JULIANE SUZUKI AMARAL

Esteróides gonadais e metabolismo lipídico ao longo
do ciclo reprodutivo de *Arapaima gigas* (SCHINZ, 1822)
em ambiente natural

São Paulo
2009

JULIANE SUZUKI AMARAL

Esteróides gonadais e metabolismo lipídico ao longo
do ciclo reprodutivo de *Arapaima gigas* (SCHINZ, 1822)
em ambiente natural

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biociências da Universidade de
São Paulo, para a obtenção de
Título de Mestre em Ciências, na
área de Fisiologia

Orientadora: Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira

São Paulo
2009

Ficha Catalográfica

Amaral, Juliane S.

Esteróides gonadais e metabolismo lipídico ao longo do ciclo reprodutivo de *Arapaima gigas* (SCHINZ, 1822) em ambiente natural

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 2007. Departamento de Fisiologia

1 – Controle endócrino reprodutivo; 2- Esteróides gonadais; 3- Metabolismo lipídico reprodutivo 4 – *Arapaima gigas*

Comissão Julgadora

Prof. (a) Dr.(a)

Prof. (a) Dr.(a)

Prof. (a) Dr.(a)

Prof. (a) Dr.(a)

Dedico este trabalho:

- À minha família, em especial à minha mãe Letícia Noriko Suzuki pela integridade moral e exemplo de mulher na qual me espelho. Obrigada por confiar, acreditar e me apoiar durante toda minha vida.
- Aos animais sacrificados, pois sem eles essa pesquisa seria impossível de ser realizada.

AGRADECIMENTOS

Acredito que a parte mais difícil seja agradecer a todos aqueles que tiveram papel importante para que este trabalho chegasse ao fim.

Acima de tudo, gostaria de agradecer a DEUS, que permitiu que eu fizesse parte de uma excelente família, que zelou pela minha segurança e saúde e que fez com que somente pessoas boas cruzassem meu caminho. A Ele agradeço por todos os dias da minha vida!

A uma mulher muito especial na minha vida, minha orientadora Dra. Renata Guimarães Moreira, pela amizade, carinho, força, dedicação e presença constante que possibilitou a concretização deste trabalho. Renata, a você, toda minha admiração e eterna amizade! Obrigada por confiar em mim!

À Rossana Venturieri, pela garra, força e determinação contagiante. Muito obrigada por me proporcionar a oportunidade de trabalhar com você, pela sua total disponibilidade em discutir dados pertinentes relacionados ao meu projeto. Nunca esquecerei da nossa sintonia no trabalho, dos nossos momentos de lazer e das nossas conversas durante nossas viagens ao Pará.

Ao Sr. Luis Rebelo, pela oportunidade e disponibilidade dos animais. Muito obrigada por todos os recursos disponibilizados para que essa pesquisa pudesse ser realizada.

Aos integrantes do Projeto Pirarucu, na Ilha Mexiana, que participaram durante as coletas debaixo de sol e muita chuva. Sem vocês esse trabalho não chegaria nem na metade. Em especial ao Evaldo Castro pela dedicação e amizade nas coletas.

À professora Dra. Maria Inês Borella, do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do ICB-USP, pela disponibilidade e colaboração neste trabalho e por abrir as portas do seu laboratório para as análises histológicas.

Aos meus pais Dioclécio Amaral e Letícia Noriko Suzuki pelos ensinamentos durante toda minha vida, educação, amor e compreensão. Aos meus queridos irmãos Larissa Suzuki Amaral e Leandro Suzuki Amaral, pela amizade, conselhos e alegria por tê-los em minha vida! Amo vocês!

Às minha irmãzinhas Nathalia Correia Amaral e Bruna Correia Amaral, pelas pentelhices e amor incondicional. A vocês duas também deixo o meu amor incondicional!

Às minhas tias Yolanda (tia Yuki), Neusa (tia Neusa) e Luci (tia Mari). Mulheres de garra e personalidade que tanto influenciaram positivamente em minha vida! A vocês meu eterno Obrigada!

Aos meus irmãozinhos do laboratório, Renato Massaaki Honji (Honji *et al.*), Carlos Eduardo Tolussi (Kaduzito), Aline dal'Olio Gomes (Alininha), Paulo Henrique de Mello (Paulo boca), Bruno Cavalheiro Araújo (Playmobil), Amanda

de Moraes Narcizo (Little), Cristiele Ribeiro (Cris), Jandyr Rodrigues Filho (Jajá), Larissa Suzuki (Lali), Carlos Eduardo Garcia (Jaboti), Vanessa Rocha (Van), Tiago Gabriel Correia. Não tenho palavras pra dizer o quanto todos são importantes na minha vida.

Ao meu querido e amado Alexandre Gonçalves Peres (Jow jow), pela paciência nessa etapa final do meu trabalho, pelo seu amor, amizade, carinho e dedicação. Muito obrigada por ser tão presente em minha vida!

Aos meus queridos amigos da pós-graduação Lucas e Jones e da graduação Taty Ivy, Gabi, Silvinha, Di, Giuliano, Fer, Paulo boca, Aline, Amanda, bandido molhado, Jow jow, Bruno, Clarissa, Binho em especial ao Gabriel Honorato de Souza, pela amizade verdadeira, companheiro de balada e presença constante na minha vida!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida.

Ao coordenador do Programa de Pós-graduação e à PROAP pelos serviços burocráticos quando necessários e pela verba parcial concedida.

A todos que não foram mencionados, mas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIações

GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotropinas

FHS – Hormônio Folículo Estimulante

LH – Hormônio Luteinizante

17 α OHP – 17 α -hidroxiprogesterona

17 α 20 β P – 17 α -20 β -dihidroxi-4-pregnen-3-one

20 β HSD – 20 β -hidroxi-esteróide-desidrogenase

11ceto-T – 11ceto-Testosterona

VLDL – *Very Low Density Protein*

LA; 18:2n6 – Ácido linoléico

ALA; 18:3n3 – Ácido α -linolênico

AA; 20:4n6 – Ácido araquidônico

DHA; 22:6n3 – Ácido docosahexanóico

EPA; 20:5n3 – Ácido eicosapentanóico

IUCN – *International Union for Conservation of Nature*

CITES – *Convention on International Trade of Endangered Species of Wild Fauna and Flora*

Lt – Comprimento total

IGS – Índice Gonadossomático

PUFA – Ácido graxo polinsaturado

n3 – Ômega 3

n6 – Ômega 6

IIAP – *Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana*

MIS – Hormônio de maturação final

MPF – Fator de maturação do oócito

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Dados morfométricos e ponderais de <i>A. gigas</i> e IGS (Índice Gonadossomático). (Média ± EP).	87
Tabela 02: Dados de lipídios e proteínas totais da musculatura branca, vermelha e ventrecha de fêmeas de <i>Arapaima gigas</i> ao longo do ciclo reprodutivo. (Média ± Erro padrão).	88
Tabela 03: Dados de lipídios e proteínas totais do fígado e gônadas de fêmeas de <i>Arapaima gigas</i> ao longo do ciclo reprodutivo. (Média ± Erro padrão).	89
Tabela 04: Dados de lipídios e proteínas totais da musculatura branca, vermelha e ventrecha em machos de <i>Arapaima gigas</i> dos grupos 1 e 2. (Média ± Erro padrão).	90
Tabela 05: Dados de lipídios e proteínas totais do fígado e gônadas em machos de <i>Arapaima gigas</i> dos grupos 1 e 2. (Média ± Erro padrão).	90
Tabela 06: Dados de lipídios totais, proteínas totais e colesterol plasmático em fêmeas de <i>Arapaima gigas</i> ao longo do ciclo reprodutivo. (Média ± Erro padrão).	91
Tabela 07: Dados de lipídios totais, proteínas totais e colesterol plasmático em machos de <i>Arapaima gigas</i> dos grupos 1 e 2. (Média ± Erro padrão).	91
Tabela 08 : Perfil dos ácidos graxos da fração neutra dos lipídios hepático em fêmeas de <i>Arapaima gigas</i> nos diferentes estádios de maturação gonadal (Média ± Erro Padrão).	92

Tabela 09: Perfil dos ácidos graxos da fração neutra dos lipídios hepático em machos de <i>Arapaima gigas</i> do grupo 1 (Poucos espermatozóides no lúmen) e grupo 2 (Muitos espermatozóides no lúmen) (Média ± Erro Padrão).	93
Tabela 10: Perfil dos ácidos graxos da fração polar dos lipídios hepático em fêmeas de <i>Arapaima gigas</i> nos diferentes estádios de maturação gonadal (Média ± Erro Padrão).	95
Tabela 11: Perfil dos ácidos graxos da fração polar dos lipídios hepático em machos de <i>Arapaima gigas</i> do grupo 1 (Poucos espermatozóides no lúmen) e grupo 2 (Muitos espermatozóides no lúmen) (Média ± Erro Padrão).	96
Tabela 12: Perfil dos ácidos graxos da fração neutra dos lipídios gonadais em fêmeas de <i>Arapaima gigas</i> nos diferentes estádios de maturação gonadal (Média ± Erro Padrão).	98
Tabela 13: Perfil dos ácidos graxos da fração neutra dos lipídios gonadais em machos de <i>Arapaima gigas</i> do grupo 1 (Poucos espermatozóides no lúmen) e grupo 2 (Muitos espermatozóides no lúmen) (Média ± Erro Padrão).	99
Tabela 14: Perfil dos ácidos graxos da fração polar dos lipídios gonadais em fêmeas de <i>Arapaima gigas</i> nos diferentes estádios de maturação gonadal (Média ± Erro Padrão).	101
Tabela 15: Perfil dos ácidos graxos da fração polar dos lipídios gonadais em machos de <i>Arapaima gigas</i> do grupo 1 (Poucos espermatozóides no lúmen) e grupo 2 (Muitos espermatozóides no lúmen) (Média ± Erro Padrão).	102

Tabela 16: Perfil dos ácidos graxos da musculatura branca em fêmeas de *Arapaima gigas* nos diferentes estádios do ciclo reprodutivo (Média $\pm$ Erro Padrão). **104**

Tabela 17: Perfil dos ácidos graxos da musculatura branca em machos de *Arapaima gigas* do grupo 1 (Poucos espermatozóides no lúmen) e grupo 2 (Muitos espermatozóides no lúmen) (Média $\pm$ Erro Padrão). **105**

Tabela 18: Perfil dos ácidos graxos da musculatura vermelha em fêmeas de *Arapaima gigas* nos diferentes estádios do ciclo reprodutivo (Média $\pm$ Erro Padrão). **107**

Tabela 19: Perfil dos ácidos graxos da musculatura vermelha em machos de *Arapaima gigas* do grupo 1 (Poucos espermatozóides no lúmen) e grupo 2 (Muitos espermatozóides no lúmen) (Média $\pm$ Erro Padrão). **108**

Tabela 20: Perfil dos ácidos graxos da *ventrecha* em fêmeas de *Arapaima gigas* nos diferentes estádios do ciclo reprodutivo (Média $\pm$ Erro Padrão). **110**

Tabela 21: Perfil dos ácidos graxos da *ventrecha* em machos de *Arapaima gigas* do grupo 1 (Poucos espermatozóides no lúmen) e grupo 2 (Muitos espermatozóides no lúmen) (Média $\pm$ Erro Padrão). **111**

Tabela 22: Perfil dos ácidos graxos do tecido adiposo cavitário em fêmeas de *Arapaima gigas* nos diferentes estádios do ciclo reprodutivo (Média $\pm$ Erro Padrão). **113**

