vitelogênese. Assim, a variação sazonal do IHS é um dado auxiliar importante para determinação do período reprodutivo.

## 2.5 Fator de condição

A relação entre peso e comprimento corporal permite calcular o Fator de Condição (K). Maiores valores de K correspondem a indivíduos com maior massa em um dado comprimento. Portanto, este é um indicador quantitativo do grau de bem-estar momentâneo do peixe, que varia durante o ciclo de maturidade sexual do indivíduo e em função do peso das gônadas, dentre outros fatores (Rebouças et al., 2014). Para peixes migradores, valores menores de K tendem a acompanhar a proximidade do período reprodutivo, apresentando relação inversa com o IGS, devido a que neste período a intensidade alimentar pode cessar e a gordura visceral é então utilizada durante o processo de desenvolvimento das gônadas e migração (Silva Filho et al., 2012). Já para espécies de comportamento sedentário (não migradoras) ocorre o inverso, maiores valores de K são observados durante o período reprodutivo, devido ao acúmulo de reservas energéticas (Costa et al., 2005).

O fator de condição pode ser obtido pela expressão  $K=W/L^3$  (fator de condição de Fulton), ou pela expressão  $K=W/L^b$  (fator de condição alométrico) onde b é estimado pela equação da relação peso-comprimento ( $W=aL^b$ ; onde W é o peso e L é o comprimento total e a e b são estimativas dos parâmetros de correlação), após a transformação logarítmica e ajuste pelo método dos mínimos quadrados dos dados (Araújo et al., 2011). O fator de condição de Fulton assume que a relação entre peso e comprimento é isométrica, ou seja, o peso aumenta com o comprimento elevado ao cubo. Por outro lado, o fator de condição alométrico considera que as várias espécies de peixes podem ter diferentes relações entre peso e comprimento (Cavalcante et al., 2012). Assim, o fator de condição alométrico apresenta maior precisão por levar em consideração as diferenças nos padrões de crescimento que são espécie-específicos.

## 2.6 Parâmetros bioquímicos

Os níveis plasmáticos de parâmetros bioquímicos de peixes, quando comparados a valores de referência para uma determinada espécie, fornecem importantes informações sobre o status metabólico destes animais. Porém, durante o processo de crescimento de pacamã até a primeira maturação, não existem dados comparativos entre machos e fêmeas e entre animais de diferentes tamanhos ao longo do crescimento. Portanto, a seguir serão descritos alguns destes parâmetros e como variações em seus níveis podem ser interpretadas.

### 2.6.1 ALT e AST

As determinações da atividade das enzimas alanina-aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) são utilizadas como marcadores de lesão hepática e o aumento da sua atividade sérica pode ser decorrente da ruptura dos hepatócitos, que ocorre como resultado de processos patológicos que levam a necrose celular (Kaneko, 1989). A ALT tem localização citoplasmática, está presente em alta concentração no fígado e menor concentração nos rins e músculos. Sua principal característica funcional é ser um bom indicador de doenças hepáticas agudas (doenças hepatocelulares, necrose hepática, obstrução biliar, intoxicação e infecções parasitárias). O aumento da ALT está relacionado com o número de células envolvidas, ou seja, com a extensão e não com a gravidade da lesão. Portanto, uma lesão que não cause morte celular pode ser suficiente para que ocorra a liberação de ALT na corrente sanguínea (Thulin et al. 2016). A enzima ALT é responsável por catalisar de forma específica a transferência do grupo amina da alanina para o cetoglutarato, com formação de glutamato e piruvato, sendo que este último é reduzido à lactato por ação da lactato desidrogenase (Galante, 2012). A AST é uma enzima mitocondrial e citossólica que, portanto, necessita de uma lesão maior para que seja liberada na corrente sanguínea. A AST catalisa especificamente a transferência do grupo amina do ácido aspártico para o cetoglutarato com formação de glutamato e oxalacetato, o qual é reduzido a malato por ação da malato desidrogenase (MDH), enquanto a coenzima NADH é oxidada à NAD (Galante, 2012).

### 2.6.2 LDH

A lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima presente em vários tecidos, principalmente no músculo esquelético, músculo cardíaco, fígado e eritrócitos, como também nos rins, ossos e pulmões. Esta enzima não possui especificidade para nenhum órgão, existindo diversas isoenzimas conhecidas em peixes. Lesões musculares de etiologias variadas podem estar relacionadas ao aumento da LDH (Sinha and Ray, 2018). Além disso, uma de suas principais finalidades é participar da atividade de glicólise no interior das células musculares. Por isso LDH é retida no interior destas células durante atividades anaeróbicas que dependem de movimentos de natação em rajada. Estas atividades estão associadas a comportamentos como desova, migração, busca de presas e prevenção de predadores. Por isso em peixes, LDH tem sido utilizada como parâmetro para diferenciar o metabolismo muscular e dimorfismo de tamanho de maturação sexual entre machos e fêmeas, que podem apresentar diferenças de comportamento. Desta maneira é esperado que indivíduos com maior atividade muscular anaeróbica apresentem maior retenção de LDH nos tecidos, diminuindo os níveis plasmáticos (Schoenebeck et al, 2018).

### 2.6.3 Cálcio, Magnésio e Cloro

Os eletrólitos séricos como cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) e cloro ( $\text{Cl}^-$ ) são comumente usados para determinar a características fisiológicas, toxicidade e estado de saúde dos peixes (Kulkarni, 2017). Os níveis de eletrólitos indicam a operação de uma variedade de mecanismos homeostáticos no corpo. Os íons divalentes de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), por exemplo, tem várias funções em peixes. Combinam-se com fósforo para a deposição óssea durante o crescimento enquanto os ossos atuam como reservatório de cálcio para o plasma e os tecidos. O cálcio também é fundamental na reprodução e na função mitocondrial e tem um papel importante na osmorregulação (Dogan e Canli, 2019). Cloro e magnésio são componentes essenciais de fluidos corporais, como sangue e urina e, ajudam a regular a distribuição de água ao longo do organismo além de desempenhar um papel importante no equilíbrio ácido básico, a deficiência destes componentes em peixes provoca drástica diminuição do crescimento e da sobrevivência (Gatlin et al., 1982).

#### 2.6.4 Proteína total e Albumina

O nível de proteína total é um importante indicador do status nutricional e imunológico. Esta pode ser fracionada em albumina, alfa globulina, beta globulina e gama globulina. A gama globulina, produzida pelos linfócitos e células plasmáticas, contém anticorpos, denominados genericamente de imunoglobulinas (Swenson, 1988). A albumina é a proteína mais abundante no sangue, correspondendo a até 55% da proteína total (Fedonenko et al., 2016). Apesar da complexidade de fatores que interferem em seu nível sanguíneo como, aporte de aminoácidos para sua síntese, perda, degradação, meia-vida longa e distribuição entre intra e extra-vascular (Rothschild et al., 1972), ela continua sendo importante parâmetro bioquímico para avaliação de estado nutricional e de índice prognóstico em várias doenças, principalmente as hepáticas por sua forma de detecção ser de baixo custo e de fácil acesso (Cabral et al. 2001). Em peixes, a albumina sérica desempenha um papel importante na manutenção o equilíbrio osmótico entre o sangue circulante e as membranas teciduais (Harper et al., 1997). Ela é a principal proteína envolvida no carregamento e distribuição de substâncias tóxicas no organismo e por isso é um bom biomarcador da exposição de peixes a poluentes, apresentando redução nestas situações (Khan, et al., 2016). A albumina sanguínea também é responsável pelo transporte de lipídios (Acharya e Mohanty, 2014) e hormônios esteróides (Shahsavani et al., 2010).

#### 2.6.5 Ureia

A ureia é um produto do metabolismo endógeno da proteína, encontrado em elevadas concentrações no plasma de elasmobrânquios marinhos (Evans et al., 2004). Porém, sabe-se que tanto teleósteos marinhos quanto nos grupos de água doce (elasmobrânquios e teleósteos) não é utilizada para osmorregulação (Duncan et al., 2009). A concentração de ureia no sangue representa principalmente um equilíbrio entre a formação de ureia a partir do catabolismo protéico e a excreção de ureia pelos rins. A formação de ureia ocorre principalmente no fígado, portanto o declínio da ureia pode indicar doença hepática ou inanição (Kulkarni, 2017). Por outro lado, em algumas espécies de peixes o aumento da concentração de ureia pode ocorrer como via metabólica secundária para detoxificação de amônia, entretanto esta via metabólica promove maior gasto energético (Zimmer et al., 2017). Peixes de água doce saudáveis normalmente apresentam níveis de ureia abaixo de 10 mg/dl (Kulkarni, 2017).

### 2.6.6 Glicose

A glicose é essencial para o funcionamento dos tecidos e animais vertebrados possuem a habilidade de manter a concentração de glicose sanguínea em nível relativamente constante (Hertz et al., 1989). Entretanto, a glicemia aumenta na presença de fatores estressantes para suprir a maior demanda energética nestas situações. Por isso, a partir da mensuração da glicose é possível estimar o nível de estresse ao qual o animal foi submetido, de forma que este parâmetro é uma das respostas fisiológicas secundárias mais utilizadas como indicador de estresse em peixes (Malini, et al, 2018; Zielasko et al, 2019). Peixes carnívoros, mesmo quando alimentados com ração comercial, que contém ingredientes de origem vegetal, tendem a permanecer com baixas concentrações de glicose no sangue, quando comparados aos peixes onívoros (Gomes et al. 2019).

### 2.6.7 Triglicérides e Colesterol

As reservas lipídicas representam grandes reservas de energia em peixes e durante a maturação sexual, são mobilizados e direcionados do tecido previamente armazenado às gônadas, a fim de sustentar seu desenvolvimento (Nicula et al., 2010). Colesterol e triglicérides são indicadores metabólicos de mobilização energética e restrição alimentar em peixes (Jia et al., 2018). O colesterol sérico e os triglicérides diminuem durante períodos de restrição alimentar e essa redução desencadeia a mobilização de reservas energéticas para suprir a demanda metabólica (Costas et al., 2011).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Avaliar a idade, crescimento e tamanho de primeira maturação gonadal em pacamã alimentados com dietas formuladas, em sistema de recirculação de água com controle total das condições ambientais.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Realizar a engorda e avaliar o desempenho de pacamã até o momento de primeira maturação;
- Quantificar hormônios esteroides sexuais em pacamãs;
- Estimar do tamanho e idade de primeira maturação de pacamã.
- Determinar IHS e IGS de pacamã em diferentes estádios de desenvolvimento.
- Verificar parâmetros bioquímicos plasmáticos, relativos à idade e o sexo durante o crescimento de pacamã.



#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acharya G., Mohanty P. K. Haematological and serum biochemical parameters in different sexes of walking catfish *Clarias batrachus* (Linnaeus, 1758). *Int. J. Sci. Res.* v.3, p.1914- 1917, 2014.
- Almeida, F.L. Endocrinologia aplicada na reprodução de peixes. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* v.37, n.2, p.174-180, 2013.
- Alvarenga, É. R., Sales, S. C. M., Santos, C. R., Manduca, L.G., Turra, E. M. Eficiência e controle da reprodução de peixes de interesse comercial. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.39, n.1, p.202-207, 2015.
- Andrade, D. R., Pereira, M. C., Júnior, M. V. V., Costa, A. P. R., Yasui, G. S. Acompanhamento de um ciclo reprodutivo anual em machos de piau-vermelho (*Leporinus copelandii*, Pisces, Anostomidae) em ambiente natural. *Rev. Ceres*, v.53, n.305, p.45-53, 2006.
- Araújo, C.C., Flynn, M. N., Pereira, W. R. L. Indicadores de qualidade da água e biodiversidade do Rio Jaguari-Mirim no trecho entre as pequenas centrais hidrelétricas de São José e São Joaquim, São João da Boa Vista, São Paulo. *Rev. Inter*, v.4, n.3, p.51-64, 2011.
- Barros, M. D. M., Cruz R. J. G., Júnior V.L C. V., Santos J. E. Reproductive apparatus and gametogenesis of *Lophiosilurus alexandri* Steindachner (Pisces, Teleostei, Siluriformes). *Rev. Bras. Zool.*, v.24, p.213-221, 2007.
- Bazzoli, N. Parâmetros reprodutivos de peixes de interesse comercial na região de Pirapora. In: Godinho HP, Godinho AL (Org.). *Águas, peixes e pescadores do São Francisco da Minas Gerais*. Belo Horizonte: PUC Minas, p.291-306, 2003.
- Budd, A. M., Banh, Q. Q., Domingos, J. A., Jerry, D. R. Sex control in fish: approaches, challenges and opportunities for aquaculture. *J. Mar. Sci. Eng.*, v.3, n. 2, p. 329-355, 2015.
- Cabral, V. L. R., Carvalho, L., Miszputen, S. J. Importance of serum albumin values in both nutritional and inflammatory activity assessment in patients with Crohn's disease. *Arq. Gastroenterol*, v.38, n.2, p.104-108, 2001.

- Campeche, D. F. B., Balzana, L., Figueiredo, R. C. R., Barbalho, M. R., Reis, F. D. S., Melo, J. F. B. Peixes nativos do Rio São Francisco adaptados para cultivo. Embrapa Semiárido-Documentos (Infoteca-e), 2011.
- Cavalcante, L. F. M., Oliveira, M. R., Chellappa, S. Aspectos reprodutivos do ariacó, *Lutjanus synagris* nas águas costeiras do Rio Grande do Norte. Bio. Amaz., v.2, n.1, p.45-50, 2012.
- Costa, D. C., Silva, W. D. S., Melillo Filho, R., Miranda Filho, K. C., Dos Santos, J. C. E., Luz, R. K. Capture, adaptation and artificial control of reproduction of *Lophiosilurus alexandri*: A carnivorous freshwater species. Anim. Reprod. Sci., v.159, p.148-154, 2015.
- Costa, A. P. R., Andrade, D. R. D., Vidal Junior, M. V., Souza, G. Indicadores quantitativos da biologia reprodutiva de fêmeas de piau-vermelho no Rio Paraíba do Sul. Pesq. Agropec. Bras., v.40, n.8, p.789-795, 2005.
- Costas, B., Aragão, C., Ruiz-Jarabo, I., Vargas-Chacoff, L., Arjona, F. J., Dinis, M. T., Conceição, L. E. Feed deprivation in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) juveniles: effects on blood plasma metabolites and free amino acid levels. Fish. Physiol. Biochem., v.37, n.3, p.495-504, 2011.
- Da Silva Santos, R., Do Carmo Silva, J. P., Da Costa, M. R., Araújo, F. G. O tamanho de primeira maturação como parâmetro para estabelecimento de tamanho mínimo de captura para corvina no Sudeste do Brasil. Bol. Inst. Pesca, v.41, n.3, p.507-518, 2015.
- Dogan, A., Canli, M. Investigations on the Osmoregulation System of Freshwater Fish (*Oreochromis niloticus*) Exposed to Mercury in Differing Salinities. Turk. J. Fish. Aquat. Sc., v.19, n.12, p.1061-1068, 2019.
- Dos Santos, J. C. E., De Souza C. E., Luz, R. K. Effect of daily artemia nauplii concentrations during juvenile production of *Lophiosilurus alexandri*. Bol. Inst. Pesca, São Paulo, v.41, p.771-776, 2015.
- Duncan, W.P., Costa, O.T.F., Araújo, M.L.G, Fernandes, M.N. Ionic regulation and  $Na^+ - K^+$  - ATPase activity in gills and kidney of the freshwater stingray *Paratrygonaireba* living in the white and blackwaters in the Amazon basin. J. Fish Biol., v. 74, p. 956-970, 2009.
- Erthal, A. P. R. C., Andrade, D. R., Radael, M. C., Junior, M. E., Shimoda, E. Reproductive cycle of *Leporinus copelandii* (Pisces: Anostomidae) females from the lower Paraíba do Sul river basin, RJ–Brazil. Acta. Biom. Bras., v.6, n.2, p.116-128, 2015.

- Evans, David H.; Piermarini, Peter M.; Choe, Keith P. Homeostasis: osmoregulation, pH regulation, and nitrogen excretion. In: *Biology of Sharks and their Relatives*. Crc. Press., p. 254-275, 2004.
- Fedonenko, O., Sharamok, T., Ananieva, T. Biochemical parameters of blood in fish from Zaporozhian Reservoir. *Int. Lett. Nat. Sci.*, v.51, p.43-50, 2016.
- Galante, F., Araújo, M. V. F. *Fundamentos de bioquímica: para universitários, técnicos e demais profissionais da área de saúde / São Paulo: Rideel, 2012.*
- Gatlin Iii, D. M., Robinson, E. H., Poe, W. E., Wilson, R. P. Magnesium requirement of fingerling channel catfish and signs of magnesium deficiency. *J. Nutr.*, v.112, n.6, p.1182-1187, 1982.
- Gomes, V. D. S., De Lima Amâncio, A. L., Cavalcanti, C. R., Batista, J. M. M. Análise das características corporais do peixe *Betta splendens*. *Vis. Acad.*, v.20, n.3, 2019.
- Harper, H. A., Rodwell, V. W., Mayes, P. A. *Review of physiological chemistry*. Lange medical publications, Los Anglos, Ca. Usa. 1997.
- Hertz, Y.; Madar, Z.; Hephher, B.; Gertler, A. Glucose metabolism in the common carp (*Cyprinus carpio* L.): the effects of cobalt and chromium. *Aquaculture*, v. 76, p. 255-267, 1989.
- Jia, Y., Gao, Y., Chen, X., Huang, B. Determination of optimal fasting time before blood sampling to get baseline data on serum biochemical characteristics in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, v.487, p.83-88, 2018.
- Kaneko J. J. *Clinical biochemistry of domestic animals*, 4th ed. Academic. Press. Inc, California, USA, 1989.
- Khan, A., Shah, N., Muhammad, M., Khan, M. S., Ahmad, M. S., Farooq, M., Adnan, M., Jawad, S. M., Ullah, H., Yousafzai, A. M. Quantitative determination of lethal concentration Lc 50 of atrazine on biochemical parameters; total protein and serum albumin of freshwater fish grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) *Pol. J. Environ. Stud.*, v.25, n.4, p.1555-1561, 2016.
- Kodama, G., Annuniação, W. F., Sanches, E. G., Gomes, C. H. A. M., Tsuzuki, M. Y. Viabilidade econômica do cultivo do peixe-palhaço, *Amphiprion ocellaris*, em sistema de recirculação. *B. Inst. Pesca*, v.37, n.1, p.61-72, 2011.
- Kulkarni, Raghavendra S. Sex differences in the blood biochemical parameters of the fresh water fish, *Notopterus notopterus* (Pallas, 1789). *W. N. Nat. Sc.*, n.6, p.44-51, 2017.

- Landines, M. A., Prieto, C. A., Rodríguez, L., Rosado, R. Profile of sexual steroids of the Capitán de la Sabana (*Eremophilus mutisii*) during a complete hydrological cycle. Rev. U.D.C.A Act. e Div. Cient. V.20, n.1, p. 43-50, 2017.
- Leite, L. V., Melo, M. A. P., Oliveira, F. C. E., Pinheiro, J. P. S., Campello, C. C., Nunes, J. F., Salmito-Vanderley, C. S. B. Determinação da dose inseminante e embriogênese na fertilização artificial de tambaqui (*Colossoma macropomum*). Arq. Bras. Med. Vet. Zootec, v.65, n.2, p.421-429, 2013.
- Lister, A.L., Van Der Kraak G. An investigation into the role of prostaglandins in zebrafish oocyte maturation and ovulation. Gen. Comp. Endocrinol, v.159, p.46-57, 2008.
- Lopes, J. P., França, F. L., Neto, M. A. S. O domínio na produção de alevinos de pacamã – Propagação na Chesf permite repovoamento no rio São Francisco. Pan. da Aquicult., v.23, n.136, p.24-29, 2013
- Lucanus, O., Mischok, S. N. Interesting imports. Trop. Fish Hob. Nep., v.45, p.24-28, 1997.
- Malini, D. M., Apriliandri, A. F., Arista, S. Increased blood glucose level on pelagic fish as response to environmental disturbances at east coast pangandaran, west java. In: IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. IOP Publishing, v.166, p. 012011, 2018.
- Melillo Filho, R., Takata, R., Santos, A. E. H., De Souza E Silva, W., Ikeda, A. L., Rodrigues, L. A., Luz, R. K. Draining system and feeding rate during the initial development of *Lophiosilurus alexandri* (Steindachner, 1877), a carnivorous freshwater fish. Aquacult. Res., v.45, p.1913-1920, 2014.
- Melillo Filho, R., Gheller, V. A., Chaves, G. V., E Silva, W. D. S., Costa, D. C., Figueiredo, L. G., Julio, G.S.C., Luz, R. K. Early sexing techniques in *Lophiosilurus alexandri* (Steindachner, 1876), a freshwater carnivorous catfish. Theriogenology, v.86, n.6, p.1523-1529, 2016.
- MMA, Brasil. Portaria do Ministério do Meio Ambiente nº 445, de 17 de dezembro de 2014. Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção – Peixes e Invertebrados Aquáticos. 2014.
- Nicula, M., Bura, M., Simiz, E., Banatean-Dunea, I., Patruica, S., Marcu, A., Lunca, M., Szelei, Z. Researches concerning reference values assessment of serum biochemical parameters in some fish species from Acipenseridae, Cyprinidae, Esocidae and Salmonidae family. Sci. Pa. Anim. Sci. Biotechno., v.43, n.1, p.498-505, 2010.
- Norris, D., Jones, R. (Ed.). Livro: Hormones and reproduction in fishes, amphibians, and reptiles. Springer Science Business Media, 2012.

- Ohta, T., Miyake, H., Miura, C., Kamei, H., Aida, K., Miura, T. Follicle-stimulating hormone induces spermatogenesis mediated by androgen production in Japanese Eel, *Anguilla japonica*. Biol. Reprod., v.77, p.970-977, 2007.
- Quagio-Grassiotto, I., Wildner, D. D., Ishiba, R. Gametogênese em peixes: aspectos relevantes para o manejo reprodutivo. Rev. Bras. Reprod. Anim., v.37, n.2, p.181-191, 2013.
- Rebouças, P. M., Maciel, R. L., Costa, B. G. B., Galvão, J. A. S., Barbosa Filho, J. A. D. Análise do bem-estar dos reprodutores de *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) através da relação peso-comprimento, fator de condição e produção de alevinos. Biosci. J., v.30, n.5, p.873-881, 2014.
- Ribeiro, P. A. P., Miranda Filho, K. C., Melillo Filho, R., Santos, A. E. H., De Souza, W., Rodrigues, L. A., Luz, R. K. Efeito anestésico do eugenol em juvenis de pacamã. Pesq. Agropec. Bras. v.48, p.1136-1139, 2013.
- Rodrigues-Filho, J. L., Verani, J. R., Peret, A. C., Sabinson, L. M., Branco, J. O. The influence of population structure and reproductive aspects of the genus *Stellifer* (Oken, 1817) on the abundance of species on the southern Brazilian coast. Braz. J. Biol., v.71, n.4, p.991-1002, 2011.
- Romagosa, E., Paiva, P., Andrade-Talmelli, E., Godinho, H. Biologia reprodutiva de fêmeas de cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei, Siluriformes, Pimelodidae), mantidas em cativeiro. Bol. Inst. Pesc., v.29, n.2, p.151-159, 2018.
- Rothschild, M. A., Oratz, M., Schreiber, S. S. Albumin synthesis (first of two parts). N. Engl. J. Med., v.286, p.748-57, 1972.
- Sanches, E. A., Marcos, R. M., Baggio, D. M. Tessaro, L., Balen, R. E., Bombardelli, R. A. Estimativa da concentração espermática do sêmen de peixe pelo método de espermatócrito. R. Bras. Zootec., v.40, n.6, p.1163-1167, 2011.
- Sato, Y., Fenrich-Verani, N., Nuñez, A. P. O. Padrões reprodutivos de peixes da bacia do São Francisco. Em: Godinho, H. P.; Godinho, A. L. Águas e peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais. Editora PUC Minas, Belo Horizonte, p. 229-274, 2003.
- Santos, J. C. E., Luz, R. K. Effect of salinity and prey concentrations on *Pseudoplatystoma corruscans*, *Prochilodus costatus* and *Lophiosilurus alexandri* larviculture. Aquaculture, v. 28, n.7, p.324-328, 2009.
- Sant'Ana, L. S., Melillo Filho, R., Silva, W. S., Mattioli, C.C., Teixeira, L. V., Luz, R. K. Aspectos sensoriais do pacamã: Uma espécie promissora. R. Panor. da Aquicult. Ed. 158, p.54-56, 2016.

- Schoenebeck, C. W., Prenosil, E., Pallas, B., Abrams, A., Carlson, K. Can Lactate Dehydrogenase be used to Index Anaerobic Activity in Fishes? *Trans. Nebr. Acad. Sci.*, v.38, p.26–29, 2018.
- Shahsavani, D., Kazerani, H. R., Kaveh, S., Gholipour-Kanani, H. Determination of some normal serum parameters in starry sturgeon (*Acipenser stellatus* Pallas, 1771) during spring season. *Comp. Clin. Path.*, v.19, p.57-61, 2010.
- Silva Filho, J. J., Nascimento, W. S., Araújo, A. S., Barros, N. H. C., Chellappa, S. Reprodução do peixe piau preto *Leporinus piau* (Fowler, 1941) e as variáveis ambientais do açude Marechal Dutra, Rio Grande do Norte. *Bio. Amaz.*, v.2, n.1, p.10-21, 2012.
- Sinha, R. C., Ray, S. N. C. Differential expression of serum LDH isozymes in the fish *labeo rohita* as a function of the pesticide carbamate. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, v.2, p.201, 2018.
- Swenson, M. J. D. *Fisiologia dos animais domésticos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.
- Thulin, P., Bamberg, K., Buler, M., Dahl, B., Glinghammar, B. The peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  agonist, AZD4619, induces alanine aminotransferase-1 gene and protein expression in human, but not in rat hepatocytes: Correlation with serum ALT levels. *Int. J. Mol. Med.*, v.38, n.3, p.961-968, 2016.
- Travassos, H. Nótula sobre o pacamã *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1876. *Atlas Soc. Biol.*, v.4, p.1-2, 1959.
- Tolussi, C. E., Gomes, A. D., Ribeiro, C. D. S., Caneppele, D., Moreira, R. G., Honji, R. M. Mobilization of energetic substrates in the endangered catfish *Steindachneridion parahybae* (Siluriformes: Pimelodidae): changes in annual reproductive cycle in captivity. *Neotropical Ichthyology*, v.16, n.2, 2018.
- Vazzoler, A. E. A. M. *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. Maringá: Eduem/SBI, Ed. da Universidade Estadual de Maringá e Sociedade Brasileira de Ictiologia, v.169, 1996.
- Zielasko, M., Greiling, A. M., Luebke, K., Otto-Luebker, H., Patzkéwitsch, D., Erhard, M., Wedekind, H. Field study on reducing stress of catfish in a recirculation aquaculture system: an innovative tank design for autonomous movement from holding unit to stunning unit. *B. Eur. Assoc. Fish Pat.*, v.39, n.1, p. 14-23, 2019.
- Zimmer, A. M., Wright, P. A., Wood, C. M. Ammonia and urea handling by early life stages of fishes. *Journal of Experimental Biology*, v.220, n.21, p.3843-3855, 2017.

Zmora, N., Stubblefield, J., Golan, M., Servili, A., Levavi-Sivan, B., Zohar, Y. The medio-basal hypothalamus as a dynamic and plastic reproduction-related kisspeptin-gnrh-pituitary center in fish. *Endocrinol.* v.155, n. 5, p. 1874-1886, 2014.

## 5. ARTIGO 1

Rearing and maturation of *Lophiosilurus alexandri* (Steindachner, 1876) in controlled conditions: first reports and future perspective

### ABSTRACT

*Lophiosilurus alexandri* is a freshwater carnivorous fish for which there is fishing pressure in its natural environment, yet the species has potential for captive rearing. Information on growth and sexual development for the species is scarce, and age and size at first maturation have yet to be determined. A total of 400 fish, therefore, were reared from hatching to 968 days after hatching (DAH). Fish gonads were histologically analyzed throughout the rearing period, and growth, the hepatosomatic index and the gonadosomatic index were compared between males and females. Estradiol, testosterone and 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone concentrations were quantified at 845 and 968 DAH to compare sexually mature males and females. Weight and length did not differ between males and females ( $P > 0.05$ ). Males were sexually mature at 593 DAH, with body lengths of  $29.88 \pm 1.76$  cm and weights of  $444.1 \pm 77.03$  g, while females were sexually mature at 845 DAH, with lengths of  $36.51 \pm 1.06$  cm and body weights of  $783.05 \pm 48.57$  g. The results provided important information regarding the minimum capture size of *L. alexandri* for identifying the appropriate period to begin reproductive management of the species.