Tabela 23: Perfil dos ácidos graxos do tecido adiposo cavitário em machos de *Arapaima gigas* do grupo 1 (Poucos espermatozóides no lúmen) e grupo 2 (Muitos espermatozóides no lúmen) (Média $\pm$ Erro Padrão). **115**

Tabela 24: Esteróides sexuais plasmáticos em fêmeas de *Arapaima gigas* nos diferentes estádios do ciclo reprodutivo. (Média $\pm$ Erro Padrão). **116**

Tabela 25: Esteróides sexuais plasmáticos em machos de *Arapaima gigas* nos grupos 1 e 2. (Média $\pm$ Erro Padrão). **116**

Tabela 26: Esteróides sexuais do líquido encefálico em fêmeas e machos de *Arapaima gigas*. (Média $\pm$ Erro Padrão). **117**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: **a)** *Arapaima gigas* coletado em seu ambiente natural. Ilha Mexiana – PA; **b)** Ilha Mexiana, localizada no Arquipélago de Marajó no estado do Pará. 118

Figura 2: **a)** Ponto de coleta; Canal Taboca – Ilha Mexiana/PA; **b)** Ponto de coleta; Canal João Ferreira – Ilha Mexiana; **c)** Coleta de *A. gigas* com rede de arrasto no canal João Ferreira; **d)** Local onde os peixes eram conduzidos para coleta do material. 119

Figura 3: **a)** Localização do ovário de *A. gigas* dentro da cavidade celomática. Somente o ovário esquerdo desenvolvido; **b)** Ovário de *A. gigas* imaturo; **c)** Ovário de *A. gigas* em repouso; **d)** Ovário de *A. gigas* em maturação; **e)** Ovário de *A. gigas* maduro; **f)** Ovário de *A. gigas* em regressão. 120

Figura 4: **a)** Seta indicando ninho de oogônias; **b)** Oócitos perinucleolares em vários estádios de desenvolvimento (setas); **c)** Oócito cortical-alveolar (seta); **d)** Oócito vitelogênico (seta). **Fig. b,c,d:** Barra = 100 μm ; **a:** Barra = 10 μm . 121

Figura 5: **a)** Camadas foliculares (setas); **b)** Oócito cortical alveolar com núcleo periférico (seta); **c)** Oócitos atrésicos (setas); **d)** Folículo pós-ovulatório (seta). **Figs b, c, d:** Barra = 100 μm ; **a:** Barra = 10 μm . 122

Figura 6: **a)** Testículo de *A. gigas* (seta) envolto por tecido adiposo (asterisco); **b)** Túbulo seminífero contendo células da linhagem germinativa (seta); **c)** Lúmen do testículo dos animais do grupo 1 contendo poucos espermatozóides (setas) **d)** Lúmen do testículo dos animais do grupo 2 contendo muitos espermatozóides (seta). **Figs. c, d:** Barra = 100 μm ; **b:** Barra = 30 μm . 123

Figura 7: **a)** Média mensal da temperatura da água (°C) da região do Marajó do ano de 2008. **b)** Média mensal da precipitação pluviométrica da região do Marajó do ano de 2008. **124**

Figura 8: **a)** Índice Gonadossomático (%) em fêmeas de *A. gigas* ao longo do ciclo reprodutivo; **b)** Índice Gonadossomático (%) em machos de *A. gigas* nos grupos 1 e 2. **125**

Figura 9: **a)** Razão 11ceto-T/17 β -estradiol em fêmeas de *A. gigas*. Abaixo de 2,5 (linha vermelha) os animais são fêmeas; **b)** Razão 11ceto-T/17 β -estradiol em machos de *A. gigas*. Os animais que não entraram na razão (em círculo) estavam abaixo de 2,5 (linha vermelha). **126**

ANEXOS

- 1 – Protocolo de Análises dos Esteróides Gonadais (17 α -hidroxiprogesterona, 17 β -estradiol, testosterona e 11ceto-testosterona). **127**
- 2 - Análises de substratos metabólicos (lipídios totais e proteínas totais) **132**

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar possíveis alterações fisiológicas associadas à reprodução em machos e fêmeas de *Arapaima gigas* (pirarucu) em seu ambiente natural. O pirarucu (*Arapaima gigas*) é uma espécie de respiração aérea que pertence ao mais primitivo grupo dos teleósteos, que habita as águas do rio Amazonas. Os objetivos principais foram caracterizar o perfil plasmático dos esteróides gonadais plasmáticos (17β -Estradiol, Testosterona, 11ceto-Testosterona (11ceto-T) e 17α -hidroxiprogesterona (17α -OHP)); concentrações de lipídios e proteínas teciduais (gônadas, fígado, músculo branco, vermelho e *ventrecha*), e o perfil de ácidos graxos ao longo do ciclo reprodutivo de machos e fêmeas coletados em seu ambiente natural localizado na Ilha Mexiana no estado do Pará/Brasil. As coletas foram realizadas em Setembro/2007; Janeiro/2008; Julho/2008 e Setembro/2008 e foram determinados quatro estádios de maturação gonadal para as fêmeas: Repouso, Maturação, Maduro e Regressão. No presente estudo foram observados ainda animais imaturos. Os machos foram classificados em relação à quantidade de espermatozóides presente nos túbulos seminíferos, sendo que os animais que apresentavam poucos espermatozóides no lúmen são referidos como grupo 1 e os animais que apresentavam muitos espermatozóides no lúmen como grupo 2. As análises histológicas realizadas nas gônadas permitem concluir que o pirarucu possui ovário do tipo gymno-ovariano com desenvolvimento oocitário assincrônico e a estrutura testicular de *A. gigas* é do tipo não cística. As análises metabólicas em fêmeas mostraram que a *ventrecha* é o tecido de maior concentração de lipídios, seguido do músculo vermelho e branco, evidenciando que, dentre os diferentes tipos musculares, a *ventrecha* é a região preferencial de armazenamento de lipídios. As concentrações lipídicas teciduais, demonstraram um aumento no acúmulo gonadal e hepático à medida que o ciclo reprodutivo avança, alcançando a concentração máxima na fase madura. Já as proteínas hepáticas e gonadais não apresentaram diferença significativa entre os estádios reprodutivos. Nos

machos, os lipídios e as proteínas não apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos em nenhum tecido analisado. Os PUFA's (ácidos graxos polinsaturados) n3 na fração polar ovariana foram maiores na fase madura em relação às demais fases reprodutivas, inclusive no animal imaturo, sendo que essa alta porcentagem reflete na importância desses ácidos graxos no ovo, que serão utilizados para o futuro desenvolvimento da larva. De uma forma geral, foi observada uma característica de maior porcentagem de PUFA's n6 (fração polar) e PUFA's n3 (fração neutra) do tecido hepático em animais imaturos quando comparados às fêmeas adultas. Nos machos, os ácidos graxos monoinsaturados foram maiores no grupo 2 no músculo branco e *ventrecha*, devido à necessidade de um maior aporte energético na musculatura para o comportamento reprodutivo. Os resultados das análises plasmáticas dos esteróides gonadais mostraram que o perfil de 17 β -Estradiol em fêmeas apresentou-se alto nas fases iniciais do ciclo reprodutivo, decaindo na fase madura e regressão, provavelmente devido ao *feedback* negativo. Os animais imaturos apresentaram as maiores concentrações plasmáticas de 17 β -Estradiol e 17 α -OHP em relação aos adultos, já que esses hormônios estimulam o desenvolvimento de características secundárias, desenvolvimento neural, crescimento e maturação sexual nos animais imaturos, em machos e fêmeas. Foram observadas altas concentrações de 17 α -OHP nos machos em ambos os grupos sugerindo a disponibilidade desse hormônio para a conversão de 17 α ,20 β -DHP, que atua na motilidade dos espermatozoides, já que ambos os grupos apresentam espermatozoides no lúmen. As concentrações de testosterona excedem à de 11ceto-T em machos, sugerindo que essa espécie esteja utilizando outros andrógenos e não somente a 11ceto-T para a reprodução. O acompanhamento destes animais no ambiente natural evidencia que não é possível utilizar características secundárias como coloração da escama como indicativo do sexo, porém a sexagem é possível de se realizar utilizando a razão entre os hormônios plasmáticos 11ceto-T e 17 β -Estradiol.

ABSTRACT

The aim of the present study was to investigate the possible physiological alterations related with reproduction in males and females of *Arapaima gigas* (pirarucu) in their natural environment. Pirarucu is an obligatory aerial respiration species belonging to a very ancient group of teleosts and inhabits Amazonian river. The main goals of this study were to describe the plasmatic gonad steroids profile (17β -Estradiol, Testosterone, 11keto-Testosterone (11keto-T) and 17α -hidroxyprogesterone (17α -OHP)), lipids and proteins concentrations of the main storage tissues (gonads, white muscle, red muscle and *ventrecha*), and fatty acid profile along the reproductive cycle of males and females collected in their natural environment at Ilha Mexiana (Pará/ Brazil). The animals were caught from the wild in September/2007, January/2008, July/2008 and September/2008 and four stages of gonad development were determined: Rest, Maturation, Mature and Regression. Immature animals were also observed. Males were classified according to spermatozoid amount inside the seminiferous tubes, and the animals having a few spermatozooids were referred as group1 and those having many spermatozooids were referred as group 2. Microscopic analyses allowed concluding that pirarucu has gymno-ovary type with assynchronic oocyte development and testis has non-cystic structure. The metabolic analyses in females showed that the tissue presenting the highest lipids concentration was the *ventrecha*, followed by the red and white muscle, suggesting that *ventrecha* is the preferred lipids storage among different muscles. Lipids concentrations increased in ovaries and liver along the reproductive cycle, getting the highest value at mature stage. Liver and gonads protein did not show any difference among the reproductive stages. Lipids and proteins in males did not present any difference between the groups of any analyzed tissue. In polar lipids ovary fraction, PUFA (polyunsaturated fatty acids) n3 were higher at mature stage, compared with the other stages of the reproductive cycle and immature animals, and these high amounts reflect the importance of those fatty acids, that will be used in the larval development. In general, the immature animals showed the highest percentage of PUFA n6 (polar fraction) and PUFA

n3 (neutral fraction) in the liver when compared with adults females. Monounsaturated fatty acids in males in group 2 were higher in white muscle and *ventrecha*, because those muscles have an intense energetic demand for reproductive behavior. 17β -Estradiol was higher in females, at initial stages of the reproductive cycle, decreasing at mature and regression stages, probably due to a negative feedback. Immature animals showed the highest concentrations of 17β -Estradiol and 17α -OHP, probably because these steroids stimulate sexual secondary features, neural development, growth and sexual maturity in those animals. 17α -OHP concentrations were higher in both male groups, suggesting its availability for 17α , 20β -DHP conversion, an important steroid on spermatozoid motility. Testosterone concentrations in males exceed 11ceto-T , suggesting that other androgens were more effective and not just 11ceto-T , for reproduction. On this environment, features like scales coloration as secondary feature were not suggested to distinguish the sex of those animals, but it is possible when using 11ceto-T and 17β -Estradiol plasma ratio.

1. INTRODUÇÃO

Os peixes compõem um amplo grupo dentro dos vertebrados, sendo o mais antigo e mais diversificado do subfilo Vertebrata, incluído no Filo Chordata (Hickman *et. al.*, 2004). Este grupo representa aproximadamente 50% dos vertebrados, englobando cerca de 28.000 espécies reconhecidas atualmente (Nelson, 2006).

Os peixes desenvolveram adaptações fisiológicas que os capacitaram a invadir qualquer habitat aquático. Eles ocupam ambientes aquáticos mais diversos, ocorrendo desde as altas altitudes, onde o oxigênio é rarefeito e a temperatura atmosférica é muitas vezes abaixo de zero, até as fossas submarinas dos oceanos, onde a pressão é várias centenas de atmosferas (Vazzoler, 1996).

Sua distribuição nos ambientes aquáticos continentais e marinhos, considerando-se que a água doce cobre apenas 1% da superfície terrestre, é bastante desproporcional, sendo que 41% das espécies de peixes são de água doce (Wootton, 1990). Assim, uma estimativa avalia que os peixes marinhos têm de 10 a 10.000 vezes mais espaço disponível por indivíduo que os de água doce (Horn, 1972).

Além de ser um grupo amplamente representativo em espécies, os peixes estão entre os recursos naturais mais importantes do mundo, provendo um número além de 100 milhões de toneladas ao ano de biomassa no mundo todo (Hilborn *et al.*, 2003). Estes recursos são intensamente explorados na pesca extrativista, levando várias espécies de peixes com interesse comercial à sobrexploração. Uma alternativa à intensa exploração pesqueira, seria a produção de organismos aquáticos por meio do cultivo, atividade conhecida como aquicultura. Porém, atualmente o extrativismo representa o maior problema para o desenvolvimento da aquicultura brasileira. O Brasil, detendo cerca de 12% da água doce mundial em conjunto com ótimas condições climáticas, ainda apresenta baixa produtividade na piscicultura intensiva e semi-intensiva, quando comparado à produção mundial (Lovshin & Cyrino, 1997),

pois a base da produção de pescados ainda é principalmente dependente dos produtos advindos do extrativismo.

Além da produção de alimentos, deve-se destacar que a aquicultura brasileira também possui grande importância na preservação de espécies ameaçadas de extinção, devido ao cultivo dessas espécies em cativeiro e posteriormente, na instalação de programas adequados de repovoamento em áreas impactadas. Porém, sabe-se que o sucesso do cultivo de uma espécie só é obtido com o conhecimento da biologia dessa espécie e, em especial da biologia reprodutiva.

Os teleósteos apresentam várias estratégias reprodutivas, com espécies que apresentam desenvolvimento indireto, com larvas e metamorfose total, e outras com desenvolvimento direto, sem a fase larval. Do mesmo modo, ocorrem casos em que machos e fêmeas são indistinguíveis externamente, até outros em que indivíduos dos dois sexos desempenham papéis distintos, em comportamentos sexuais elaborados, como corte e acasalamento. A fecundidade das diferentes espécies de peixes também apresenta uma amplitude de variação, onde de um lado, ocorrem espécies que liberam um grande número de oócitos e espermatozóides, livres no meio aquático, número esse suficiente para balancear as pressões ambientais, mas estas espécies geralmente não dispensam qualquer cuidado à prole. Por outro lado, ocorrem espécies com fecundação e desenvolvimento interno, verificando-se a liberação apenas quando o novo organismo está apto a viver independentemente (Vazzoler, 1996).

Durante a reprodução, as células germinativas femininas passam por profundas modificações durante seu desenvolvimento, podendo-se caracterizar fases ao longo desse processo, que seguem denominações distintas por diferentes autores. A dinâmica do desenvolvimento oocitário difere entre as espécies e define a estratégia temporal de reprodução da espécie, que pode ser dividida em (Rocha & Rocha, 2006):

Sincrônico em um grupo: As células oocitárias existentes nos ovários maturam concomitantemente, sendo eliminadas de uma vez só durante o período de desova, caracterizando uma desova única na vida do animal.

Sincrônico em dois grupos: A cada período de reprodução evidenciam-se lotes de oócitos dentro dos ovários, sendo que os oócitos que compõem cada lote se desenvolvem sincronicamente e, à medida que os lotes mais desenvolvidos atingem a maturação completa, são eliminados, caracterizando uma desova total, que ocorre em um único período;

Sincrônico em mais de dois grupos: Neste mecanismo de desenvolvimento, os oócitos que compõem cada lote se desenvolvem sincronicamente e, à medida que aqueles lotes mais desenvolvidos atingem a maturação completa, são eliminados, desse modo, a cada período de desova, verifica-se a eliminação sucessiva de oócitos maduros. O número de lotes intra-ovarianos é de no mínimo três podendo atingir uma dezena.

Assincrônico: Neste caso, dentro dos ovários, não se evidenciam lotes de oócitos no mesmo estágio de maturação, estando presentes oócitos em todas as fases de desenvolvimento, ocorrendo sua eliminação à medida que vão atingindo a maturação completa.

A partir do momento em que a idade de primeira maturação é atingida, as variáveis ambientais passam a atuar sobre os indivíduos, de modo que as condições na época de desova sejam favoráveis à sobrevivência e crescimento da prole (Vazzoler, 1996). As variáveis ambientais, como temperatura da água, fotoperíodo e regime de chuvas, modulam a reprodução em peixes. O desenvolvimento sexual e a ovulação em algumas espécies são modulados pelo fotoperíodo, podendo adiantar ou atrasar o tempo de maturação e desova. Em outras espécies, o fator ambiental predominante para o início do ciclo reprodutivo é a temperatura da água, combinada ao fotoperíodo (Peter & Yu, 1997).

Espécies tropicais tendem a desovar continuamente ao longo do ano ou apresentam picos geralmente associados com a estação chuvosa. Para espécies que vivem nas regiões temperadas e desovam na primavera e verão,

o crescimento gonadal é estimulado por longos fotoperíodos, geralmente em combinação com temperaturas mais altas. Já nas espécies que desovam no outono e inverno, o crescimento gonadal é estimulado por uma diminuição do fotoperíodo (Baldisserotto, 2002).

Como dito anteriormente, essas variáveis ambientais modulam a reprodução em peixes, que é controlada endogenamente por um sistema endócrino, principalmente pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, que sintetiza e libera neurohormônios, gonadotropinas, esteróides gonadais e hormônios liberadores do processo reprodutivo, entre outras substâncias (Kawauchi & Sower, 2006) como será descrito a seguir.

1.2. Controle do Eixo Reprodutivo Hipotálamo-Hipófise-Gônadas

O controle endócrino do ciclo reprodutivo em fêmeas de teleósteos é modulado por fatores ambientais que agem sobre o hipotálamo, conduzindo à secreção de GnRH (hormônio liberador de gonadotropinas), e sobre a hipófise, resultando na produção e liberação de GtHs (gonadotropinas) na corrente sanguínea. Estas, por sua vez, chegam aos ovários, promovendo a síntese dos esteróides gonadais (Rocha & Rocha, 2006).

Os esteróides gonadais atuam na diferenciação dos tecidos somáticos e na gametogênese, estimulam o desenvolvimento de caracteres sexuais secundários e o comportamento reprodutivo. As funções são diferenciadas dependendo se o peixe é imaturo ou maduro. Nos animais imaturos, os hormônios gonadais geralmente estimulam a diferenciação sexual e nos maduros, estimulam a gametogênese e a desova ou espermição (Baldisserotto, 2002).

De uma forma geral o controle endócrino do ciclo reprodutivo em fêmeas é modulado por fatores ambientais, que estimulam o hipotálamo a sintetizar e liberar o hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH), que estimula as células gonadotrópicas da hipófise a sintetizar e liberar o hormônio folículo estimulante (FSH), que via corrente sanguínea chega às camadas foliculares do ovário e na

camada teca, converte o colesterol em testosterona. Esta é transportada à camada granulosa, na qual é aromatizada em 17β -estradiol pela enzima aromatase, também sob influência do FSH (Nagahama, 1994).

O 17β -estradiol age no fígado, estimulando a síntese de vitelogenina, que promove crescimento no oócito e incorporação de vitelo. Na fase de vitelogênese, que é um processo pelo qual o citoplasma do oócito acumula substâncias de reservas para posterior utilização pela larva, ocorre um aumento nos níveis plasmáticos de 17β -estradiol e testosterona, e esse aumento inibe a síntese de FSH através de *feedback* negativo e juntamente com ação do GnRH estimulam a secreção hipofisária do hormônio luteinizante (LH) nas fases finais da vitelogênese. O LH estimula a camada teca do folículo a produzir o 17α -hidroxiprogesterona (17α OHP), que é transportada à camada granulosa e convertida a 17α - 20β -dihidroxi-4-pregnen-3-one (17α 20β P) pela enzima 20β -hidroxi-esteróide-desidrogenase (20β HSD). O 17α 20β P é o hormônio efetivo da maturação final do oócito e ovulação na maioria dos teleósteos (Young *et al.*, 2005).

Em machos adultos, o controle da síntese de esteróides é semelhante ao das fêmeas. FSH e LH estimulam a esteroidogênese testicular e espermatogênese, sendo os andrógenos, testosterona e 11-ceto-testosterona produzidos pelas células de Leydig nos testículos (Cyr & Eales, 1996). A testosterona e 11ceto-testosterona promovem a espermatogênese nos testículos e a 17α 20β P tem relação com a motilidade dos espermatozóides (Young *et al.*, 2005).

Assim como os esteróides gonadais apresentam variações dos seus níveis circulantes durante a reprodução, alterações na composição de alguns tecidos, principalmente os de reserva energética também são descritas.

1.3. Substratos Metabólicos e Mobilização Energética Reprodutiva

Os substratos energéticos (principalmente as proteínas e lipídios) têm sido utilizados para avaliar o perfil de mobilização energética dos animais, bem

como identificar o hábito alimentar e a deposição energética, indicando a preferência no acúmulo e mobilização destes substratos nos diferentes grupos de vertebrados submetidos às mais diversas condições.

A energia armazenada é importante para o suporte de vários eventos fisiológicos do organismo e o alto conteúdo calórico de lipídios faz este grupo de componentes um eficiente armazenador energético, sendo o mais significativo em muitos animais (Sheridan, 1994). Nos peixes, os lipídios são fontes energéticas importantes na reprodução, sendo imprescindíveis para o desenvolvimento dos ovos, construção de ninhos, corte ou ainda proteção da prole (Wiegand, 1996).

Sabe-se que no processo de maturação gonadal, as fêmeas requerem uma quantidade de macro e micronutrientes que serão transferidos para os oócitos em desenvolvimento, o que envolve processos de mobilização de reservas para as gônadas, reservas estas que são previamente armazenadas em diferentes tecidos como fígado, músculo, tecido adiposo ou ainda intestinos.

Os lipídios mobilizados são transportados no sangue e são basicamente de três origens: dieta, que são agregados na mucosa intestinal e transportados para o sangue como quilomícrons; lipídios endógenos, que são processados no fígado e transportados no sangue como lipoproteína de densidade muito baixa (*Very Low Density Protein* – VLDL); e finalmente os lipídios mobilizados dos órgãos de armazenamento, principalmente na forma de ácidos graxos (Sheridan, 1994).