**Keywords:** Gonad development; Hormonal concentrations; Pacamã; Reproduction



## Introduction

Size at first gonadal maturation is a useful indicator of when fish are able to reproduce, while histological studies can contribute to understanding sexual maturation and other reproductive characteristics of fish (Pereira et al., 2017). Although knowledge of size at the time of reproductive maturation is important for establishing the minimum size at which free-living species reach the adult phase (Da Silva Santos et al., 2015), this has yet to be investigated for the genus *Lophiosilurus*.

*Lophiosilurus alexandri* (Steindachner, 1876), also known as pacamã, is a freshwater carnivorous catfish of the order Siluriformes. The species is sedentary, prefers lentic environments (Travassos, 1959) and reproduces by batch spawning with the release of eggs on sandy substrate and there is parental care of offspring (Sato et al., 2003). The species has been used for restocking the Rio São Francisco basin and is considered vulnerable to extinction (MMA, 2014), although it has yet to be classified by the IUNC Red List. This species has been over exploited because of the attractive market value due to the excellent quality and flavor of the meat, which has few bones (Luz et al., 2011). Results of previous studies indicate *L. alexandri* has an excellent capacity to adapt and reproduce in captive conditions (Costa et al., 2015), while larviculture procedures for the species has been successfully performed in different culture systems using live food (Melillo Filho et al., 2014). Furthermore, the species can be trained to feed on a formulated diet (Silva et al., 2014) and tolerates dense stocking conditions (Luz and Santos, 2008; Cordeiro et al., 2016).

The objectives of this study were to: (i) determine size and age at first maturation for *L. alexandri* with histological analyses of gonads; (ii) obtain information on growth of *L. alexandri*; and (iii) measure indexes and hormonal concentrations important for understanding the reproduction of the species.

## Material and methods

The research was approved by the Committee of Ethics and Animal Experimentation (396/ 2012 CETEA protocol) of the Federal University of Minas Gerais (UFMG), Brazil.

### Management of eggs and larviculture procedures

Larvae of *L. alexandri* were obtained from the Aquaculture Laboratory of UFMG (LAQUA), where these were produced by natural spawning following the protocol described by Costa et al. (2015). The eggs were collected and conditioned for 24 hours in a tank containing water and the antibiotic Florfenicol (300 mg/L), a procedure recommended as prophylaxis for possible bacterial contaminants (Batista et al., 2014). The eggs were then transferred to another tank connected to a recirculating aquaculture system (RAS), with the thermostat set at 28 °C, supplemental aeration (dissolved oxygen > 5 mg/L) and mechanical and biological filtration was performed to complete the incubation period.

At 8 days after hatching (DAH), larvae were weighed, measured and distributed in circular tanks arranged in a RAS at a density of 30 larvae/L. Larviculture was then conducted for 15 days with newly hatched *Artemia nauplii* provided as food using the procedure previously described by Luz and Santos (2008).

Training for feeding was performed during the 15 days immediately following larviculture using the protocol established by Silva et al. (2014). This training was conducted to condition the animals to feed exclusively on formulated diet. After feed training, the fish were housed in the same system until 90 DAH.

### Fish growth

Growth was analyzed by evaluating 400 randomly selected *L. alexandri* juvenile. The growth stage involved several phases in two RASs (Table 1). These procedures were conducted and modified based on animal growth patterns and the need to reduce stocking density due fish growth.

The first RAS, where juveniles were housed for 4 months (Phase 1), comprised four 800 L tanks, mechanical and biological filters and a thermostat set at 28 °C. Subsequently, between phases 2 and 7, the animals were transferred to 400 L tanks as described in Table 1. These tanks were connected to a RAS with a unified filtering system equipped with sand and biological filters, a thermostat set at 28 °C and a supplementary aeration system, with dissolved oxygen being maintained at a concentration greater than 5 mg/L, total ammonia between 0 and 0.5 mg/L and pH between 6.5 and 7.8 throughout the experiment with assessments of these conditions occurring daily using an Asko AK88® multiparameter meter.

The animals were redistributed at the time of each collection to equalize density throughout the experiment and fed an extruded commercial diet for carnivorous fish (Table 1). Feeding was performed three times a day (09:00, 13:00 and 17:00 h), with unconsumed food being collected 30 minutes after each feeding, which was oven dried and weighed to determine consumption of diets by the fish in each tank.

**Table 1** Distribution of *Lophiosilurus alexandri* among the different phases of the experiment and the different diets provided.

Phase	Duration (DAH <sup>1</sup> )	N° tanks	Individual volume (L)	Fish/tank	Ø pellet (mm)	CP <sup>2</sup> (%)
1	90 to 219	4	800	100	1.7-2.5	46-40
2	219 to 282	6	400	50	4	40
3	282 to 372	6	400	40	6	40
4	372 to 593	18	400	10	6	40
5	593 to 734	10	400	10	6	40
6	734 to 845	10	400	8	10	40
7	845 to 968	12	400	5	14	40

<sup>1</sup>DAH: days after hatching.

<sup>2</sup>CP: crude protein of the diet.

Biometric measurements were periodically obtained to monitor growth and determine survival. Measurements involved carefully collecting the experimental fish in a sieve and placing them on a towel for measuring. The individual fish were subsequently placed in a container with water and weighed using a Marte®AD5002 semi-analytical digital balance.

The values for the following variables were calculated using data of body weight, body length and feed consumption:

- Weight gain (g) (AWG) = final weight - initial mean weight;
- Daily weight gain (g/day) (DWG) = mean weight gain/days of experiment;
- Mean length gain (cm) (LG) = mean final length - mean initial length;
- Feed conversion (FCR) = feed intake/ biomass gain;
- Condition factor (K) = weight/length<sup>3</sup>;
- Daily specific growth rate (%/day) (SGR):  $SGR = 100 (\ln W_f - \ln W_i) / \Delta t$

where  $W_i$  is initial weight,  $W_f$  is final weight and  $\Delta t$  is the number of days between samplings.

### **Gonadosomatic index and hepatosomatic index**

At 481, 593, 734, 845 and 968 DAH, fish were placed in a plastic box of 100 liters of useful volume, containing 285 mg/L eugenol solution and were then euthanized to remove the gonads and liver. The gonads were weighed for calculating the gonadosomatic index (GSI). The liver was weighed for determining the hepatosomatic index (HSI). The GSI was calculated for each individual using the formula:

$GSI = (Wg * 100) / Wb$ , where  $Wg$  represents gonad weight and  $Wb$  represents body weight of each individual calculated as:

$Wb = Wt - Wg$ , where  $Wt$  represents total body weight (Vazzoler, 1996).

The HSI was calculated for each individual using the formula:

$HSI = 100 * (Wl / Wt)$ , where  $Wl$  represents liver weight and  $Wt$  the total body weight of each individual (Silva et al., 2015).

### **Light microscopy**

For histology, gonads were collected at 90, 191, 278, 372, 481, 593, 734, 845 and 968 DAH. The number of animals for gonad collection was adjusted according to sex to ensure adequate numbers of both males and females. To evaluate gonadal development, samples were fixed in Bouin's solution for 12 h and transferred to 70% alcohol until routine histological processing with paraffin inclusion through dehydration in increasing concentrations of ethyl alcohol, diaphanization in xylol and staining with Hematoxylin-Eosin, Periodic Acid Schiff and Gomori Trichrome. Microtomy was performed at a thickness of 5 to 7  $\mu$ m using an optical microscope. Age and size at first maturation were determined when a minimum of 50% of the animals of the same sex sample had mature gonads.

### **Hormonal variables**

Blood samples for hormonal analyses were collected from the same animals used for histological analysis at 845 and 968 DAH. The blood was collected by puncture of the caudal vertebral artery with a ventral access approach. These analyses were performed using animals at the end of the experiment when macroscopically developed gonads were already detected. At the first collection (845 DAH), there were a total of 20 samples obtained with nine being from males and 11 from females, while at the second collection (968 DAH) there were 15 samples obtained with six being from males and nine from females. The samples were centrifuged for 15 min at 60 g, and aliquots of serum were collected and maintained at -80 °C

until determination of testosterone (T) and  $17\beta$ -estradiol (E2) concentrations. Testosterone concentration was determined using chemiluminescence utilizing the ADVIA Centaur® testosterone assay of Bayer Corporation, while E2 concentration was determined using immunofluorometry utilizing an Estradiol Auto DELFIA®, Perkin Elmer. The concentration of  $17\alpha$ -hydroxyprogesterone ( $17\alpha$ -OHP) was determined using a solid-phase radioimmunoassay with the Coat-a-Count  $17\alpha$ -OH progesterone-DPC kit. Parallelism between the dilution curves of plasma samples and the standard curve was evaluated for all assays, with correlation coefficients ranging 0.947 – 0.999. Inter- and intra-assay coefficients of variation ranged from 7% to 10% for T, 5% to 8% for E2 and 8% to 10% for  $17\alpha$ -OHP. Cross-reactivity of the T assay was < 6% with other androgens and < 2% for 11-ketotestosterone. For E2 and  $17\alpha$ -OHP, cross-reactions with other estrogens and  $17\alpha$ -20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) were < 4% and 1%, respectively. The sensitivity of the assays was 5 pg/mL.

### **Statistical analysis**

Homogeneity of variance for continuous variables was verified using the Bartlett test while normality of the data was assessed using the Anderson-Darling test. The Tukey test (at 5% probability) was used to compare growth and weight data between males and females. The non-parametric Kruskal Wallis test (at 5% probability) was used to compare hormonal data, GSI and HIS. Statistical analyses were performed using MINITAB® Statistical Software, version 18 (State College, Pensilvânia, USA). Histological analysis of gonads and other performance indicators were descriptive.

## **Results**

### **Fish growth**

Performance data for *L. alexandri* are shown in Table 2.

**Table 2** Descriptive data (mean  $\pm$  SD) for growth, feed conversion rate and survival evaluated according to growth phase of *Lophiosilurus alexandri* fed commercial diet in a recirculation aquaculture system.

Phase	$\Delta T^1$	DAHi <sup>2</sup>	DAHf <sup>3</sup>	S <sup>4</sup>	Li <sup>5</sup>	Lf <sup>6</sup>	Wi <sup>7</sup>	Wf <sup>8</sup>	WG <sup>9</sup>	DWG <sup>10</sup>	LG <sup>11</sup>	FCR <sup>12</sup>	Ki <sup>13</sup>	Kf <sup>14</sup>	SGR <sup>15</sup>
1	120	90	219	98	8.74 $\pm$ 1.18	15.04 $\pm$ 1.59	8.72 $\pm$ 6.68	42.91 $\pm$ 12.26	34.19	0.28	6.29	1.89	0.99	2.85	0.58
2	63	219	282	99	15.04 $\pm$ 1.59	18.32 $\pm$ 1.83	42.91 $\pm$ 12.26	84.78 $\pm$ 26.76	41.87	0.66	3.28	1.43	2.85	4.63	0.47
3	90	282	372	99	18.32 $\pm$ 1.83	22.97 $\pm$ 2.49	84.78 $\pm$ 26.76	188.19 $\pm$ 62.23	103.41	1.15	4.65	1.46	4.63	8.19	0.38
4	221	372	593	100	22.97 $\pm$ 2.49	29.88 $\pm$ 1.76	188.19 $\pm$ 62.23	444.1 $\pm$ 77.03	255.91	1.16	6.91	1.47	8.19	14.86	0.17
5	141	593	734	100	29.88 $\pm$ 1.76	33.64 $\pm$ 2.43	444.1 $\pm$ 77.03	602.63 $\pm$ 130.85	158.53	1.12	3.76	1.40	14.86	17.91	0.09
6	111	734	845	100	33.64 $\pm$ 2.43	36.51 $\pm$ 1.06	602.63 $\pm$ 130.85	783.05 $\pm$ 48.57	180.43	1.63	2.87	2.11	17.91	21.44	0.10
7	141	845	986	98	36.51 $\pm$ 1.06	39.73 $\pm$ 2.04	783.05 $\pm$ 48.57	984.39 $\pm$ 140.37	201.34	1.43	3.21	3.13	21.44	24.77	0.07

<sup>1</sup> $\Delta T$ : phase duration in days. <sup>2</sup>DAHi: initial days after hatching for phase. <sup>3</sup>DAHf: final days after hatching for phase. <sup>4</sup>S: survival (%). <sup>5</sup>Li: initial mean length (cm). <sup>6</sup>Lf: final mean length (cm). <sup>7</sup>Wi: mean initial weight (g). <sup>8</sup>Wf: mean final weight (g). <sup>9</sup>WG: mean weight gain (g). <sup>10</sup>DWG: daily weight gain (g/day). <sup>11</sup>LG: mean length gain (cm). <sup>12</sup>FC: feed conversion rate. <sup>13</sup>Ki: initial condition factor. <sup>14</sup>Kf: final condition factor. <sup>15</sup>SGR: specific growth rate (%/day).

Growth in weight (Fig. 1 A) and length (Fig. 1 B) did not differ between male and female *L. alexandri* throughout the development period.