No entanto, a estratégia de mobilização deste substrato pode variar dependendo da espécie. Trabalhos pioneiros desde a década de 60 já mostravam que as reservas de proteína e lipídio diminuem durante o desenvolvimento gonadal (revisão em Love, 1980). Já em outras espécies, as reservas não são significativamente reduzidas durante o crescimento ovariano, mas começam a decair durante o período de desova, como por exemplo, em *Salmo gairdneri* (Nassour & Léger, 1989). A qualidade dos ovos e das larvas está relacionada com a qualidade das reservas nutricionais disponível nos oócitos em desenvolvimento. Como dito anteriormente, essas reservas

oocitárias (vitelo) são mobilizadas a partir dos lipídios e proteínas armazenadas em diversos tecidos, e a composição do alimento ingerido é de grande importância no desenvolvimento das gônadas (principalmente nos ovários), o que leva a supor que alterações na cadeia trófica certamente influenciarão a qualidade e/ou quantidade de vitelo armazenado. Quando as dietas maternas são deficientes, a transferência de ácidos graxos torna-se insuficiente para o desenvolvimento oocitário adequado, podendo reduzir a fecundidade e a viabilidade da progênie. Os lipídios que são transferidos para as gônadas são incorporados como material nutritivo no citoplasma dos oócitos e servem como principal fonte alimentar endógena para o desenvolvimento do embrião (Adams, 1999).

Segundo Nelson & Cox (2005), os lipídios podem ser classificados como neutros e polares. Os lipídios neutros são extraídos de tecidos com éter etílico, clorofórmio ou benzeno e os lipídios polares são extraídos com solventes orgânicos polares como etanol e metanol, que apresentam características polares.

Compostos como triacilglicerol e os produtos da sua hidrólise por ação de lipases (diacilglicerol, monoacilglicerol, e ácidos graxos livres) são lipídios neutros. Os triacilgliceróis consistem de três longas cadeias de ácidos graxos ligados a um glicerol e são as principais formas de armazenamento de energia em tecidos animais (Kramer & Hulan, 1987 *apud* Schreiner, 2003)

A maioria dos lipídios contém ácidos graxos, que apresentam um importante papel em muitas funções biológicas como precursores de eicosanóides, e estão presentes na composição de membranas celulares e lipoproteínas. Alguns ácidos graxos, chamados ácidos graxos essenciais, não são biossintetizados por alguns animais, sendo necessário o consumo de seus precursores na dieta (Jobling, 1994).

O ácido linoléico (LA; 18:2 n_6) (n = Omega) e o ácido α -linolênico (ALA; 18:3 n_3) são ácidos graxos essenciais, precursores do ácido araquidônico (AA; 20:4 ω_6), e ácidos docosahexanóico (DHA; 22:6 n_3) e eicosapentanóico (EPA; 20:5 n_3), respectivamente (Arts *et. al.*, 2001).

Os peixes são capazes de sintetizar diferentes ácidos graxos por um processo de desaturação e alongação da cadeia de carbono. Em comum com outros vertebrados, os peixes não possuem enzimas desaturases $\Delta 12$ e $\Delta 15$ necessárias para sintetizar $18:2n_6$ e $18:3n_3$, respectivamente, dessa forma, devem obter estes ácidos graxos na dieta (Henderson & Tocher, 1987).

De uma forma geral, os peixes podem apresentar diferentes padrões de mobilização de lipídios durante o ciclo reprodutivo, e esta variação ocorre devido principalmente às estratégias reprodutivas, disponibilidade e qualidade do alimento na fase de vitelogênese, *habitat*, idade do animal e outros parâmetros, que são revisados por Love (1980). Os níveis de lipídios armazenados se alteram significativamente ao longo do tempo entre os indivíduos e populações, em resposta às necessidades energéticas. Em períodos com abundância de recursos ou ainda baixa demanda energética, os teores de lipídio geralmente aumentam nos órgãos de armazenamento e quando a demanda energética aumenta, os lipídios são mobilizados e seus níveis diminuem (Meffe & Snelson, 1993; Moreira *et al.*, 2002).

Assim como o metabolismo de lipídios sofre alterações relacionadas ao ciclo reprodutivo, são observadas também alterações no metabolismo de proteínas durante os diferentes estádios de maturação dos animais fazendo com que alguns tecidos passem por variações no conteúdo de proteínas (Moreira *et al.*, 2002).

Em peixes, a mobilização de reservas energéticas se dá primeiramente pelas proteínas, posteriormente lipídios e carboidratos (Mommensen, 2001). Isto se deve ao fato dos peixes apresentarem menor consumo de energia, principalmente por não precisarem regular sua temperatura corpórea, além disso, gastam relativamente menos energia para se manter em movimento na água (Cyrino *et al.*, 2004).

Os peixes têm alto e constante requerimento de proteínas para a construção de novos tecidos, reparo de tecidos danificados e para seu metabolismo (Singh, 2007). No trabalho realizado por Gomes (2007), animais mais ativos, como o cará (*Geophagus brasiliensis*), tendem a mobilizar mais

proteínas do que animais sedentários, como o cascudo (*Hypostomus* sp.). Alguns tecidos passam por um aumento na taxa de degradação de proteínas e acredita-se que a maior fonte de proteína para os peixes origina-se da musculatura.

Dessa forma, esses parâmetros metabólicos relacionados à fisiologia reprodutiva, bem como os hormônios envolvidos no controle endócrino, em referência aos esteróides gonadais, foram aqui investigados numa espécie íctica considerada de grande importância na fauna aquática brasileira.

1.4. A espécie – *Arapaima gigas*

O pirarucu (*Arapaima gigas*) habita as águas quentes (24 a 31°C) da bacia Amazônica, sendo encontrado no rio Amazonas, nos seus lagos e efluentes e no rio Araguaia (Pereira, 1954), assim como na Amazônia peruana, na Colômbia e Guiana. A espécie é conhecida no Brasil, quando jovem por bodeco, em função de hábito de saltar na água, enquanto o adulto é chamado de pirarucu.

Taxonomicamente, o pirarucu é classificado como *Arapaima gigas*, pertence à classe Actinopterygii, ordem Osteoglossiformes, família Osteoglossidae, na qual ocorrem dois gêneros: *Osteoglossum* e *Arapaima*. Ambos os gêneros só ocorrem na Amazônia e estão relacionados aos gêneros *Scleropages*, que ocorre na Austrália, e *Heterotis*, que ocorre na África (Nelson, 1994).

Arapaima gigas pertence ao mais primitivo grupo dos teleósteos sendo o maior peixe de água doce da América do Sul. Na fase juvenil, tem coloração predominantemente escura e nos indivíduos adultos, particularmente na época da reprodução, os animais passam a apresentar escamas com coloração avermelhada na parte posterior, principalmente na região caudal e parte inferior do corpo. Acredita-se que nos machos essa coloração é ainda mais acentuada podendo chegar até a região do opérculo (Ferraris, 2003).

Pinese (1996) sugere que o pirarucu tenha hábito alimentar filtrador, apresentando padrões anatômicos característicos de animais onívoros, entretanto, há muito tempo é conhecido hábito alimentar do pirarucu como essencialmente piscívoro (Fontenele, 1948). Assim seu hábito alimentar reforça uma importância ecológica, além da econômica, já que espécies predadoras participam do equilíbrio ambiental como reguladoras das populações de outras espécies. De acordo com Nikolsky (1976), os peixes carnívoros constituem elementos que aumentam a estabilidade do ecossistema, na medida em que regulam a abundância de diferentes espécies forrageiras.

As características anatômicas, fisiológicas e comportamentais de *Arapaima gigas* são responsáveis por uma série de adaptações para a sobrevivência ao ambiente em que vive (com baixas concentrações de oxigênio dissolvido na água e pelas suas águas de pH ácido), que certamente permitiu a sobrevivência dessa espécie nos dias atuais. O pirarucu possui respiração aérea obrigatória, através de modificações da bexiga natatória, e complementar respiração aquática, na qual as brânquias possuem papel importante na excreção de CO₂ e regulação iônica. Em águas normóxicas, o pirarucu obtém 75% do oxigênio do ar, alcançando 100% de oxigênio do ar em águas anóxicas.

Por ser considerado um peixe nobre, com uma carne de ótima qualidade, o pirarucu vem sofrendo uma grande pressão de pesca, o que têm depreciado os seus estoques naturais. Venturieri e Bernardino (1999) registram que a captura desta espécie diminuiu de 1.751 toneladas em 1984, para 207,5 toneladas em 1996, no estado do Amazonas. Este quadro levou à espécie a ser incluída pela IUCN (*International Union for Conservation of Nature*) na lista vermelha de espécies ameaçadas como *Data Deficient specie* (DD) e classificada como em risco pelo *Convention on International Trade of Endangered Species of Wild Fauna and Flora* (CITES – Appendice II).

Segundo Imbiriba (1991), mesmo havendo medidas de proteção, a pesca do pirarucu na Amazônia ameaça a sobrevivência da espécie, pois é praticada de modo predatório. Além disso, a característica de respiração aérea desses animais expõe os reprodutores à fácil captura com auxílio de arpão e rede de

espera, permanecendo apenas os filhotes, os quais, porém, tornam-se sujeitos à dizimação pelos peixes carnívoros predadores.

A maturidade sexual dessa espécie no seu *habitat* natural é atingida entre os quatro e cinco anos de idade, quando atingem aproximadamente 150 cm e 40 kg de peso (Fontenele, 1948). Machos e fêmeas apresentam uma única gônada funcional localizada no lado esquerdo da cavidade abdominal (Godinho *et al.*, 2005). O pirarucu é uma espécie lântica e, segundo Hoar (1969), estas espécies não realizam migrações reprodutivas e fazem seus ninhos em locais com pouca movimentação de água. Este mesmo autor, também relatou que os ovos são, geralmente, maiores e em menor número do que nas espécies reofílicas.

No tocante aos aspectos reprodutivos da espécie, ainda existem muitas lacunas que dependem de estudos na natureza e em cativeiro para serem preenchidas. São animais que formam casais monogâmicos para a reprodução, apresentam cuidado parental, realizam a construção de ninhos e possuem desova parcelada. Algumas informações sobre a morfologia da hipófise e das células germinativas do pirarucu estão sendo investigadas (Venturieri *et al.*, 2002), mas os aspectos fisiológicos básicos da sua reprodução ainda são desconhecidos. Em relação aos estudos sobre níveis hormonais em pirarucu, algumas bibliografias estão disponíveis como o trabalho apresentado por Monteiro (2005), com animais em cativeiro e destaque para o trabalho de Chu-Koo *et al.* (2009), com animais em ambiente natural. Em relação aos aspectos metabólicos envolvidos no ciclo reprodutivo, não foi encontrada nenhuma referência na literatura.

Considerando-se a importância ecológica do pirarucu *Arapaima gigas* e dentro do quadro atual de desconhecimento a respeito de sua fisiologia, o estudo dos esteróides gonadais e o perfil metabólico envolvidos no processo reprodutivo se fazem necessário para fornecer subsídios para a manutenção correta de seus estoques naturais, assim como otimizar o desempenho desse animal durante o cultivo em pisciculturas comerciais e de conservação.

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente trabalho é caracterizar o perfil endócrino dos esteróides gonadais e de alguns parâmetros metabólicos associados à reprodução ao longo do ciclo reprodutivo de machos e fêmeas de *Arapaima gigas* (pirarucu) coletados em seu ambiente natural.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a concentração dos esteróides gonadais plasmáticos (17β -Estradiol, Testosterona, 11-ceto-Testosterona e 17α -hidroxiprogesterona) no plasma e na secreção cefálica de *A. gigas* ao longo do ciclo reprodutivo em ambiente natural ;
- Acompanhar o metabolismo lipídico e protéico plasmático e tecidual ao longo do ciclo reprodutivo de *A. gigas* em ambiente natural;
- Avaliar o perfil de ácidos graxos teciduais nos diferentes estádios de maturação de *A. gigas* em ambiente natural;
- Avaliar a viabilidade de utilizar alguns indicadores plasmáticos dos animais do presente estudo para inferir no sexo e estágio de desenvolvimento reprodutivo.