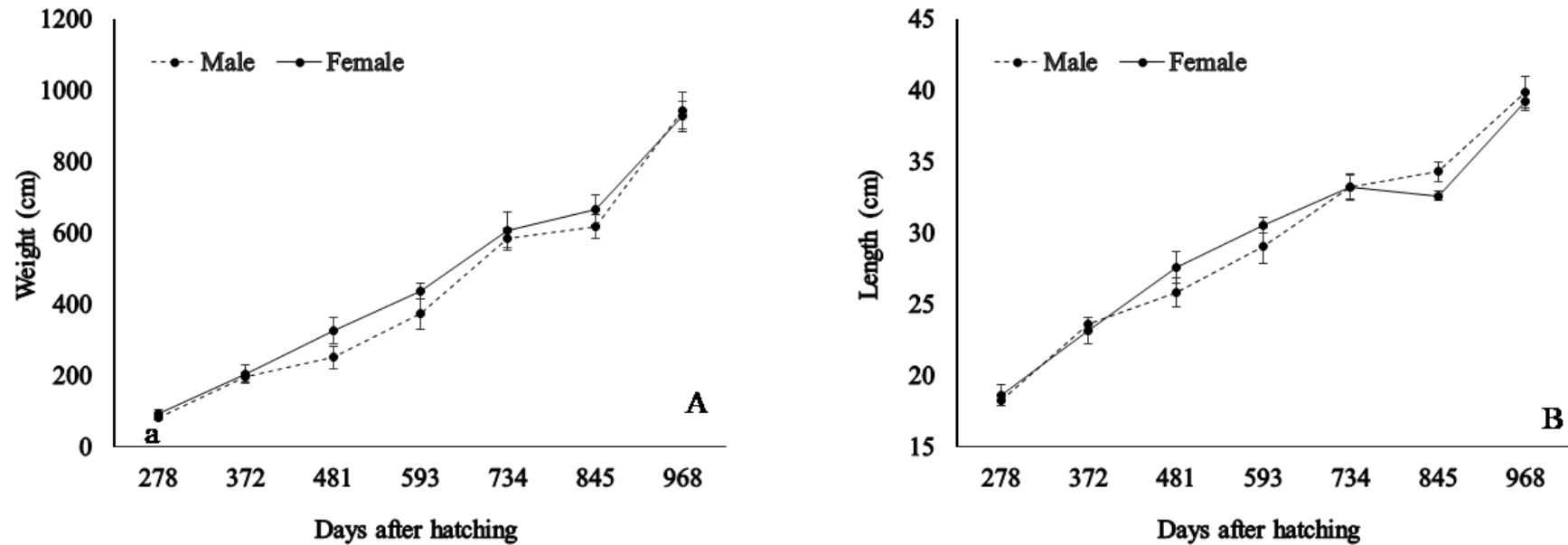


Figure 1. (A) growth in weight (mean  $\pm$  SE) of 10 male and 10 female *L. alexandri* by day of collection for histology, from 278 to 968 DAH; (B) growth in length (mean  $\pm$  SD) of 10 male and 10 female *L. alexandri* by day of collection for histology, from 278 to 968 DAH. No significant differences were observed between males and females by the Tukey test ( $P > 0.05$ ).

### **Gonadosomatic and hepatosomatic indices**

The GSI was greater for females than for males for all samplings, with there being an increase in this index beginning at 593 DAH (Fig. 2 A). The GSI of males remained similar throughout the experiment.

The HIS fluctuated throughout the experiment, although it was similar between males and females until 734 DAH (Fig. 2 B). After 845 DAH, the HIS was greater for females.



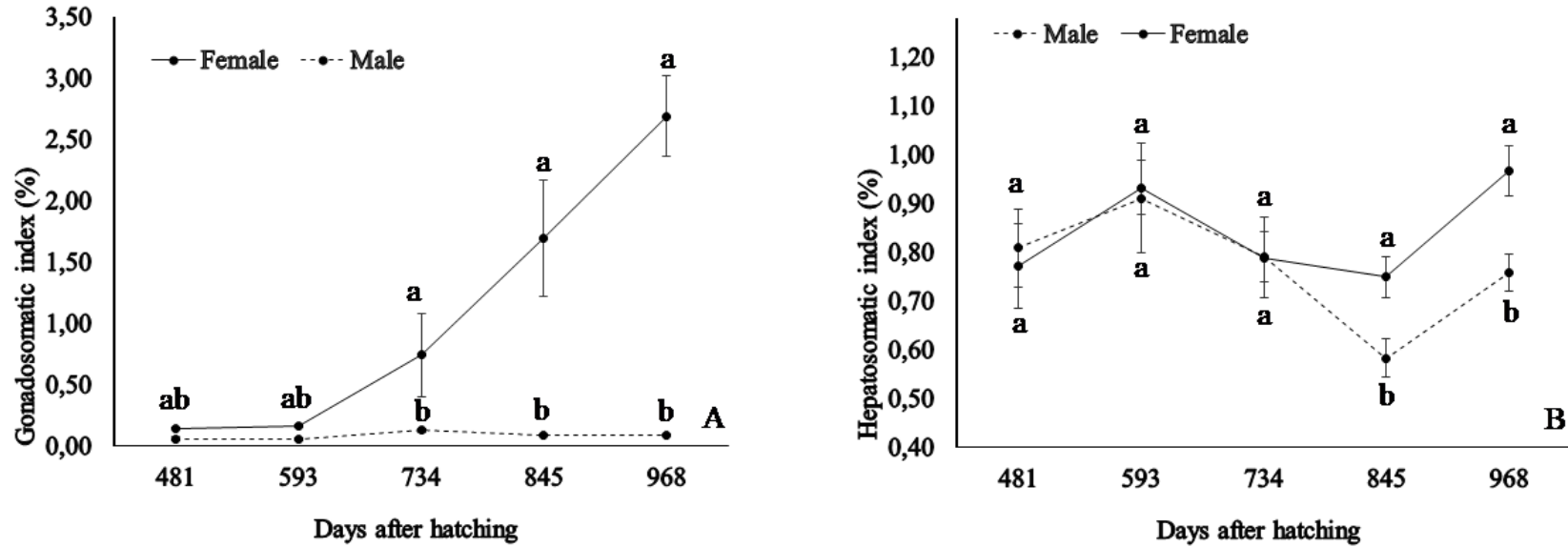


Figure 2. (A) Gonadosomatic index (GSI %) (mean  $\pm$  SE) of ten male and ten female *Lophiosilurus alexandri* on day of collection for histology, from 481 to 968 DAH; (B) hepatosomatic index (HIS %) (mean  $\pm$  SE) of ten male and ten female *L. alexandri* on day of collection for histology, from 481 to 968 DAH; When there are the same letters at the same time points, there was no difference between males and females when using the Kruskal Wallis test ( $P > 0.05$ )

### Gonadal development

Males were more precocious with regard to size and age at first maturation, with maturation first being identified at 372 DAH, with a mean length of  $22.97 \pm 2.49$  cm and a mean weight of  $188.19 \pm 62.23$  g. There were sexually mature males at 593 DAH, with a mean length of  $29.88 \pm 1.76$  cm and a mean weight of  $444.1 \pm 77.03$  g (Table 3).

**Table 3** Histological characteristics of the testes of *Lophiosilurus alexandri* during growth at different stages of gonadal maturation.

DAH <sup>1</sup>	GMS <sup>2</sup>	Histological characteristics of the testes
90	Immature	Only dispersed primary spermatogonia, not forming seminiferous tubules.
191	Rest	Primary and secondary spermatogonia with the beginning of seminiferous tubule organization.
278	Rest	Beginning of meiotic cell division producing cysts.
372	Initial maturation	Wall of the seminiferous tubules formed by cysts of different spermatogenic cells with luminae containing small amounts of spermatozoa.
481	Intermediate maturation	Seminiferous tubules with a greater quantity of spermatozoa than the previous stage.
593 to 845	Advanced maturation	Seminiferous tubules and sperm duct filled with spermatozoa.

<sup>1</sup>DAH: days after hatching. <sup>2</sup>GMS: gonadal maturation stage.

Germ cells in males were initially grouped in structures termed spermatogonia nests (Fig. 3 A). Interstitial space then increased, which was indicative of the initiation of the organization of the seminiferous tubules (Fig. 3 B). Subsequent stages of development preceded the onset of cell division that led to the development of spermatozoa (Fig. 3 C). The progressive accumulation of spermatozoa inside seminiferous tubules was considered to be the initial process of sexual maturation in males (Fig. 3 D and Fig. 3 E). The presence of a large quantity these cells within spermatic ducts at 593 DAH was considered to indicate sexual maturity and the capacity to reproduce had occurred (Fig. 3 F).

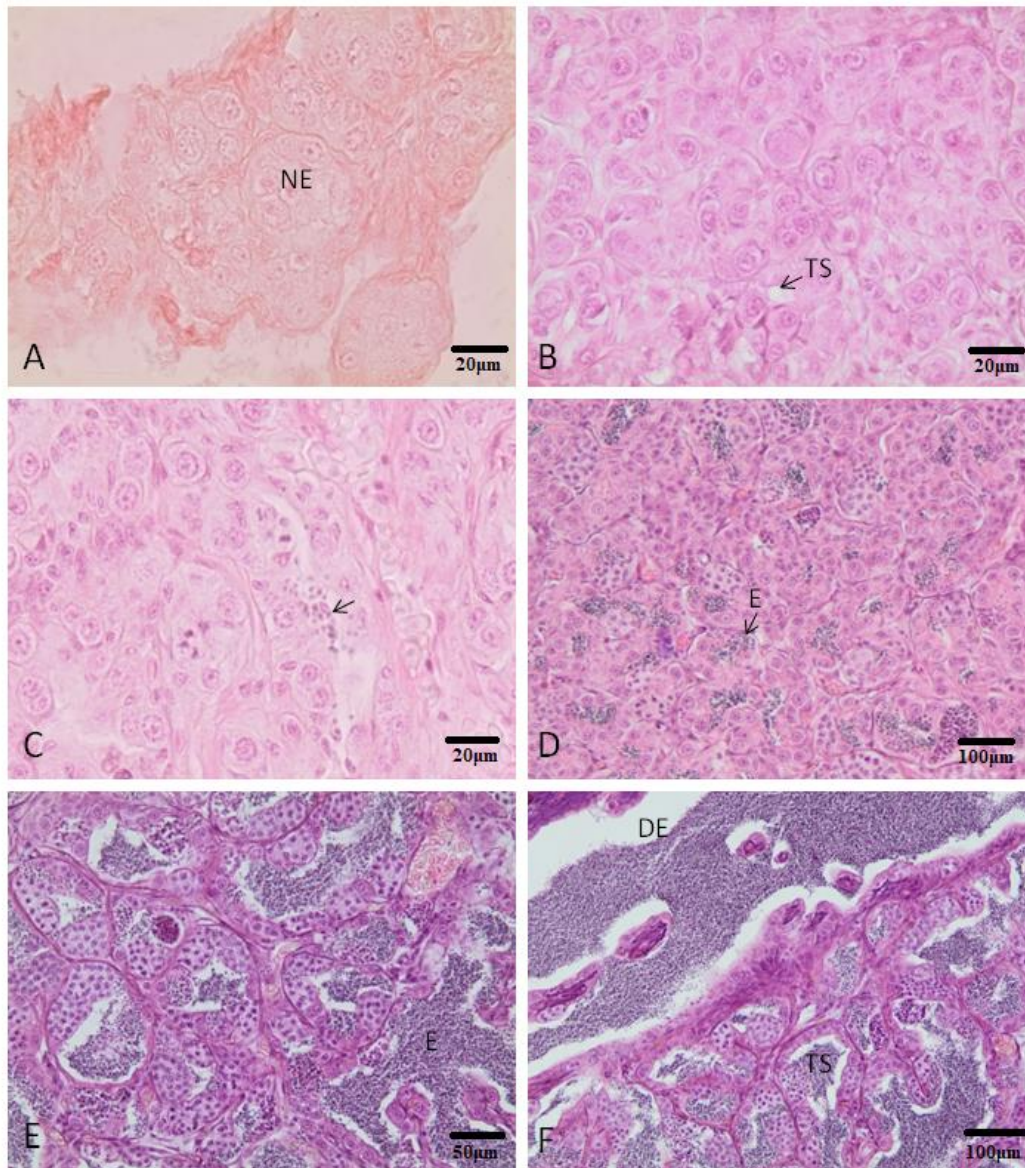


Figure 3. (A) Transverse sections of testes of *Lophiosilurus alexandri*: 90 DAH - immature testis showing only spermatogonia nests (NE); (B) 191 DAH - testis at rest, where the beginning of seminiferous tubule (TS) organization can be seen; (C) 278 DAH - testis at rest, where meiotic cell division (arrow) can be seen; (D) 372 DAH - testicle at initial maturation, characterized by the beginning of the accumulation of spermatozoa (E) inside the seminiferous tubules; (E) 481 DAH - testicle at intermediate maturation with seminiferous tubules with greater quantities of spermatozoa (E) than in the previous stage; (F) 593 DAH - testis in advanced maturation with seminiferous tubules (TS) and spermatic duct (DE) replete with spermatozoa.

Initial maturation in females was observed at 734 DAH, with a mean length of  $33.64 \pm 2.43$  cm and a mean weight of  $602.63 \pm 130.85$  g, while advanced maturation was observed at 845 DAH, with a mean length of  $36.51 \pm 1.06$  cm and a mean weight of  $783.05 \pm 48.57$  g (Table 4).

**Table 4** Histological characteristics of the ovaries of *Lophiosilurus alexandri* during growth at different stages of gonadal maturation.

DAH <sup>1</sup>	GMS <sup>2</sup>	Histological characteristics of the ovaries
90	Immature	Predominance of primordial germ cell nests, oogonia and rare initial perinucleolar oocytes.
191 to 372	Rest	Organization of ovigerous lamellae containing initial and advanced perinucleolar oocytes.
481 to 593	Rest	Absolute predominance of initial and advanced perinucleolar oocytes.
734	Initial maturation	Presence of pre-vitellogenic oocytes with characteristic cortical alveoli.
845	Advanced maturation	Vitellogenic oocytes replete with globules of acidophilic vitellin and with prismatic follicular cells and a thin zona pellucida, in addition to oocytes in other stages, thus characterizing asynchronous development.

<sup>1</sup>DAH: days after hatching. <sup>2</sup>GMS: gonadal maturation stage.

Similar to males, the germ cells of females at 90 DAH were grouped in structures termed oogonia nests. There were a few oocytes in the initial perinucleolar stage that were also observed at this stage (Fig. 4 A). There was also tissue organization of the ovary in ovigerous lamellae at 191 DAH (Fig. 4 B). Gonadal maturation in females occurred asynchronously in subsequent stages, as characterized by the simultaneous presence of oocytes at different stages of development (Fig. 4 C). Initial maturation was characterized by the presence of pre-vitellogenic oocytes with numerous cortical alveoli (Fig. 4 D). In later stages, there was the gradual accumulation of acidophilic vitellin globules until there was complete maturation (Fig. 4 E). Details of the morphology of a vitellogenic oocyte are shown in Figure 4 F.



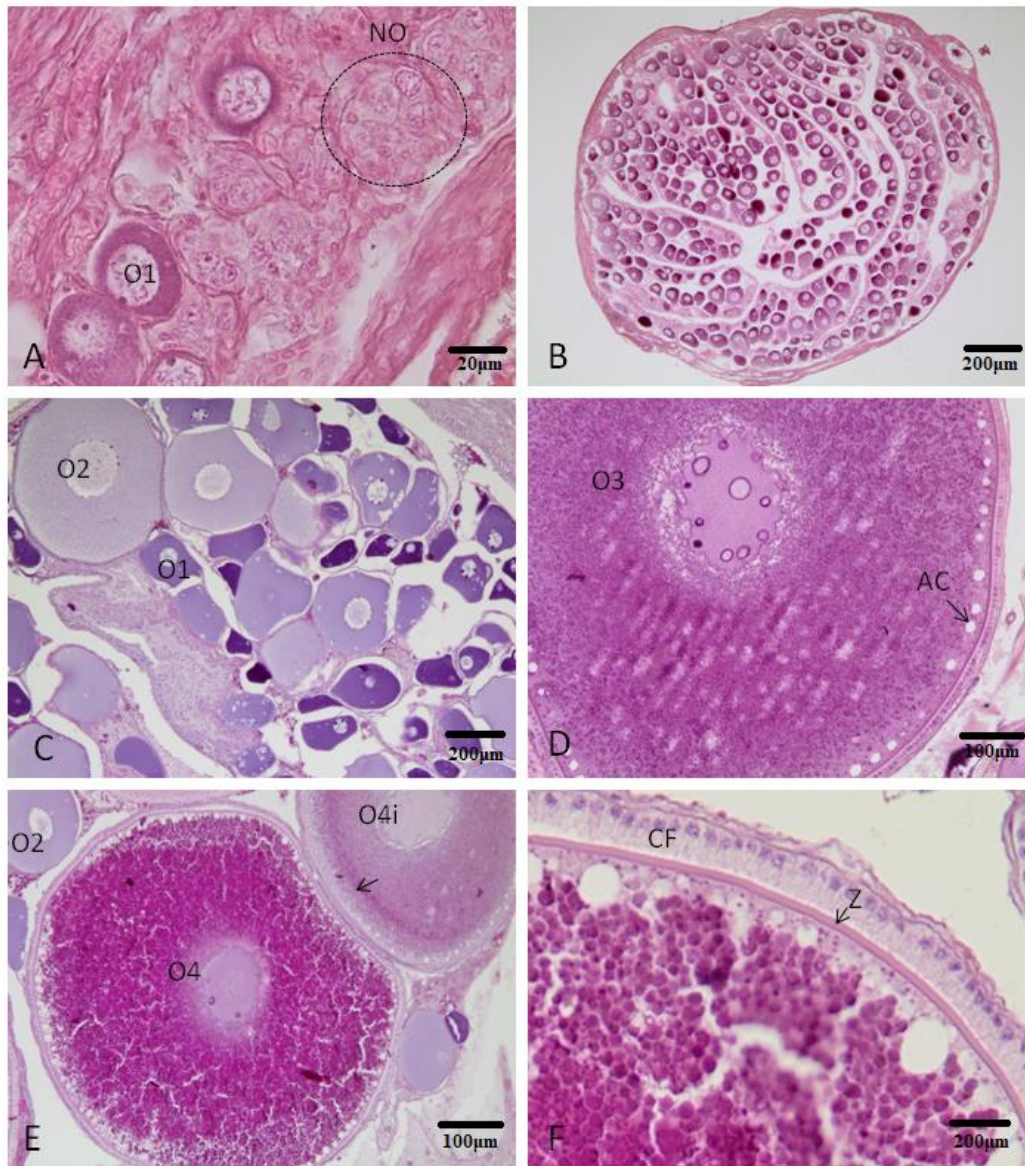


Figure 4. (A) Transverse sections of ovaries of *Lophiosilurus alexandri*: 90 DAH - immature ovary with only oogonia nests (NO) and perinucleolar oocytes in the initial stage (O1); (B) 191 DAH - ovary at rest where tissue organization is already observed in ovigerous lamellae; (C) 481 DAH - ovary at rest, oocytes in initial (O1) and advanced (O2) perinucleolar stage; (D) 734 DAH - ovary in initial maturation, characterized by the presence of pre-vitellogenic oocytes (O3) with cortical alveoli (AC); (E) 845 DAH - asynchronous ovary in advanced maturation with perinucleolar oocyte (O2), initial vitellogenic oocyte (O4i) with initial accumulation of acidophilic vitellin globules (arrow), and vitellogenic oocyte (O4); (F) 845 DAH - detail of vitellogenic oocyte, prismatic follicular cells (CF) and thin zona pellucida (Z).

### **Sex steroids**

Male and females had similar concentrations of E2 at 845 DAH ( $P > 0.05$ ), however, females had a greater concentration of E2 at 968 DAH ( $P < 0.05$ ; Fig. 5 A). Concentrations of  $17\alpha$ -OHP continued to be similar between males and females at 845 DAH, and then decreased in females between 845 and 968 DAH, however, did not differ between sexes ( $P > 0.05$ ) (Fig. 5 B). Testosterone concentrations did not differ between males and females at 845 DAH ( $P > 0.05$ ), while the concentration in females was greater than males at 968 DAH, with males having a reduction in concentrations between 845 and 968 DAH ( $P < 0.05$ ; Fig. 5 C).



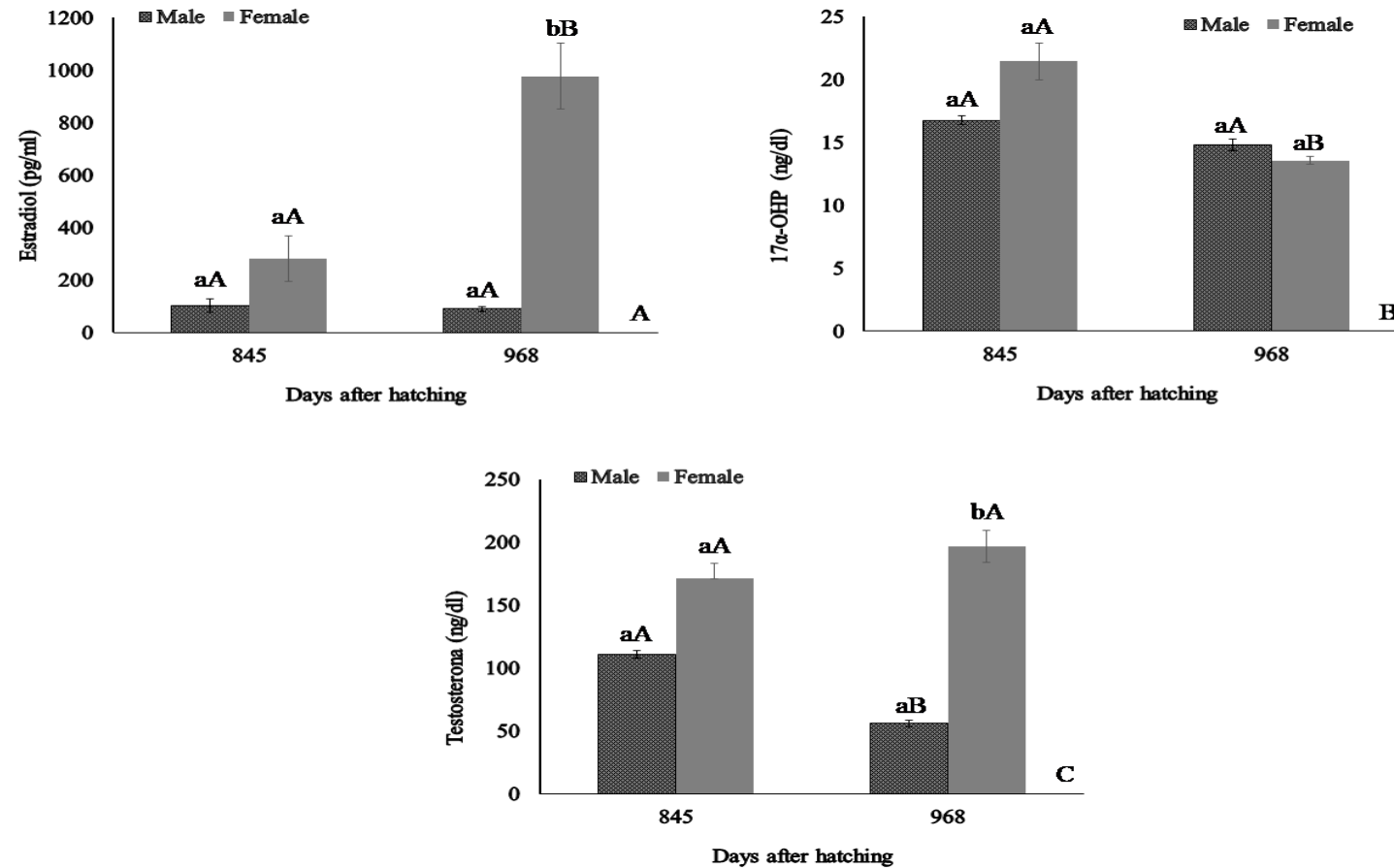


Figure 5 (A) Levels of estradiol (E2) in 20 males and 20 females *Lophiosilurus alexandri* (mean  $\pm$  SE) at 845 and 968 DAH. (B) Levels of 17 $\alpha$ -OHP in 20 males and 20 females *L. alexandri* (mean  $\pm$  SE) at 845 and 968 DAH. (C) Levels of testosterone in 20 males and 20 females *L. alexandri* (mean  $\pm$  SE) at 845 and 968 DAH. The same letters index indicated no statistical difference between males and females by the Kruskal Wallis test ( $P > 0.05$ ).

## Discussion

The results of the present study indicate there is no difference in growth between male and female *L. alexandri*. This finding provides important information for rearing because it allows the maintenance of homogeneous stock throughout cultivation without the need for sexual inversion. The survival and feed conversion rates of *L. alexandri* in the conditions imposed in the present study are additional desirable characteristics of this species for aquaculture enterprises.

There was a greater GSI of females in the present study beginning at 593 DAH, indicating there was a gradual accumulation of vitellogenic substances in ovaries in preparation for sexual maturation. Increased gonadal weight of males was little as DAG increased, being the result of the gradual accumulation of spermatozoa and seminal fluid throughout maturation. In addition, because males are in the growth phase, increased testicle size occurred concomitantly with increased body weight, thus leading to a similar GSI throughout the maturation period. There was a similar difference reported between the sexes of other siluriforms in previous studies (Zardo et al., 2015; Tolussi et al., 2018). The GSI, therefore, is an important indicator of female gonadal development (Andrade et al., 2006; Flores et al., 2019) while, in the present study, this index was not indicative of the maturation stage of growing *L. alexandri* males.

The value for HIS oscillated independently of the values for GSI. This finding is probably related to the mobilization of liver reserves, which occurs intermittently to supply the metabolic compounds for maintenance and growth. According Santos et al. (2015), this dynamic between these two indexes may be altered in situations of nutritional deficit, when body reserves are utilized and directed to maintaining basal metabolism instead of vitellogenesis. This finding also indicates that the commercial diet used in the present study was not sufficient to fully meet the nutrients needed by *L. alexandri* during maturation.

Brazilian fishing law allows the capture of *L. alexandri* that are 40 cm in length or greater (Brazil, 1997) with these values for capture being greater than the average of 29.88 cm for males and 36.51 cm for females at the time of first maturation in the controlled conditions in the present study. Feeding a commercial diet, and the maintenance of a constant water temperature at 28 °C, may have affected the size and age at first maturation in the present study. There, however, are no previous results reported with *L. alexandri* for first maturation in the natural environment for comparison. Results of previous studies indicate that fish managed in captivity first mature at a lesser body weight than in the natural environment

(Valderrama et al., 1988; Reyes and Huq, 1990; Resende et al., 1996; and Romagosa et al., 2003).

All of the evaluated hormones were of a similar concentration in males and females at the first sampling, at 845 DAH. At 968 DAH, however, the concentrations of E2 and T increased for females, while  $17\alpha$ -OHP decreased. According to Honji and Moreira (2017), increases of E2 and T are expected during vitellogenesis. Greater concentrations of these hormones inhibit the synthesis of follicle stimulating hormone (control by negative feedback) and, together with the action of gonadotropin-releasing hormone (GnRH), stimulate the secretion of luteinizing hormone (LH), in the final phases of vitellogenesis. Luteinizing hormone stimulates the theca cells of the ovarian follicle to produce  $17\alpha$ -OHP. In the final stages of maturation,  $17\alpha$ -OHP is transported to the granulosa cells and converted to  $17\alpha$ ,  $20\beta$ - dihydroxy-4-pregnen-3-one ( $17\alpha$ ,  $20\beta$ -DHP);  $17\alpha$ ,  $20\beta$ -DHP is known to induce final follicle maturation and ovulation (maturation-inducing steroid, MIS; Honji and Moreira, 2017).

In males, there was a decrease in T concentrations and no change in other hormone concentrations at 968 DAH. Increased T concentration in blood plasma is the result of increased gonadotropin concentrations in response to environmental stimuli. These concentrations, however, decrease rapidly and no pattern of variation in the concentration of these hormones has been related to gonadal development in any of a number of species of fish (Carolsfeld, 1989). In early developmental stages (proliferative phase), testosterone is the main androgen produced by fish testes, and probably functions to prevent apoptosis of germ cells during early cell division (Almeida et al., 2009). In addition to final maturation, with spermiogenesis and sperm release in the lumina of seminiferous tubules, 11-ketotestosterone, another androgen that is more potent than T in receptor activation, is in greatest concentrations (Almeida, 2013).

## Conclusions

Male and female *L. alexandri* do not differ in weight or length during growth in captivity for 968 DAH. When there are conditions of the present study, males first matured at 593 DAH with a mean body length of  $29.88 \pm 1.76$  cm and a mean body weight of  $444.1 \pm 77.03$  g, while females first matured at 845 DAH with a mean length of  $36.51 \pm 1.06$  cm and mean weight of  $783.05 \pm 48.57$  g. The GSI is an indicator of gonadal maturation of female *L. alexandri*. There were differences in hormone concentrations between male and female *L. alexandri* at 968 DAH, with females having greater concentrations of E2 and T.

### Conflict of interest statements

The authors declare that there is no conflict of interest.

### Acknowledgements

This research was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brasil), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-Brasil), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). R. K. Luz received a research grant and a research fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq n°. 308547/2018-7).