3. MATERIAIS E MÉTODO

3.1. Local de Captura – Ilha Mexiana, arquipélago do Marajó/ Pará

As coletas periódicas foram realizadas no ambiente natural do pirarucu (figura 1a), localizado na Ilha Mexiana – PA (figura 1b) pertencente ao Complexo Marajó. A Ilha Mexiana, situada na foz do Rio Amazonas, exatamente sobre a linha do Equador é uma das mais antigas do Pará, com cerca de 100 mil hectares. Por se situar na zona do Equador, possui predominantemente o clima equatorial tropical, marcado por uma abundância de chuvas. O índice pluviométrico médio anual é de 2.000 mm³, variando de 1.677 mm³ a 3.215 mm³ e é menor entre os meses de julho a outubro, e maior entre o período de novembro a abril, conhecido como época da cheia. O arquipélago de Marajó concentra as áreas mais úmidas do estado do Pará, chegando a 80% de umidade relativa do ar (www.amazonia.gov.br, acessado em 28/01/2009).

A Ilha Mexiana possui ao longo de seu território, vários canais com abundante presença do pirarucu. Os canais nomeados como Tabocas (S00°.02'.689"; W049°.33'.243"), João Ferreira (S00°.03'.711"; W049°.35'.230"), Caju (S00°.03'.810"; W049°.31'.772"), Caranguejos (S00°.03'.314"; W049°.34'.159"), Mel (S00°.01'.512"; W049°.30'.491") e Pioneira (S00°.00'.410"; W049°.31'.959") são os principais canais da Ilha e onde ocorreram as principais capturas dos animais (figura 2 a e b).

3.2. Delineamento Experimental

As coletas foram realizadas ao longo de 1 ano e programadas para a obtenção de todos os estádios do ciclo reprodutivo de *A. gigas*. Foram totalizadas quatro coletas realizadas em Setembro/2007; Janeiro/08; Junho/2008 e Setembro/2008.

Durante o experimento, foi capturado um total de 50 animais nos canais da Ilha acima citados, incluindo machos e fêmeas, adultos e bodecos (nome regional dado aos animais jovens). Para sua captura utilizou-se redes de arrasto que foram conduzidas lentamente em toda a largura do canal e os animais, por serem de grande porte, foram colocados em redes para transporte, nas quais foram conduzidos até pequenos tanques montados próximo à beira do canal onde se iniciou o procedimento de amostragem (figuras 2 c, d) e o registro dos dados morfométricos e ponderais.

Os animais foram imobilizados e para a obtenção do plasma, uma amostra de sangue foi retirada através da vasculatura caudal (cerca de 5 ml) utilizando seringas e agulhas descartáveis previamente heparinizadas (Heparina Sódica Lique mine-5000 UI/Roche). O sangue coletado foi transferido para tubos de 15 ml previamente heparinizados e centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos, sendo o plasma separado em alíquotas e armazenado em nitrogênio líquido, transportado para São Paulo em gelo seco, até ser estocado em freezer -80°C. No plasma sanguíneo, foram quantificados os hormônios esteróides: 17 β -Estradiol; testosterona e 17 α -hidroxiprogesterona utilizando kits de Elisaimunoensaio da marca Interkit[®], e a 11ceto-Testosterona, também através do método de Elisaimunoensaio com kits da marca Cayman Chemicals[®]. As leituras das placas foram realizadas em leitora de microplaca (Spectra MAX 250) a um comprimento de onda de 450 nm para os hormônios 17 β -Estradiol; testosterona e 17 α -hidroxiprogesterona e 405 nm para a 11ceto-Testosterona. O detalhamento do protocolo está descrito em anexo.

No plasma, além dos esteróides gonadais, foi determinada a concentração plasmática de proteínas totais, lipídios totais e colesterol contribuindo na interpretação do perfil lipídico e protéico que está sendo mobilizado em função da reprodução.

Paralelamente à obtenção do sangue, uma amostra de 3ml de secreção cefálica foi retirada de glândulas localizadas na região parietal do animal utilizando seringas com agulhas descartáveis. Esse líquido possui consistência viscosa e coloração transparente e sua retirada foi realizada rapidamente assim

que o animal foi retirado da água, para evitar o ressecamento da glândula. Observou-se ainda que a presença deste líquido não ocorre somente durante a reprodução do animal, ocorrendo tanto nos machos, quanto nos animais imaturos. Na literatura pertinente, não há relatos sobre a composição desse líquido, portanto, no presente trabalho, resolveu-se investigar a possível presença dos esteróides gonadais: 17β -Estradiol, Testosterona e 17α -hidroxiprogesterona, postulando a hipótese de uma possível relação com a reprodução.

Posteriormente à coleta de sangue e da secreção cefálica, o comprimento total (Lt), medido da ponta do focinho até o término da nadadeira caudal de cada exemplar foi aferido com o uso de uma trena e a massa corporal com o uso de uma balança mecânica. Após o registro dos dados morfométricos e ponderais, os animais foram sacrificados com um rápido golpe na cabeça.

Para a observação e retirada das gônadas foi feita uma incisão ventral, a partir do poro genital em direção à cabeça, expondo toda sua cavidade corporal. As gônadas foram analisadas quanto ao seu aspecto macroscópico (tamanho, cor, vascularização), retiradas e pesadas em balança de precisão para o cálculo do Índice Gonadossomático (IGS), que expressa a porcentagem que as gônadas representam em relação ao peso total do animal, sendo um indicador eficiente do estado funcional das gônadas. O IGS é calculado através da seguinte fórmula:

$$\text{IGS} = (\text{massa gonadal} / \text{massa corpórea}) \times 100$$

Após a retirada da gônada da cavidade celomática, foram retirados fragmentos dos terços anterior, médio e posterior do ovário e do testículo para posterior análise histológica. A determinação dos estádios de maturação gonadal foi realizada com base nas características macroscópicas e microscópicas dos ovários.

Após a retirada da gônada, foram coletadas amostras de tecidos da musculatura branca e vermelha, fígado, tecido adiposo cavitário e também amostras de *ventrecha*, que é uma musculatura localizada na região abdominal do animal, rica em gordura. Uma pequena amostra desses tecidos foi colocada em tubos criogênicos e armazenados em nitrogênio líquido até serem estocadas em freezer -80°C. Para esses tecidos, foram realizadas análises de proteínas, lipídios totais e perfil de ácidos graxos podendo assim traçar um perfil desses substratos e verificar possíveis mobilizações dos principais ácidos graxos durante os diferentes estádios de maturação do ciclo reprodutivo.

Os tecidos musculares (branco, vermelho e *ventrecha*), tecido adiposo e o fígado foram selecionados por serem tecidos de armazenamento de lipídios e proteínas na maioria das espécies já estudadas, nas quais esses substratos são armazenados e/ou recrutado durante a reprodução. O fígado, apesar de não armazenar as proteínas produzidas, é responsável pela produção da vitelogenina, que é exportada ao ovário, podendo ser também considerado com um órgão armazenador secundário de lipídios em muitos teleósteos. As gônadas também foram caracterizadas por supostamente apresentarem grandes alterações na sua composição durante o ciclo reprodutivo.

Todas as amostras foram preservadas em nitrogênio líquido durante a permanência na Ilha Mexiana. Após as coletas, as amostras foram transferidas em gelo seco até a Universidade de São Paulo, onde foram estocadas em freezer -80°C no Laboratório de Metabolismo e Reprodução de Organismos Aquáticos, localizado no Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da USP (Universidade de São Paulo).

3.3. Análises de Substratos Metabólicos

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método colorimétrico de Lowry *et al.*, (1951) após a precipitação e solubilização das proteínas dos tecidos segundo Milligan *et. al.*, (1993). A análise da concentração de proteínas plasmáticas não necessitou de precipitação e

solubilização prévia. A concentração de proteínas foi calculada com base em curva padrão de albumina bovina (Sigma).

Os lipídios totais foram extraídos com clorofórmio: metanol: água (2: 1: 0,5) de acordo com o método de Folch *et al.* (1957) e os teores desses lipídios totais plasmáticos e teciduais determinados pelo método colorimétrico de Frings *et al.* (1972), utilizando-se como padrão óleo de fígado de bacalhau (Sigma).

Para o perfil dos ácidos graxos, o extrato lipídico foi separado em lipídio neutro (triacilglicerol) e polar (fosfolipídios) utilizando uma coluna de sílica ativada (Yang, 1995). Cada fração foi posteriormente metilada com *acetyl chloride* (5% HCl em metanol) (Christie, 2003) e a composição de ácidos graxos foi determinada como éster de metil usando um cromatógrafo gasoso (GC) Varian modelo 3900 acoplado a um ionizador de chama (FID). Os ácidos graxos foram identificados por comparação ao tempo de retenção, usando um padrão de éster de metil conhecido (FAME) (Supelco, 37 *components* – Sigma-Aldrich).

Os teores de colesterol plasmático foram determinados pelo método enzimático-colorimétrico (CELM) utilizando “kits” comerciais da marca Liquiform Labtest. O método baseia-se na dosagem de um composto de coloração vermelha obtido após uma série de reações enzimáticas que ocorrem a partir dos ésteres de colesterol presentes no plasma.

O detalhamento do protocolo para as proteínas totais, lipídios totais e colesterol estão descritos em anexo.

3.4. Análise Histológica

Fragmentos de ovário e testículo foram fixados em Bouin acético (75% de ácido pícrico, 20% de formol e 5% de ácido acético glacial) por 24 horas, e após esse período foram lavados em água corrente, para retirada do excesso de fixador do material biológico e transferidos para álcool etílico 70% onde permaneceram até o processamento histológico.

As amostras de gônadas fixadas foram processadas conforme técnicas histológicas rotineiras, ou seja, desidratação em álcool, diafanização em xilol, inclusão em parafina, corte em micrótomo (Leica – RM/2155, equipado com lâminas descartáveis) com secções de 5µm de espessura e coloração com Hematoxilina-Eosina (HE). O detalhamento do protocolo está descrito em anexo. As lâminas foram analisadas sob microscopia de luz (*ZEISS- Axioskop2*) com a obtenção das imagens através em um sistema computadorizado de captura de imagens (PIXERA) no Laboratório de Endocrinologia de Peixes no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP).

3.5. Método de análise dos resultados – Análise Estatística

Para a análise dos resultados, os dados coletados foram agrupados por estádios de maturação gonadal. Os valores de cada parâmetro foram comparados ao longo do experimento entre os diferentes estádios de maturação, utilizando-se o teste de Análise de Variância (one-way ANOVA) do programa *Sigma Stat* versão 3.1. No caso dos resultados cumprirem os requisitos de uma análise paramétrica, os mesmos foram comparados utilizando o teste *Student-Newmann-Keuls*.. Para os dados não paramétricos foi aplicado o teste *Dunn's* ou o teste de *Tukey*.

4. RESULTADOS

4.1. Morfologia do ovário e fases de desenvolvimento oocitário

A caracterização precisa dos estádios de maturação gonadal em peixes baseia-se nos resultados de uma combinação de análises histológicas e extensivas observações de campo. As observações diretas das gônadas, realizadas em campo durante as coletas, forneceram várias informações importantes que contribuíram para o correto entendimento das variações fisiológicas reprodutivas que ocorrem nos animais no ambiente natural.

Dada a importância de uma correta identificação do estágio reprodutivo, dos animais, foi realizada uma detalhada análise macroscópica e microscópica das gônadas de *Arapaima gigas* que serão descritas a seguir.