### References

- Almeida, F.L., Taranger, G.L., Norberg, B., Karlsten, O., Bogerd, J., Schulz, R., 2009. Photoperiod-modulated testis maturation in Atlantic cod (*Gadus morhua*, L.). *Biol. Reprod.* 80, 631-640. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.071340>.
- Almeida, F.L., 2013. Endocrinologia aplicada na reprodução de peixes. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 37, 174-180.
- Andrade, D.R., Pereira, M.C., Júnior, M.V.V., Costa, A.P.R., Yasui, G.S., 2006. Acompanhamento de um ciclo reprodutivo anual em machos de piau-vermelho (*Leporinus copelandii*, Pisces, Anostomidae) em ambiente natural. *Rev. Ceres* 53, 45-53.
- Batista, Á.L.D., Melillo Filho, R., Takata, R., De Souza, W., Santos, A.E.H., Luz, R.K., 2014. Incubação de ovos de pacamã com florfenicol. *Pesq. Agropec. Bras.* 49, 911-914. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2014001100010>.
- Brazil, Decreto n° 38.744, de 9 de abril de 1997. Política de proteção à fauna aquática e de desenvolvimento da pesca e da aquicultura no estado de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, abr 1997.
- Carolsfeld, J., 1989. Reproductive physiology and induced breeding of fish as related to culture of *Colossoma*. In: Hernández, R. A., 1989. *Cultivo de Colossoma*. Bogotá: Guadalupe, 37-64.
- Cordeiro, N.I.S., Costa, D.C., Silva, W.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. <https://doi.org/10.1111/jai.12963>.

- Costa, D.C., E Silva, W.S., Melillo Filho, R., Miranda Filho, K.C., Dos Santos, J.C.E., Luz, R.K., 2015. Capture, adaptation and artificial control of reproduction of *Lophiosilurus alexandri*: A carnivorous freshwater species. *Anim. Reprod. Sci.* 159, 148-154. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.06.009>.
- Da Silva Santos, R., Do Carmo Silva, J.P., Da Costa, M.R., Araújo, F.G., 2015. O tamanho de primeira maturação como parâmetro para estabelecimento de tamanho mínimo de captura para corvina no Sudeste do Brasil. *Bol. Inst. Pesca.* 41, 507-518.
- Flores, A., Wiff, R., Ganas, K., Marshall, C.T., 2019. Accuracy of gonadosomatic index in maturity classification and estimation of maturity ogive. *Fish. Res.* 210, 50-62. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2018.10.009>.
- Honji, R.M., Moreira, R.G., 2017. Controle neuroendócrino da ovogênese em peixes teleósteos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 41, 86-93.
- Luz, R.K., Santos, J.C.E., Pedreira, M.M., Teixeira, E.A., 2011. Effect of water flow rate and feed training on "pacamã" (Siluriformes: Pseudopimelodidae) juvenile production. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 63, 973-979. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352011000400024>.
- Luz, R.K., Santos, J.C.E., 2008. Densidade de estocagem e salinidade da água na larvicultura do pacamã. *Pesq. Agropec. Bras.* 43, 903-909. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2008000700015>.
- Melillo Filho, R., Takata, R., Santos, A.E.H., Silva, W.S., Ikeda, A.L., Rodrigues, L.A., 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. <https://doi.org/10.1111/are.12139>.
- MMA, Brasil. Portaria do Ministério do Meio Ambiente nº 445, de 17 de dezembro de 2014. Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção – Peixes e Invertebrados Aquáticos. 2014.
- Pereira A.F., Andrade S.F., dos Santos, J.E., Rizzo, E., Sato, Y., Bazzoli, N., 2017. Comparative morphology of gonads from six species of fish belonging to the family Anostomidae (Characiformes: Anostomidae). *Rev. Biol. Trop.* 65, 713-723. <http://dx.doi.org/10.15517/rbt.v65i2.23988>.
- Resende, E.K., Catella, A.C., Nascimento, F.L., Palmeiras, S.S., Pereira, R.A.C., Lima, M.S., Almeida, V.L.L., 1996. Biologia do curimatá (*Prochilodus lineatus*), pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) e cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*) na bacia

- hidrográfica do rio Miranda, Pantanal do Mato Grosso do Sul. Bol. Pesq. EMBRAPA-CPAP 02, 51-65.
- Reyes, A.O., Huq, M.F., 1990. Algunos aspectos reproductivos del bagre rayado *Pseudoplatystoma fasciatum* Linnaeus, 1766 (Pisces: Pimelodidae) em la Laguna Grande, Maturin, Venezuela. Bol. Inst. Oceanogr. 29, 133-140.
- Romagosa, E., Paiva, P.D., Andrade-Talmelli, E.F., Godinho, H.M., 2003. Biología reproductiva de fêmeas de cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei, Siluriformes, Pimelodidae), mantidas em cativeiro. Bol. Inst. Pesca. 29, 151-159.
- Santos, M.S.D., Villacorta-Correa, M.A., Oliveira, C.P.F.D., Castro-Pérez, C.A., Sampaio, L.A., 2015. Crescimento compensatório de juvenis de matrinxã (*Brycon amazonicus*) submetidos a jejum e realimentação. Rev. Igap. 9, 43-58.
- Sato, Y., Fenrich-Verani, N., Nuñez, A.P.O., Godinho, H.P., Verani, J.R. 2003. Padrões reproductivos de peixes da bacia do São Francisco. In: Godinho, H.P., Godinho, A. L., 2003 (Eds). Águas e peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais. Editora PUC Minas, Belo Horizonte, 229-274.
- Silva, W.D.S., Cordeiro, N.I.S., Costa, D.C., Takata, R., Luz, R.K., 2014. Feeding frequency and rate during feed training of pacamã juveniles. *Pesq. Agropec. Bras.* 49, 648-651. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2014000800009>.
- Silva, E.M., Monserrat, J.M., Sampaio, L.A., Tesser, M.B., 2015. Crescimento e metabolismo do nitrogênio em juvenis de *Trachinotus marginatus* alimentados com diferentes níveis proteicos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 7, 131-139. <https://doi.org/10.1590/1678-7069>.
- Travassos, H., 1959. Nótula sobre o pacamã *Lophiosilurus alexandri*, Steindachner, 1876. *Atlas Soc. Biol.* 4, 1-2.
- Tolussi, C.E., Gomes, A.D., Ribeiro, C.D.S., Caneppele, D., Moreira, R.G., Honji, R.M., 2018. Mobilization of energetic substrates in the endangered catfish *Steindachner idionparahybae* (Siluriformes: Pimelodidae): changes in annual reproductive cycle in captivity. *Neotrop. Ichthyol.* 16, e170120. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20170120>.
- Valderrama, M.B., Zarate, M.V., Vera, G.V., Moreno, C.Z., Caraballo, C.Z., Martinez, R.J.R., 1988. Determinacion de la talla media de madurez y analisis de la problematica con referencia a las tallas medias de captura del bagre rayado (*Pseudoplatystoma fasciatum*) Linnaeus 1766 (Pisces: Pimelodidae) en la cuenca del rio Magdalena, Colombia. *Act. Cient. Tecn. Inderena.* 2, 537-549.

- Vazzoler, A.E.A.M., 1996. *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. Universidade Estadual de Maringá e Sociedade Brasileira de Ictiologia, Maringá. Eduem, 169.
- Zardo, É.L., Behr, E.R., 2015. Population structure and reproductive biology of *Loricariichthys melanocheilus*. In: Reis and Pereira, 2000. (*Siluriformes: Loricariidae*) in the rio Ibicuí, Brazil. *Neotrop. Ichthyol.* 13, 371-382. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20140052>.

## 6. ARTIGO 2

Parâmetros bioquímicos sanguíneos de *Lophiosilurus alexandri* (Steindachner, 1876), durante a fase de crescimento e primeira maturação sexual

### RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar parâmetros bioquímicos do sangue de *Lophiosilurus alexandri* durante a fase de crescimento e primeira maturação sexual em Sistema de Recirculação de Água (SRA). Estes parâmetros são importantes indicadores da homeostase, pois representam a resposta do organismo ao meio ambiente. Para isso foram utilizados 400 animais, mantidos em SRA, durante 968 dias após a eclosão (DAE). Neste período foram realizadas quatro coletas aos 372, 481, 845 e 968 DAE para comparar os resultados entre machos e fêmeas em todas as idades e entre indivíduos do mesmo sexo nas diferentes idades. Os analitos avaliados foram: alanina aminotransferase (ALT), aspartato transaminase (AST), lactato desidrogenase (LDH), cálcio, cloro, magnésio, proteínas totais, albumina, ureia, glicose, triglicérides e colesterol. Peixes machos apresentaram maiores valores de ALT em 372 DAH, magnésio aos 481 DAH e triglicérides aos 372 DAH e 481 DAH ( $P < 0,05$ ). Os demais analitos não apresentaram diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) entre machos e fêmeas em nenhum dos tempos. Os resultados obtidos nos permitem concluir que as variações bioquímicas entre machos e fêmeas são menos expressivas do que as observadas entre as diferentes idades, onde apenas lactato desidrogenase (LDH), para fêmeas, não apresentou variação. Desta maneira, a idade é um importante fator de variação para avaliação bioquímica de *L. alexandri*.

**Palavras chave:** Bioquímica sérica, crescimento, pacamã, recirculação de água



## Introdução

Durante a manutenção de peixes em condições de cultivo é interessante conhecer as variáveis fisiológicas normais e assim detectar possíveis alterações. O estudo do sangue e de suas funções é importante, pois componentes hematológicos, bioquímicos e imunológicos estão relacionados à resposta do organismo animal ao meio ambiente (Ramesh et al., 2018). A avaliação desses componentes auxilia na determinação da influência de condições fisiopatológicas que possam afetar a homeostase, colaborando assim, no diagnóstico de condições adversas (Pérez et al., 2018). Uma alternativa para a identificação dessas condições é a realização de exames bioquímicos, que quando comparados aos valores de referência para a espécie, podem indicar alterações relacionadas ao estado nutricional, estresse, idade, fase reprodutiva e possíveis enfermidades (Tanuja et al., 2017). Entretanto, antes que estes valores de referência sejam estabelecidos para uma determinada espécie é importante conhecer se variam em função do sexo do animal ou mesmo para diferentes idades (Kulkarni, 2017).

O *Lophosilurus alexandri* (Steindachner, 1876) é um peixe conhecido no vale do São Francisco como pacamã. Pertence à ordem Siluriformes, é carnívoro, apresenta alto valor de mercado pela sua carne sem espinhos intramusculares, sabor apreciado pelo consumidor e também vem despertando interesse do mercado de peixes ornamentais (Santos e Luz, 2009). Em função da preferência dos pescadores em capturar esta espécie, vem sofrendo pesca excessiva, sendo considerado como espécie vulnerável (MMA, 2014). Esta espécie apresenta desova parcelada, comportamento sedentário, preferência por ambientes lênticos (Travassos, 1959) e cuidado parental, liberando seus ovos no substrato arenoso (Costa et al., 2015; Junior et al., 2019). É comumente utilizada em programas de repovoamento da bacia do Rio São Francisco (Navarro et al., 2014). Sua larvicultura já vem sendo realizada com sucesso em diferentes sistemas de cultivo com o emprego de alimento vivo (Melillo Filho et al., 2014; Takata et al., 2014; Cordeiro et al., 2016). Estudos com juvenis tem relatado diferenças em parâmetros bioquímicos em função de diferentes condições de cultivo (Costa et al., 2016; Mattioli et al., 2018; Favero et al., 2019; Iwamoto et al., 2019; Silva et al. 2019). Contudo, comparações destes parâmetros bioquímicos entre machos e fêmeas e entre os sexos ao longo do crescimento ainda não foram realizados.

Desta maneira, o objetivo deste estudo foi avaliar os parâmetros bioquímicos de *L. alexandri* saudáveis criados em sistema de recirculação de água (SRA) durante o crescimento, até a fase adulta. Além disso, verificar se existem diferenças nestes parâmetros entre indivíduos machos e fêmeas em quatro fases diferentes de seu crescimento, com também entre indivíduos do mesmo sexo de idades diferentes.

## **Materiais e Métodos**

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (Protocolo CETEA 396/2012) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brasil.

### **Manejo de ovos e larvas**

Larvas de mesma idade foram criadas nas mesmas condições até 90 dias após a eclosão em SRA, no Laboratório de Aquicultura da UFMG (LAQUA). Aos oito dias após a eclosão (DAE), as larvas foram distribuídas em tanques circulares dispostos em um SRA na densidade de 30 larvas/L e alimentados com náupilos de artêmia, por 15 dias (Luz e Santos, 2008). Após esse período, foi realizado o treinamento alimentar por mais 15 dias, conforme protocolo estabelecido por Silva et al. (2014) e mantidos até 90 DAE, recebendo o mesmo manejo alimentar e condições de cultivo.

### **Fase de crescimento**

O crescimento foi analisado usando 400 animais selecionados aleatoriamente. O estágio de crescimento envolveu várias fases em dois SRAs (Tabela 1). Esses procedimentos foram adotados em função do crescimento dos animais e da necessidade de reduzir a densidade de estocagem em função do desenvolvimento dos peixes.

O primeiro SRA, onde os juvenis foram mantidos por quatro meses (Fase 1), compreendeu quatro tanques de 800L, com filtros mecânicos e biológicos e um termostato ajustado a 28° C. Posteriormente, entre as fases 2 e 7, os animais foram transferidos para tanques de 400 L, conforme descrito na Tabela 1. Esses tanques foram conectados a um SRA com um sistema de filtragem unificado equipado com um filtro de areia e um filtro biológico, um termostato ajustado a 28 °C e um sistema de aeração suplementar, com concentração de oxigênio dissolvido mantida acima de 5 mg/L, amônia total entre 0 e 0,5 mg/L e pH entre 6,5 e 7,8, durante todo o experimento. Os parâmetros de qualidade da água foram verificados diariamente com um medidor digital multiparamétrico Asko AK88®. Os animais foram redistribuídos no momento de cada coleta para equalizar a densidade ao longo do experimento. A alimentação foi realizada três vezes ao dia (09:00, 13:00 e 17:00 h) com dietas de acordo com o descrito na Tabela 1. A ração não consumida foi coletada 30 minutos após cada alimentação. Medidas biométricas foram realizadas periodicamente para monitorar o crescimento. As medidas envolviam a coleta cuidadosa de animais em uma peneira e a

contenção em uma toalha para a medição. Os animais foram posteriormente colocados em um recipiente com água e pesados com uma balança digital semi-analítica Marte®AD5002.

**Tabela 1** Distribuição do *Lophiosilurus alexandri* entre as diferentes fases do experimento e as diferentes dietas fornecidas.

Fase	Duração (DAE <sup>1</sup> )	N° tanque	Volume individual (L)	Peixes/tanque	Ø pellet (mm)	PB <sup>2</sup> (%)
1	90 a 219	4	800	100	1,7-2,5	46-40
2	219 a 282	6	400	50	4	40
3	282 a 372	6	400	40	6	40
4	372 a 593	18	400	10	6	40
5	593 a 734	10	400	10	6	40
6	734 a 845	10	400	8	10	40
7	845 a 968	12	400	5	14	40

<sup>1</sup>DAE: dias após eclosão; <sup>2</sup>PB: proteína bruta da dieta.

#### Amostras e análises

As amostras de sangue tiveram início quando da identificação macroscópica de machos e fêmeas. A primeira coleta realizada com 372 DAE obteve um total de 22 amostras, sendo 16 de machos, com médias de  $23,56 \pm 2,05$  cm e  $194,57 \pm 47,54$  g e 6 de fêmeas, com médias de  $23,15 \pm 2,59$  cm e  $204,43 \pm 71,97$  g. Na segunda coleta (481 DAE) obteve-se um total de 16 amostras, sendo 8 de machos, com médias de  $25,83 \pm 3,12$  cm e  $250,11 \pm 94,65$  g e 8 de fêmeas, com médias de  $27,58 \pm 3,08$  cm e  $325,08 \pm 107,48$  g. Na terceira coleta (845 DAE) obteve-se um total de 20 amostras, sendo 9 de machos, com médias de  $34,26 \pm 2,19$  cm e  $618,22 \pm 98,20$  g e 11 de fêmeas, com médias de  $32,60 \pm 1$  cm e  $664,09 \pm 140,06$  g, enquanto na última coleta (968 DAE) obteve-se 15 amostras sendo 6 de machos, com médias de  $39,83 \pm 2,74$  cm e  $941,83 \pm 127,85$  g e 9 de fêmeas, com médias de  $39,22 \pm 1,90$  cm e  $926,55 \pm 129,33$  g.

Para as amostras de sangue coletadas, os peixes foram contidos com um pano úmido e o sangue coletado por punção na artéria caudal vertebral com acesso ventral. Cerca de 300 µL de sangue foram adicionados à heparina sódica (0,1 a 0,2% mg / mL de sangue). As alíquotas de sangue total foram centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos e depois a 3000 rpm por 4 minutos para separar a fração sobrenadante. Alíquotas de plasma foram recuperadas e mantidas a -80°C para análise posterior. O perfil bioquímico foi obtido por meio de um dispositivo automático (CobasMira Plus®-Roche) e kits comerciais (Synermed® International

Inc. São Paulo, Brasil). Os analitos analisados foram: alanina aminotransferase (ALT), aspartato transaminase (AST), lactato desidrogenase (LDH), cálcio, cloro, magnésio, proteínas totais, albumina, ureia, glicose, triglicerídeos e colesterol.

Após a coleta de sangue, os peixes foram sacrificados em solução de eugenol a 285 mg/L, para determinação macroscópica e posterior confirmação histológica do sexo. As amostras de gônada foram fixadas na solução de Bouin por 12 horas e transferidas para álcool a 70% até o processamento histológico de rotina com inclusão de parafina por desidratação em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanização em xilol e coloração com Hematoxilina-Eosina, Periodical Acid Schiff e Gomori Trichrome. A microtomia foi realizada com uma espessura de 5-7  $\mu\text{m}$  sob microscópio óptico.

### **Análise estatística**

A homogeneidade de variância para variáveis contínuas foi verificada pelo teste de Bartlett, enquanto a normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Anderson-Darling. A análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey (com 5% de probabilidade) foram utilizados para comparar as médias de machos e fêmeas nas quatro coletas e para o mesmo sexo entre as quatro coletas.

### **Resultados**

Dentre os indicadores de função hepática (ALT, AST e LDH), apenas ALT apresentou diferença ( $P = 0,028$ ) entre machos e fêmeas aos 372 DAE, com maior valor para as fêmeas (Figura 1 A). Já entre os íons avaliados, apenas magnésio apresentou maior valor para peixes machos ( $P = 0,029$ ) aos 481 DAE (Figura 1 F).

Triglicérides (Figura 2 E) apresentaram maiores valores para peixes machos aos 372 DAE ( $P = 0,019$ ) e para fêmeas aos 481 DAE ( $P = 0,031$ ). Para proteínas totais, albumina, ureia, glicose e colesterol não foram registradas diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) entre machos e fêmeas em nenhum dos tempos analisados (Figura 2).

Quando comparamos ao longo do tempo, apenas LDH não apresentou variações ( $P > 0,05$ ) nas diferentes idades para as fêmeas (Figura 1C). Nos peixes machos todos os analitos apresentaram variações ( $P < 0,05$ ) nas diferentes idades (Figuras 1 e 2). AST, proteína total, ureia, glicose e triglicérides apresentaram valores menores para peixes mais velhos. ALT, LDH, cálcio, cloro, magnésio, albumina e colesterol apresentaram variações independentes do aumento da idade. Para as fêmeas, assim como nos machos, AST, proteína total, ureia, glicose

e triglicérides apresentaram valores menores ( $P < 0,05$ ) para peixes mais velhos (Figuras 1 e 2). ALT, cálcio, cloro, magnésio, albumina e colesterol apresentaram variações independentes do aumento da idade (Figuras 1 e 2).

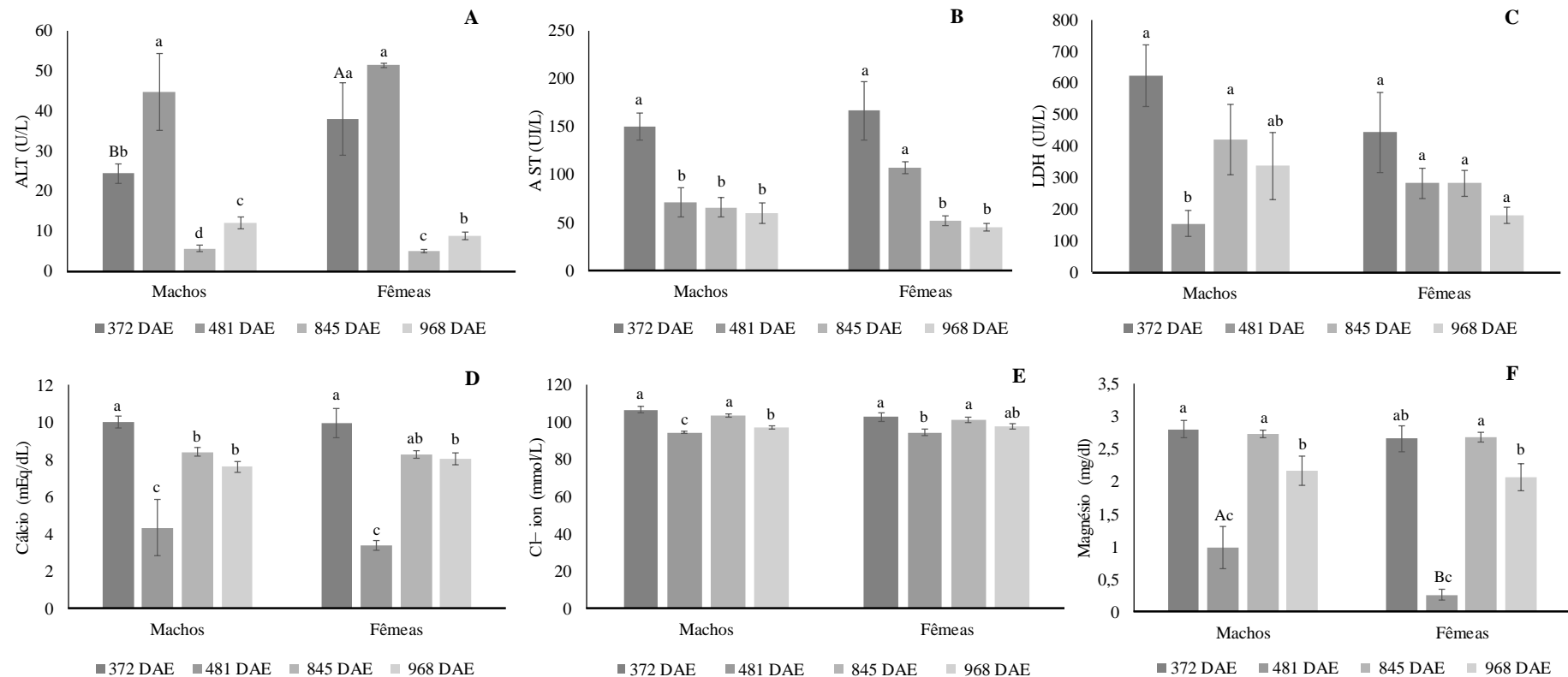


Figura 1. (A) Valores médios ( $\pm$  erro padrão) de alanina aminotransferase (ALT), (B) aspartato transaminase (AST), (C) lactato desidrogenase (LDH), (D) cálcio, (E) cloro e (F) magnésio de *Lophosilurus alexandri* em quatro idades após a eclosão (DAE). Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre machos e fêmeas de mesma idade pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística para animais do mesmo sexo de diferentes idades, pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

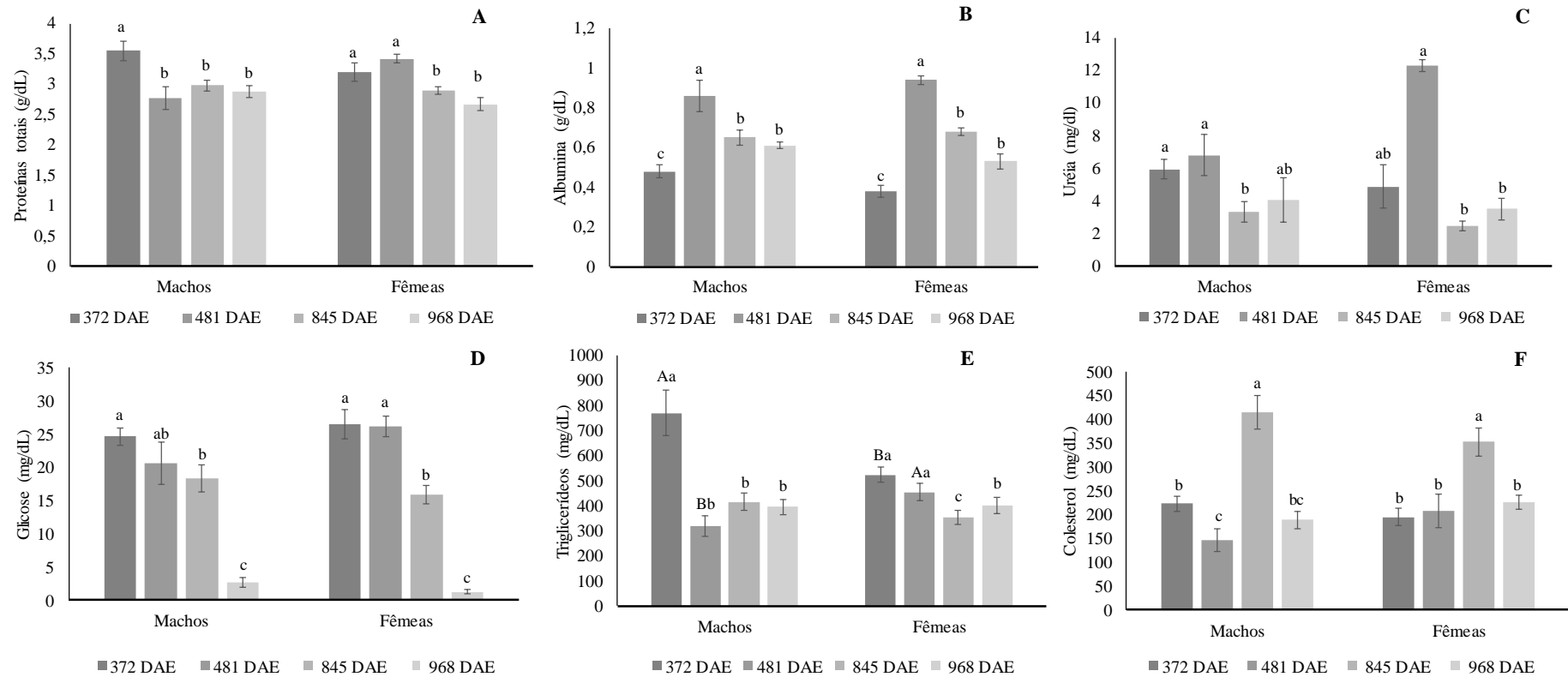


Figura 2. Valores médios ( $\pm$  erro padrão) de proteínas totais (A), albumina (B), ureia (C), glicose (D), triglicerídeos (E) e colesterol (F) de *Lophiosilurus alexandri* em quatro idades após a eclosão (DAE). Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre machos e fêmeas de mesma idade, pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística para animais do mesmo sexo de diferentes idades, pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

## Discussão

O sexo geralmente está associado a variações na bioquímica sérica em diferentes espécies de animais, inclusive em peixes (Fancourt e Nicol, 2019; Kulkarni, 2017). Estudos relataram maiores valores destes constituintes do sangue para indivíduos machos em relação às fêmeas relacionados a uma maior depleção dos componentes metabólicos pelo processo de desenvolvimento ovariano e desova (Tavares-Dias et al., 2004) ou a diferenças comportamentais entre machos e fêmeas (Kulkarni, 2017). No presente estudo triglicérides apresentaram maiores valores para peixes machos aos 372 DAE e para fêmeas 481 DAE. Este fato pode indicar diferenças de demanda energética entre os sexos os nestas fases de desenvolvimento relacionada ao comportamento. Entretanto, estudos que correlacionam o comportamento entre os sexos com a taxa metabólica em peixes, apesar de serem fundamentais para compreender esse tipo de variação, são escassos (Metcalf et al., 2016). Como não foi observada reprodução ou mesmo maturação sexual nas fêmeas nestes períodos (Melillo Filho et al., 2020), estas variações não podem ser atribuídas ao desenvolvimento gonadal ou desova. ALT aos 372 DAE e magnésio aos 481 DAE também apresentaram maiores valores para peixes machos em relação às fêmeas. Entretanto, como essas diferenças foram pontuais, não nos permitem conclusões adicionais, uma vez que ainda não existem valores de referência determinados para estas características em *L. alexandri*.