As fêmeas de *Arapaima gigas* apresentam um único ovário funcional localizado ao lado esquerdo da cavidade abdominal sendo o outro lado do órgão atrofiado. O ovário funcional esquerdo está localizado na cavidade celomática, ventralmente ao rim e à vesícula gasosa, e dorsalmente ao tubo digestório (figura 3a).

A região anterior do ovário é livre e vai se afunilando a medida que vai alcançando a parte posterior. Não foi observada nenhuma cápsula ovariana revestindo o ovário, e as lamelas ovígeras contendo os oócitos estão dispostas paralelamente. Foi constatado ainda que o ovário de *Arapaima gigas* apresenta variações de tamanho e coloração nos diferentes estádios reprodutivos e oócitos em diferentes fases de desenvolvimento foram vistos a olho nu. Diferentemente dos peixes de desova total, o ovário de *Arapaima gigas* ocupa uma pequena parte da cavidade celomática, mesmo nos estádios mais avançados da maturação ovariana.

Na literatura são encontradas diversas descrições quanto ao aspecto macroscópico das gônadas de peixes em relação ao ciclo reprodutivo, e as classificações não apresentam uma nomenclatura uniforme devido às diversas divisões e subdivisões adotadas pelos diferentes autores.

As características morfológicas e a classificação dos estádios reprodutivos do ovário de *Arapaima gigas* já foram descritas por Godinho *et. al.* (2005), no entanto, estes autores não apresentam muitos detalhes em relação à análise microscópica das gônadas. No presente trabalho, além da descrição proposta por estes autores, foi estabelecido um padrão de classificação macroscópica juntamente com as características de desenvolvimento oocitário descritos por Vazzoler (1996) para peixes teleósteos, determinando assim quatro estádios de maturação gonadal para fêmeas de *Arapaima gigas* seguindo as análises macroscópicas e histológicas: Repouso, Maturação, Maduro e Regressão. No presente estudo foram observados ainda animais imaturos.

Imaturo: o ovário imaturo ou virgem apresenta-se muito pequeno e filamentosos. Sua coloração é avermelhada, mas sem sinais de vascularização (figura 3b). Neste estágio não é possível observar oócitos a olho nu.

Ovários imaturos foram coletados em animais jovens (“bodecos”) com comprimento médio de 1,29 m e peso médio de 11,8 kg. Neste estágio o peso médio dos ovários foi de 1,88 g.

Repouso: o ovário apresenta tamanho reduzido, sendo maior que os imaturos. São translúcidos, de coloração avermelhada, com fraca vascularização, não se observando oócitos a olho nu (figura 3c). As lamelas ovígeras são mais longas devido ao aumento de volume que ocorreu no decorrer do estágio anterior, e nem sempre apresentam disposição tão ordenada como a de ovários imaturos.

Ovários neste estágio foram encontrados em animais já adultos, com comprimento médio de 1,35 m e peso médio de 23,0 kg. O peso médio dos ovários foi de 11,12 g.

Maturação: o ovário é claramente maior em relação ao repouso e intensamente vascularizado. Apresenta coloração rosada e é possível enxergar

oócitos a olho nu, de todos os tamanhos, com predominância de ovos pequenos e médios (figura 3d). O comprimento médio dos animais coletados neste estágio foi de 1,50 m com peso médio de 31,8 kg. O peso médio dos ovários foi de 75,91 g.

Maduro: o ovário se apresenta túrgido, com mudança brusca de coloração, passando de rosado para esverdeado e preenchendo grande parte da cavidade celomática. São visíveis muitos oócitos grandes, opacos e/ou translúcidos com vascularização um pouco mais reduzida do que no estágio anterior. Neste estágio, o ovário atinge seu desenvolvimento pleno (figura 3e). O comprimento médio dos animais que se encontravam nesse estágio reprodutivo foi de 1,67 m com peso médio de 47,9 kg, sendo que o peso médio dos ovários alcançou o valor de 585,13 g.

Regressão: o estágio de regressão é caracterizado por apresentar uma grande quantidade de oócitos atrésicos, nomenclatura utilizada aos oócitos em qualquer fase do seu desenvolvimento, que começam a sofrer um processo de reabsorção celular. Macroscopicamente, o ovário apresenta-se relativamente grande, com coloração rosada sendo facilmente confundido com o estágio de maturação. Há presença de muitos oócitos esbranquiçados, que estão em estado de reabsorção (figura 3f). O comprimento médio dos animais capturados nesta fase é de 1,61 m com peso médio de 37,7 kg. O peso médio dos ovários foi de 88,77g.

4.2. Tipos Celulares Germinativos

De uma forma geral, as mudanças macroscópicas observadas nos ovários durante o ciclo reprodutivo, como o aumento de tamanho e alteração da coloração, refletem na dinâmica reprodutiva, porém não é possível verificar o desenvolvimento das células germinativas, que é de grande importância para caracterizar corretamente as etapas do ciclo reprodutivo.

Sabendo que os oócitos passam por várias fases de desenvolvimento, foi objetivo do presente trabalho, identificar, através de análises histológicas, os tipos celulares predominantes em cada estágio do ciclo reprodutivo. Essas células passam por diversas fases de crescimento e diferenciação, as quais podem ser classificadas segundo Rocha & Rocha (2006) para peixes de água doce.

Oogônias: são células germinativas grandes, com citoplasma pouco corado, núcleos grandes com um ou dois nucléolos (figura 4a). Possuem uma elevada relação citoplasma/núcleo. A partir deste, originam-se todos os outros tipos de oócitos em desenvolvimento. Em *Arapaima gigas*, estas células foram freqüentemente visualizadas em animais imaturos e no estágio de repouso.

Cromatina-nucleolar: nesta fase de desenvolvimento, essas células aparecem agrupadas em ninhos ou em desenvolvimento inicial, apresentam tamanho reduzido e estão inseridas nas lamelas ovígeras. Seu citoplasma é escasso, o núcleo arredondado, com um único nucléolo de posição central e intensamente basófilo. Estas células posteriormente dão origem aos oócitos perinucleolares. Foi identificado esse tipo celular principalmente no ovário em repouso e imaturo.

Perinucleolar: esses oócitos separam-se do ninho de oogônias e há um aumento de seu volume. O citoplasma é bem definido e mais basófilo que na fase anterior. Os nucléolos vão se tornando numerosos e migram para a periferia do núcleo (figura 4b). São células conhecidas como estoque de reserva e estão presentes em todos os estádios de maturação gonadal. Os oócitos perinucleolares foram as estruturas mais frequentemente observadas em todos os estádios de maturação gonadal, inclusive no estágio maduro (avaliação qualitativa).

Formação da vesícula vitelínica (Oócito Cortical-Alveolar): estes oócitos apresentam nítida vacuolização no citoplasma, que representa deposições lipídicas, que são “lavadas” no preparo do material (devido ao uso de álcool) não se corando com Hematoxilina-Eosina. Essas vesículas lipídicas vão se dispondo na periferia do citoplasma, conferindo ao mesmo um aspecto alveolar ou reticulado (figura 4c). São bem maiores em tamanho em relação aos perinucleolares. O núcleo cresce, mas não na mesma proporção do citoplasma, contendo vários nucléolos alongados e achatados e o envoltório folicular apresenta-se mais espesso.

Oócitos cortical-alveolar também foram visualizados em todos os estádios reprodutivos de *Arapaima gigas*, exceto no repouso, com incidência maior nos estádios de maturação e maduro.

Vitelogênico: podem ser visualizados nestes oócitos, muitos glóbulos de vitelo, característico dessa etapa do desenvolvimento. Esses grânulos, localizados inicialmente na periferia do citoplasma, empurram os vacúolos para dentro da célula, preenchendo assim quase todo o citoplasma (figura 4d). O núcleo apresenta contorno irregular e a membrana folicular torna-se evidentemente mais espessa (figura 5a). Estas são as células em estágio de maturação mais avançada observadas na linhagem germinativa e sua ocorrência se dá em ovários maduros. Quando os oócitos atingem essa fase, inicia-se a migração do núcleo para onde será o pólo animal da célula e assim estarem prontos para serem eliminados do folículo (figura 5b). Os oócitos vitelogênicos foram visualizados em grandes quantidades no estágio maduro e com baixa incidência no estágio de maturação e regressão em *Arapaima gigas*.

Atrésicos: os oócitos atrésicos são células germinativas derivadas de qualquer fase do desenvolvimento que passam por um processo de reabsorção celular, configurando um aspecto de desorganização dos componentes citoplasmáticos. O oócito perde sua forma arredondada típica e o núcleo, agora

basófilo, aparece com contornos irregulares em função da desintegração da carioteca, sofrendo migração para o pólo animal. As células foliculares apresentam hiperplasia e hipertrofia (figura 5c). Os oócitos atrésicos foram visualizados principalmente nos ovários em regressão.

Além dos tipos celulares descritos, é importante descrever a presença dos folículos pós-ovulatórios, encontrados nas análises dos ovários. Estes originam-se dos folículos vazios, após a liberação dos oócitos vitelogênicos. As células foliculares começam a hipertrofiar-se, penetrando no espaço antes ocupado pelo oócito, constituindo um corpo formado por cordões contíguos de células e que podem estar dobrados em várias direções. Estas células geralmente apresentam-se retangulares e com citoplasma basófilo (figura 5d). Os folículos pós-ovulatórios foram visualizados em todos os estádios reprodutivos de *Arapaima gigas*, exceto nos ovários imaturos e em repouso.

4.3. Morfologia do testículo

Em machos, assim como nas fêmeas, somente a gônada esquerda foi encontrada, apresentando-se na forma de uma estrutura alongada esbranquiçada e de pequeno diâmetro, ocupando um pequeno volume dentro da cavidade celomática quando comparado aos ovários. O testículo esquerdo localiza-se dentro da cavidade celomática, perto da bexiga natatória, envolta por tecido adiposo (figura 6a). Sua porção caudal final continua num ducto espermático que se abre na papila genital. Macroscopicamente, o testículo não apresentou diferenças morfológicas que permitissem a classificação em diferentes estádios reprodutivos, pois o desenvolvimento testicular é muito sutil tornando difícil a classificação macroscópica, com exceção de alguns animais que apresentavam sêmen no testículo.

Quando os testículos de *A. gigas* foram analisados quanto ao seu aspecto microscópico, verificou-se que, ao contrário da maioria dos teleósteos, o pirarucu possui túbulos seminíferos muito semelhantes aos de mamíferos, ou

seja, não existem cistos de aparência convencional e as células estão distribuídas ao longo do epitélio germinativo não de forma cística.

No lúmen dos túbulos seminíferos, foram identificadas células da linhagem germinativa (figura 6b). Por não haver nenhuma descrição na literatura do desenvolvimento testicular do pirarucu, e não sendo o objetivo do presente trabalho sua descrição histológica, os machos foram divididos em dois grupos de acordo com a quantidade de espermatozóides no lúmen dos túbulos (avaliação qualitativa). Durante as análises, foi identificado ainda um indivíduo imaturo do sexo masculino, e por não apresentar espermatozóides nos túbulos seminíferos, foi excluído do presente trabalho.

Sendo assim, os machos não foram classificados por estádios de maturação, mas sim em relação à quantidade de espermatozóides presentes nos túbulos seminíferos. Para o presente trabalho, os animais que apresentavam poucos espermatozóides no lúmen são referidos como grupo 1 (figura 6c) e os animais que apresentavam muitos espermatozóides no lúmen como grupo 2 (figura 6d) (avaliação qualitativa).

4.4. Relação entre Ciclo Reprodutivo e Época do Ano

Durante as coletas realizadas ao longo de um ano, observou-se uma periodicidade no processo reprodutivo de *Arapaima gigas*, com reproduções ocorrendo basicamente no período de cheia, que é bastante proeminente nesta região sem muita relação com a temperatura, que apresenta pouca variação anual (figura 7a). A maturação gonadal inicia-se com o aumento das chuvas, que começa a partir de dezembro. Durante o evento da cheia, época em que o índice pluviométrico é bastante elevado e constante, forma-se um ambiente lântico bastante propício para sua reprodução, com a formação de várias lagoas marginais, constituindo assim as condições ambientais favoráveis à fecundação e desenvolvimento da prole para esta espécie. A precipitação pluviométrica na região alcançou os maiores valores nos meses de janeiro a maio, justamente no

período reprodutivo do pirarucu, alcançando o pico máximo no mês de fevereiro com 556,10 mm e o menor valor no mês de outubro com 40,40 mm (figura 7b).

A primeira coleta foi realizada em setembro de 2007, final da época da seca, quando os animais apresentavam seus ovários predominantemente nas fases de repouso com alguns animais já começando o processo de maturação. Em janeiro de 2008, no ápice da cheia, todos os animais coletados apresentavam seus ovários maduros, cheios de oócitos vitelogênicos prontos para serem desovados. No mês de julho de 2008, com a diminuição das chuvas, os animais coletados apresentavam na sua maioria, ovários em regressão. Na última coleta realizada em setembro de 2008, novamente as fêmeas apresentavam seus ovários em repouso e início da maturação, fechando assim um ciclo reprodutivo inteiro. Nesta ocasião, foram coletados também indivíduos imaturos (bodecos).

Pelas observações realizadas na Ilha Mexiana, o período reprodutivo do pirarucu ocorre entre novembro a março. Esse padrão foi observado para os animais que habitam a Ilha Mexiana, que é uma região com baixa atividade antrópica.

Já para os machos, as análises macroscópicas se mostraram muito subjetivas, pois os testículos apresentavam uma morfologia macroscópica bastante semelhante entre as coletas, com exceção daqueles que se encontravam bem próximos à espermição, nos quais foi observada a presença de sêmen em alguns indivíduos, nas coletas realizadas em janeiro/08 e um único indivíduo na coleta de junho/08. Analisando a histologia dos testículos, constatou-se a presença de espermatozóides no lúmen dos túbulos em indivíduos em todas as coletas realizadas (set/07; jan/08; jul/08 e set/08), no entanto, somente nas coletas de jan/08 e jul/08 pôde-se observar um testículo maior com a presença de sêmen. Sugere-se que a produção de espermatozóides nesse animal ocorra constantemente, porém com uma baixa produção no início do ciclo reprodutivo, e somente algumas horas que antecede o acasalamento é que começa a ser produzido em grande quantidade.

4.5. Índice Gonadosomático

Os dados morfométricos e ponderais dos animais utilizados no presente estudo foram registrados e, assim como os valores de Índice Gonadosomático, encontram-se na tabela 01.

Em função da estreita relação entre o avanço do processo de maturação gonadal e o consequente aumento de volume das gônadas, o índice gonadosomático (IGS), que expressa a porcentagem que as gônadas representam da massa total dos indivíduos, é um indicador eficiente para avaliar o estado funcional dos ovários.

Em fêmeas de *Arapaima gigas* até o tamanho de primeira maturação, a massa das gônadas é pequena, como pode ser observado pelo IGS dos animais imaturos ($0,026\% \pm 0,002$), iniciando sua variação cíclica a partir do início do ciclo reprodutivo. O maior valor de IGS foi observado para as fêmeas maduras ($1,228\% \pm 0,343$) com diferença estatística para as demais fases do ciclo reprodutivo: repouso ($P < 0,001$), maturação ($P < 0,001$), regressão ($P < 0,001$) e imaturo ($P < 0,001$). O incremento da massa ovariana do estágio de repouso para maturação foi de 4,5x e foi ainda observado um incremento de 5,6x do estágio de maturação para maduro. Desta forma, durante as fases de desenvolvimento gonadal, verifica-se um marcado aumento da massa ovariana, que é confirmado pelos valores de IGS. Esse aumento gonadal é devido ao amadurecimento dos oócitos que, quando maduros, apresentam tamanho aumentado devido à deposição de vitelo.

Esta variação do IGS pode ser observada ao longo do ciclo reprodutivo, demonstrando o período de desova dos animais, evidente apenas para as fêmeas (figuras 8 a, b). Para os machos, o IGS não foi um parâmetro adequado para o estabelecimento do período reprodutivo.

4.6. Análises Metabólicas

As concentrações de lipídios totais foram observadas em vários tecidos de armazenamento ao longo do ciclo reprodutivo, como fígado, musculatura esquelética branca e vermelha e na *ventrecha* (musculatura ventral armazenadora de lipídios). Além desses tecidos, foram analisadas também as concentrações de lipídios nas gônadas e no plasma.

Na tabela 02 observa-se que, a *ventrecha* é o tecido de maior concentração de lipídios em todas as fases reprodutivas, seguido do músculo vermelho e branco, evidenciando que, dentre os diferentes tipos musculares, a *ventrecha* é a região preferencial de armazenamento de lipídios. A *ventrecha* apresentou os maiores valores de lipídios na fase madura ($221,87 \pm 21,62$ mg/g), sendo maior estatisticamente entre todas as fases reprodutivas: repouso ($P=0,038$), maturação ($P<0,001$), regressão ($P<0,001$) e imaturo ($P<0,001$). Durante o repouso, observou-se também uma alta concentração lipídica ($171,18 \pm 40,77$ mg/g) que foi maior estatisticamente em relação à maturação ($P=0,010$), regressão ($P=0,010$) e imaturo ($P=0,008$).

Da mesma forma, o músculo vermelho apresentou os maiores valores de lipídios também na fase madura ($82,19 \pm 10,47$ mg/g), sendo diferente estatisticamente da fase de maturação ($P<0,05$). O músculo branco foi o tecido de menor concentração de lipídios em relação às outras musculaturas e não apresentou variações ao longo do ciclo reprodutivo. De forma geral, nota-se que nas fêmeas, a *ventrecha* e o músculo vermelho tendem a acumular mais lipídio em relação ao músculo branco, principalmente na fase madura do ciclo reprodutivo.

Em relação às proteínas totais (tabela 02), em fêmeas, o maior valor obtido foi para a *ventrecha* no animal imaturo ($182,64 \pm 9,38$ mg/g) que foi maior estatisticamente em relação às demais fases do ciclo: repouso ($P=0,008$), maturação ($P=0,002$), maduro ($P<0,001$) e regressão ($P=0,030$), demonstrando que os animais jovens armazenam mais proteínas nesse tecido em relação aos adultos que necessitam de uma disponibilidade maior desse substrato para a

reprodução. Considerando-se o ciclo reprodutivo, a menor concentração de proteínas na *ventrecha* ocorreu na fase madura ($23,56 \pm 3,95$ mg/g) que diferiu estatisticamente das demais fases: repouso ($P=0,025$), maturação ($P=0,002$) e regressão ($P=0,028$).

Semelhante à *ventrecha*, a musculatura branca também demonstrou uma maior concentração de proteínas em indivíduos imaturos em relação aos adultos da fase madura do ciclo reprodutivo ($P<0,05$), mas sem diferença estatística para os demais estádios. Já o músculo vermelho não apresentou diferença estatística entre os animais imaturos e os adultos dentro do ciclo reprodutivo.

Observando as concentrações lipídicas gonadais (tabela 03), verifica-se que ocorre, de uma forma geral, um aumento na concentração lipídica a medida que o ciclo reprodutivo avança, alcançando a concentração máxima na fase madura ($133,06 \pm 8,7$ mg/g). Após essa fase, observa-se que a concentração lipídica decai no estágio de regressão ($36,98 \pm 11,55$ mg/g), uma vez que nesta fase o substrato depositado nos oócitos na forma de vitelogenina começa a ser reabsorvido do ovário. A fase madura foi estatisticamente maior em relação aos demais estádios reprodutivos: repouso ($P<0,001$), maturação ($P<0,001$), regressão ($P<0,001$) e dos animais imaturos ($P<0,001$).

Com relação à concentração de lipídios totais hepáticos (tabela 03), o maior valor encontrado foi na fase de regressão ($33,19 \pm 2,97$ mg/g), que diferiu estatisticamente em relação ao repouso ($P=0,002$), maturação ($P<0,001$) e dos animais imaturos ($P=0,019$). A fase madura também demonstrou uma alta concentração desse substrato ($31,59 \pm 3,30$ mg/g) diferindo estatisticamente em relação ao repouso ($P=0,019$), maturação ($P=0,002$) e dos animais imaturos ($P=0,005$).

Nos machos, as análises das concentrações de proteínas e lipídios totais foram realizadas também em diferentes tecidos e os resultados encontram-se nas tabelas 04 e 05.

Dentre as diferentes regiões de músculos estudados, assim como nas fêmeas, a *ventrecha* foi o tecido de maior concentração lipídica, seguido do

músculo vermelho e branco para os dois grupos estudados. Já para as proteínas totais, em ambos os grupos (1 e 2), o tecido de maior concentração foi o músculo branco em relação a *ventrecha* e ao músculo vermelho. Não houve diferença estatística para as proteínas e lipídios do músculo branco, vermelho e *ventrecha* entre o grupo 1 e 2. Esses resultados demonstram que, nos machos, a musculatura branca é o principal tecido armazenador de proteínas e a *ventrecha* para os lipídios, independente do grupo experimental (1 e 2).

Os lipídios totais hepáticos assim como as proteínas nos machos (tabela 05) não apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos. Para os testículos de *A. gigas*, esse mesmo resultado foi observado, demonstrando concentrações homogêneas de proteínas e lipídios entre os grupos.

Considerando-se as concentrações lipídicas no plasma das fêmeas (tabela 06), o maior valor absoluto foi encontrado nos animais imaturos que, comparando com os adultos, foi maior estatisticamente em relação à fase madura ($P < 0,05$). Entre os animais adultos, as maiores concentrações foram encontradas na maturação, que novamente foi maior estatisticamente em relação à fase madura ($P < 0,05$). Já a menor concentração de lipídio plasmático foi encontrada na fase madura, sugerindo que todo o lipídio circulante na fase anterior foi absorvido ou pelo ovário ou até mesmo por algum órgão de armazenamento, como o fígado e/ou músculo, pois todos eles demonstraram um aumento da concentração lipídica da fase de maturação para madura.

O colesterol plasmático não apresentou diferença estatística nas fêmeas entre os estádios reprodutivos. Isso evidencia que as altas concentrações lipídicas plasmáticas observadas no estágio imaturo e maduro em fêmeas não são devido à presença do colesterol. Da mesma forma, as concentrações de proteínas totais plasmáticas mantiveram-se equivalentes ao longo do ciclo reprodutivo em fêmeas, não apresentando diferença estatística entre os estádios.

Com relação aos machos, as concentrações de lipídios, proteínas e colesterol plasmático não apresentaram diferença estatística entre os grupos 1 e 2 (tabela 07).

4.7. Perfil de Ácidos Graxos

Os ácidos graxos do fígado e gônadas foram separados em fração neutra e polar podendo assim identificar os principais ácidos graxos direcionados ao armazenamento energético (neutros) e aqueles constituintes das membranas celulares (polares). Em relação ao músculo branco, músculo vermelho e *ventrecha*, não foi realizado o procedimento de separação das frações neutra e polar, sendo apresentado o perfil dos ácidos graxos totais desses tecidos.