O colesterol é conhecido por ser um importante precursor hormonal, inclusive para estradiol e testosterona (Okoye et al., 2020). Neste estudo observamos, em ambos os sexos, aumento deste metabolito aos 845 DAE seguido de queda aos 968 DAE. Essa oscilação foi inversamente proporcional às variações dos níveis de estradiol e testosterona observados por Melillo Filho et al. (2020) para *L. alexandri* nesta mesma idade. Isso evidencia o desencadeamento do ciclo hormonal relacionado ao processo de maturação sexual para esta espécie. Já para glicose foi observada sucessiva redução dos 481 DAE para os 845 DAE com redução acentuada até os 968 DEA. Esta variação indica maior demanda energética que coincide com maturação gonadal avançada nessas idades (Melillo Filho et al., 2020).

Para determinar se um animal tem alterações nas variáveis bioquímicas, é necessária a comparação dos resultados com os valores de referências representativos de animais saudáveis. No entanto, a variação destes valores entre diferentes populações pode ocorrer por particularidades ambientais e nutricionais a que estão submetidos. Sendo assim, o ideal é que seja determinado um intervalo de referência específico para animais que vivem em ambientes semelhantes (Horn et al., 2003). Nossos resultados mostram que estas variações se estendem à



idade dos animais, já que a maioria dos parâmetros bioquímicos apresentaram valores diferentes entre as fases de crescimento, mesmo com a manutenção das condições ambientais constantes ao longo do tempo. Estudos documentaram mudanças nos parâmetros hematológicos e bioquímicos em peixes de acordo com a idade ou tamanho (Satheeshkumar et al., 2011, Arthanari et al., 2016). Porém, essas investigações estão limitadas e as comparações pontuais entre peixes juvenis e adultos ou exame apenas de peixes capturados na natureza, nos quais diversos fatores ambientais podem influenciar as variáveis sanguíneas (Akrami et al., 2013; Sheikh et al., 2019) não seriam adequadas. Para *L. alexandri* os estudos bioquímicos realizados até agora se restringem a juvenis (Costa et al., 2016; Mattioli et al., 2018; Favero et al., 2019; Silva et al. 2019) sob diferentes condições de cultivo, mas sem diferenciação entre machos e fêmeas, o que torna difícil a comparação com nossos resultados. É conhecido que peixes jovens possuem o metabolismo mais acelerado e isso está relacionado a uma maior taxa de crescimento nas fases iniciais (Lugert et al., 2016). Esta característica fisiológica pode explicar os maiores níveis séricos de proteína total, ureia, glicose, triglicérides e AST encontrados *L. alexandri* mais jovens. Porém, Okoye et al. (2016) encontraram níveis de ALT, AST, proteína total, colesterol e triglicérides menores para *Clarias gariepinus* mais velhos. Diferenças nutricionais e ambientais também podem exercer forte influência sobre a bioquímica sérica em peixes (Zhou et al., 2009). O presente estudo foi realizado com animais mantidos em sistema de recirculação de água, com total controle e estabilidade das condições ambientais. Nas diferentes fases de crescimento em que foram feitas as análises foi utilizada ração de mesma composição, diferindo apenas no tamanho dos pês. Isso nos permite excluir estes fatores como fonte de variação nos resultados observados.

### **Conclusões**

Nossos resultados apontam poucas diferenças nos parâmetros de bioquímica sérica entre machos e fêmeas de *L. alexandri* de diferentes idades. Contudo, para um mesmo sexo ao longo do crescimento, estas diferenças são vistas para a maioria dos analitos mensurados. Desta forma, a idade é um importante fator de variação a ser considerado na avaliação bioquímica de *L. alexandri*.

## Referências

- Akrami, R., Gharaei, A., Karami, R. (2013). Age and sex specific variation in hematological and serum biochemical parameters of Beluga (*Huso huso* Linnaeus, 1758). *International Journal of Aquatic Biology*, 1(3), 132-137.
- Arthanari, M., Dhanapalan, S. (2016). Assessment of the haematological and serum biochemical parameters of three commercially important freshwater fishes in river Cauvery Velur, Namakkal district, Tamil Nadu, India. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 4(1), 155-159.
- Batista, Á.L.D., Melillo Filho, R., Takata, R., De Souza, W., Santos, A.E.H., Luz, R.K. (2014). Incubação de ovos de pacamã com florfenicol. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 49, 911-914.
- Cordeiro, N. I. S., Costa, D. C., de S e Silva, W., 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). *Journal of Applied Ichthyology*, 32(1), 61-66.
- Costa, D.C., E Silva, W.S., Melillo Filho, R., Miranda Filho, K.C., Dos Santos, J.C.E., Luz, R.K. (2015). Capture, adaptation and artificial control of reproduction of *Lophiosilurus alexandri*: A carnivorous freshwater species. *Animal Reproduction Science* 1. 159, 148-154.
- Costa, D. P., Leme, F. O. P., Takata, R., Costa, D. C., e Silva, W. S., Melillo Filho, R., Luz, R. K. (2016). Effects of temperature on growth, survival and physiological parameters in juveniles of *Lophiosilurus alexandri*, a carnivorous neotropical catfish. *Aquaculture Research*, 6(47), 1706-1715.
- Fancourt, B. A., Nicol, S. C. (2019). Hematologic and serum biochemical reference intervals for wild eastern quolls (*Dasyurus viverrinus*): Variation by age, sex, and season. *Veterinary clinical pathology*, 48(1), 114-124.
- Favero, G. C., e Silva, W. D. S., Boaventura, T. P., Leme, F. D. O. P., Luz, R. K. (2019). Eugenol or salt to mitigate stress during the transport of juvenile *Lophiosilurus alexandri*, a neotropical carnivorous freshwater catfish. *Aquaculture*, 512, 734321.
- Horn O. S. Pesce A. J. (2003). Reference intervals: an update. *Clinica Chimica Acta*, 334:5-23.
- Iwamoto, A. A., Crepaldi, D. V., Boaventura, T. P., Teixeira, L. V., Teixeira, E. A., Luz, R. K. (2019). Comparative study of the chemical composition, fatty acid profile, and

- nutritional quality of *Lophiosilurus alexandri* (Siluriformes: Pseudopimelodidae), a Brazilian carnivorous freshwater fish, grown in lotic, lentic, and aquaculture environments. *Neotropical Ichthyology*, 17(4).
- Junior, L. P. G., Mattioli, C. C., Martins, E. D. F. F., e Silva, W. D. S., Ciolete, T. N., da Silva Vasconcellos, A., Luz, R. K. (2019). Temperature-induced changes in reproductive variables in the teleost fish *Lophiosilurus alexandri*. *Journal of thermal biology*, 80, 133-140.
- Kulkarni, R. S. (2017). Sex differences in the blood biochemical parameters of the fresh water fish, *Notopterus notopterus* (Pallas, 1789). *World News of Natural Sciences*, 6, 44-51.
- Lugert, V., Thaller, G., Tetens, J., Schulz, C., Krieter, J. (2016) A review on fish growth calculation: multiple functions in fish production and their specific application. *Reviews in Aquaculture*, v8(1), 30-42, 2016.
- Luz, R.K., Santos, J.C.E. (2008). Densidade de estocagem e salinidade da água na larvicultura do pacamã. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43, 903-909.
- Mattioli, C. C., Takata, R., Leme, F. D. O. P., Costa, D. C., Luz, R. K. (2018). Physiological and metabolic responses of juvenile *Lophiosilurus alexandri* catfish to air exposure. *Fish physiology and biochemistry*, 45(1), 455-467.
- Melillo Filho, R., Takata, R., Santos, A.E.H., Silva, W.S., Ikeda, A.L., Rodrigues, L.A., Luz, R.K. (2014). Draining system and feeding rate during the initial development of *Lophiosilurus alexandri* (Steindachner, 1877), a carnivorous freshwater fish. *Aquaculture Research*. 45, 1913-1920.
- Melillo Filho, R., Bazzoli, N., Silva, W. D. S., Costa, D. C., Boaventura, T. P., da Costa Julio, G. S., Luz, R. K. (2020). Rearing and maturation of *Lophiosilurus alexandri* (Steindachner, 1876) in controlled conditions: First reports and future perspective. *Animal Reproduction Science*, 214, 106311.
- Metcalfe, N. B., Van Leeuwen, T. E., Killen, S. S. (2016). Does individual variation in metabolic phenotype predict fish behaviour and performance? *Journal of fish biology*, 88(1), 298-321.
- MMA, Brasil. Portaria do Ministério do Meio Ambiente nº 445, de 17 de dezembro de 2014. Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção – Peixes e Invertebrados Aquáticos. 2014.
- Navarro, R. D., Costa, D. C., de Souza Silva, W., Silva, B. C., Luz, R. K. (2017). Long-term transportation of juvenile pacamãs *Lophiosilurus alexandri* at different densities. *Acta Scientiarum. Technology*, 39(2), 211-214.

- Okoye, C. N., Dan-Jumbo, S. O., Agina, O. A., Eze, U. U., Udoumoh, A. F. (2016). Reference intervals for the serum biochemistry and lipid profile of male broodstock African catfish (*Clarias gariepinus*: Burchell, 1822) at varied ages. *Notulae Scientia Biologicae*, 8(4), 437-443.
- Okoye, C. N., Dan-Jumbo, S. O., Emejue, C. O., Udoumoh, A. F., Agina, O. A., Uju, C. N., Ihedioha, J. I. (2020). Evaluation of induced spawning on oocyte characteristics and serum biochemistry of African catfish (*Clarias gariepinus*). *Comparative Clinical Pathology*, 29(1), 103-114.
- Pérez, M. R., Rossi, A. S., Bacchetta, C., Elorriaga, Y., Carriquiriborde, P., Cazenave, J. (2018). In situ evaluation of the toxicological impact of a wastewater effluent on the fish *Prochilodus lineatus*: biochemical and histological assessment. *Ecological indicators*, 84, 345-353.
- Ramesh, M., Thilagavathi, T., Rathika, R., Poopal, R. K. (2018). Antioxidant status, biochemical, and hematological responses in a cultivable fish *Cirrhinus mrigala* exposed to an aquaculture antibiotic Sulfamethazine. *Aquaculture*, 491, 10-19.
- 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(3-4), 324-328.
- Satheeshkumar P., Ananthan G., Senthil Kumar D., Jagadeesan L. (2011). Haematology and biochemical parameters of different feeding behaviour of teleost fishes from Vellar estuary, India. *Comparative Clinical Pathology*, 21(6),1-5.
- Sheikh, Z. A., Ahmed, I. (2019). Impact of environmental changes on plasma biochemistry and hematological parameters of Himalayan snow trout, *Schizothorax plagiostomus*. *Comparative Clinical Pathology*, 28(3), 793-804.
- Silva, W. D. S., Cordeiro, N. I. S., Costa, D. C., Takata, R., Luz, R. K. (2014). Feeding frequency and rate during feed training of pacamã juveniles. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 49, 648-651.
- Silva, W. D. S., Hisano, H., Mattioli, C. C., Torres, I. F. A., de Oliveira Paes-Leme, F., & Luz, R. K. (2019). Effects of cyclical short-term fasting and refeeding on juvenile *Lophiosilurus alexandri*, a carnivorous Neotropical catfish. *Aquaculture*, 505, 12-17.
- Takata, R., 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. *Neotropical Ichthyology*, 12(4), 853-859.

- Tanuja, S., Kumar, A., Nayak, S. K. (2017). Effect of dietary intake of acid ensiled fish waste on the growth, feed utilization, hematology and serum biochemistry of rohu *Labeo rohita*, (Hamilton, 1822) fingerlings. *Indian Journal of Animal Research*, 51(3), 501-505.
- Tavares-Dias M., Bozzo F.R., Sandrin E.F.S., Campos-Filho E., Moraes F.R. (2004). Blood cells, serum electrolytes, and hepatosomatic and splenosomatic indexes in common carp, *Cyprinus carpio* (Cyprinidae) in the first gonadal maturation (in Portuguese). *Acta Scientiarum*, 26, 73-80.
- Travassos, H. (1959). Nótula sobre o pacamã *Lophiosilurus alexandri*, Steindachner, 1876. *Atas Sociedade Biologia do Rio de Janeiro*, 4, 1-2.
- Vázquez, G. R; Guerrero, G. A. (2007) Characterization of blood cells and hematological parameters in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). *Tissue and cell*, 39(3), 151-160.
- Zhou, X., Li, M., Abbas, K., Wang, W. (2009). Comparison of haematology and serum biochemistry of cultured and wild Dojo loach *Misgurnus anguillicaudatus*. *Fish physiology and biochemistry*, 35(3), 435-441.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O pacamã é uma espécie de potencial aquícola e importância ambiental que, entretanto, enfrenta ameaças crescentes em seu habitat natural. Além de enfrentar forte pressão de pesca e significativa poluição, surge agora um novo desafio com o rompimento de grandes barragens de resíduos de mineração nos últimos anos. Os recentes desastres ambientais, dentre eles, o ocorrido Brumadinho (2019), que atingiu o Rio Paraopeba, afluente do São Francisco e habitat original da espécie poderá agravar ainda mais a situação. Os impactos destes incidentes sobre *L. alexandri* ainda são desconhecidos. Desta maneira, este trabalho se destaca por trazer informações inéditas e essenciais para o manejo desta importante espécie, como idade e tamanho de primeira maturação sexual. Nossos resultados revelam ainda detalhes histológicos do desenvolvimento gonadal que são importantes para caracterizar as fases de desenvolvimento reprodutivo. Como este estudo foi desenvolvido em ambiente controlado, as características histológicas observadas podem ser utilizadas como base de comparação para verificar possíveis patologias em animais de cultivo ou de vida livre expostos às alterações ambientais. Nossos resultados, por fim, fornecem um panorama da bioquímica sérica de *L. alexandri* ao longo do crescimento, o que é fundamental para traçar as diretrizes de trabalhos futuros que tenham por objetivo determinar valores de referência para essa espécie, pois, se estes valores forem determinados no nível da espécie, ocultarão flutuações importantes que refletem a homeostase e o bem-estar destes animais.