De uma forma geral, os ácidos graxos analisados em todos os tecidos de *Arapaima gigas*, como músculos, gônadas e fígado, apresentam uma elevada porcentagem de ácidos graxos saturados, com os maiores valores para o 16:0 e 18:0, e também para os monoinsaturados como o 18:1, em ambas as frações neutras e polares. Os ácidos graxos polinsaturados (PUFA) diferem bastante em suas porcentagens quando analisados nos diferentes tecidos, mas os PUFA n6 estão sempre presentes em maior quantidade em relação aos PUFA n3. O ácido graxo 20:4n6 (ácido araquidônico – AA) é predominantemente o PUFA n6 presente em maior porcentagem em todos os tecidos e o 22:6n3 (ácido docosahexanóico – DHA) o PUFA n3 presente em maiores porcentagens. Importantes ácidos graxos como os PUFA com 18 carbonos também foram presentes em altas porcentagens em todos os tecidos.

Na fração neutra do fígado, tanto em fêmeas quanto em machos, foram encontradas altas porcentagens de ácidos graxos saturados e monoinsaturados, lembrando que esses ácidos graxos são os principais recrutados para o aporte energético, seguido pelos polinsaturados (PUFA) n6 e n3 (tabelas 08 e 09).

Com relação às fêmeas, os monoinsaturados encontrados em maior porcentagem foram o 18:1n11 seguido do 16:1. Para os monoinsaturados na

fração neutra do fígado, as fêmeas em regressão apresentaram as maiores porcentagens em relação aos animais em maturação ($P < 0,05$), isso devido principalmente à alta porcentagem do 18:1n11 (tabela 08).

Ainda com relação às fêmeas, os PUFA n3 também apresentaram os maiores valores nos animais imaturos em relação aos animais em regressão ($P = 0,034$). De acordo com a tabela, pode-se verificar que o ácido graxo 22:6n3 é o responsável pela alta porcentagem de PUFA n3 encontrado nos animais imaturos.

Na porção neutra do fígado de machos (tabela 09), os animais do grupo 1 apresentaram as maiores porcentagens de PUFA n3 quando comparados com o grupo 2 ($P < 0,05$). Essa diferença ocorreu devido a maior porcentagem encontrada no 22:6n3 nos machos do grupo 1.

Com relação à fração polar dos ácidos graxos hepáticos, as fêmeas em regressão apresentaram as maiores porcentagens dos ácidos graxos saturados e foram maiores estatisticamente em relação aos animais imaturos ($P = 0,021$), isso devido às altas porcentagens de 16:0 e 18:0 (tabela 10).

A porcentagem de PUFA n6 também apresentou diferença estatística nos lipídios polares hepáticos entre os animais imaturos e os adultos que se encontram dentro do ciclo reprodutivo. A porcentagem dos PUFAs n6 nos animais imaturos foi maior em relação ao repouso ($P = 0,049$), maduro ($P = 0,009$) e regressão ($P = 0,042$) demonstrado pela alta porcentagem de 20:4n6 e 22:4n6. Já os machos não apresentaram diferença estatística nos ácidos graxos da fração polar do fígado entre os grupos estudados (tabela 11).

Na fração neutra dos ácidos graxos gonadais em fêmeas (tabela 12), os saturados apresentaram a maior porcentagem nos animais em regressão em relação ao imaturo ($P = 0,014$), isso devido aos altos valores de 16:0 e 18:0 que foram 1,6x e 2x maiores respectivamente nos animais em regressão. Os polinsaturados apresentaram os maiores valores variando de 4,31 a 8,88% para o 20:4n6 e 3,66 a 5,83% para o 22:6n3, porém estes não apresentaram diferença estatística significativa entre os estádios reprodutivos. Os machos

também não apresentaram diferença estatística significativa dos ácidos graxos entre os grupos na fração neutra dos testículos (tabela 13).

Com relação à fração polar do ovário, os PUFA n3 apresentaram uma alta porcentagem no estágio maduro do ciclo reprodutivo, sendo estatisticamente maior em relação aos demais estádios (tabela 14). A porcentagem de PUFA n3 no estágio maduro foi maior em relação ao animal imaturo ($P=0,008$), ao repouso ($P=0,005$), maturação ($P=0,005$) e regressão ($P=0,004$). A porcentagem de 22:6n3 foi a responsável por esta diferença e alcançou 13,65% nos animais maduros, ou seja, um aumento de 3,5x em relação aos animais imaturos; 3,1x em relação aos animais em repouso; 1,9x em relação aos animais em maturação e 2,3x em relação aos animais em regressão.

Nos machos, na fração polar dos testículos, as maiores porcentagens de polinsaturados foram encontradas nos PUFA 20:4n6 e 22:4n6, porém sem nenhuma diferença estatística significativa quando comparado os grupos (tabela 15).

No músculo branco das fêmeas (tabela 16), os ácidos graxos monoinsaturados estiveram presentes em maiores porcentagens nos animais em regressão em relação aos demais estádios do ciclo reprodutivo. Os monoinsaturados foram maiores nos animais em regressão em relação aos animais imaturos ($P<0,001$), repouso ($P=0,002$), maturação ($P<0,001$) e maduro ($P<0,001$). Dos monoinsaturados presentes na musculatura branca, o 18:1n11 apresentou-se em 17,28%, ou seja, um valor 1,6x maior em relação ao animal imaturo, 1,3x maior em relação ao repouso e 1,4x maior do que os animais em maturação e maduro.

Nos machos, o perfil de monoinsaturados também mostrou-se elevado no grupo 2 em relação ao grupo 1 ($P=0,036$), onde novamente o principal monoinsaturado encontrado responsável por essa diferença foi o 18:1n11. Sendo assim os machos que estão nos estádios reprodutivos mais avançados apresentam um maior acúmulo de monoinsaturados no músculo branco em relação aos que se encontram nos estádios menos avançados (tabela 17).

Ainda no músculo branco em machos, o inverso foi constatado para PUFA n3, que apresentaram as maiores porcentagens no grupo 1 em relação ao grupo 2 ($P=0,039$), ou seja, existe um maior acúmulo de PUFA n3 no músculo branco quando eles ainda se encontram nas fases iniciais reprodutivas. O 22:6n3 foi o principal ácido graxo responsável por esta diferença.

No músculo vermelho, não houve diferença estatística entre os estádios reprodutivos em fêmeas, e entre os grupos 1 e 2 nos machos, nas diferentes classes de ácidos graxos (tabelas 18 e 19).

Dentre as musculaturas, quando analisado o teor de lipídios totais, a *ventrecha* foi o tecido de maior concentração lipídica encontrado em *Arapaima gigas*, devido a alta incidência de ácidos graxos saturados e monoinsaturados (tabelas 20 e 21). A porcentagem de ácidos graxos saturados e monoinsaturados na *ventrecha* nos machos foram maiores nos animais do grupo 2 em relação ao grupo 1 para ambas as classes de ácidos graxos ($P=0,037$ e $P<0,05$ respectivamente). O aumento na porcentagem do 14:0; 16:0 e 18:0 foram os responsáveis pela maior porcentagem de ácidos graxos saturados no grupo 2 enquanto que a maior porcentagem de monoinsaturados se deve principalmente a maiores porcentagens de 16:1 e 18:1n11 foram os responsáveis pela alta porcentagem encontrada no grupo 2.

Na *ventrecha*, o perfil de PUFA n3 foi o mesmo encontrado na musculatura branca em machos, com um maior porcentagem para o grupo 1 do que o grupo 2 ($P=0,009$). Assim como observado no músculo branco, os principais PUFAS n3 encontrados na *ventrecha* responsáveis por esta diferença foram o 18:3n3 e o 20:5n3.

No tecido adiposo cavitário não foi encontrada nenhuma diferença estatística no perfil dos ácidos graxos, entre os diferentes estádios reprodutivos em fêmeas (tabela 22) e entre os grupos 1 e 2 nos machos (tabela 23).

4.8. Esteróides Gonadais

As concentrações dos esteróides gonadais: 17 β -Estradiol, Testosterona, 11ceto-Testosterona (11ceto-T) e 17 α -hidroxiprogesterona (17 α -OHP) plasmáticas obtidas em fêmeas e machos de *A. gigas* ao longo do ciclo reprodutivo encontram-se descritas nas tabelas 24 e 25.

Em fêmeas, o perfil de 17 β -Estradiol elevou-se da fase de repouso (com um incremento de 1,6x) para a fase de maturação (223,77 $\pm$ 37,72 pg/ml) (P=0,037) com conseguinte queda nas fases posteriores. A diminuição deste hormônio da maturação para fase madura foi de 2,6x com diferença estatística significativa (P=0,011) e de 7,2x para a fase de regressão (P<0,001).

A menor concentração de 17 β -Estradiol foi observada no estágio de regressão (31,03 $\pm$ 5,39 pg/ml) e foi menor estatisticamente em relação à fase de repouso (P=0,024) e aos animais imaturos (P=0,034).

Nos machos, as concentrações de 17 β -Estradiol foram maiores para o grupo 1 (34,92 $\pm$ 8,26 pg/ml), com diferença estatística em relação ao grupo 2 (8,99 $\pm$ 2,17 pg/ml), (P=0,027). Se analisarmos os valores absolutos do 17 β -Estradiol nos machos, verifica-se que mesmo a concentração mais alta obtida no grupo 1 apresenta-se baixa em relação às fêmeas.

A testosterona plasmática em fêmeas apresentou a maior concentração na fase de maturação (1126,4 $\pm$ 263,08 pg/ml) e a menor concentração na fase de regressão (194,23 $\pm$ 52,14 pg/ml), com diferença estatística significativa entre esses dois estádios (P<0,05). A testosterona em fêmeas serve como substrato para a síntese do 17 β -Estradiol, razão pela qual observamos uma alta concentração deste hormônio na mesma fase em que o 17 β -Estradiol alcança as maiores concentrações.

A concentração de 11ceto-T em fêmeas apresentou-se baixa nas primeiras fases do ciclo reprodutivo com um abrupto aumento da fase de maturação (18,60 $\pm$ 5,69 pg/ml) para madura (71,54 $\pm$ 23,36 pg/ml) representando um incremento de 3,8 x a concentração desse esteróide. A 11ceto-T na fase madura foi maior estatisticamente em relação às demais fases:

repouso ($P=0,017$), maturação ($P=0,012$), regressão ($P=0,008$) e animais imaturos ($P=0,042$).

Nos machos, a testosterona apresentou-se elevada nos dois grupos experimentais, não apresentando diferença estatística entre eles. A testosterona elevada nos machos demonstra a disponibilidade desse substrato para síntese de 11ceto-T, que também não apresentou diferença estatística entre os grupos, porém seus valores absolutos apresentaram-se superiores ao detectado nas fêmeas. É importante destacar que a concentração de testosterona em machos é mais elevada que a de 11ceto-T.

A 17α -OHP em fêmeas apresentou as maiores concentrações nos animais imaturos ($432,50 \pm 59,11$ pg/ml) com os menores valores para os animais adultos no estágio de regressão ($46,68 \pm 15,40$ pg/ml). As concentrações de 17α -OHP nos animais imaturos foram maiores estatisticamente em relação aos animais adultos em repouso ($P<0,001$); maturação ($P=0,003$); maduro ($P<0,001$) e regressão ($P<0,001$). Os animais em maturação também tiveram concentrações maiores quando comparados aos animais em repouso ($P=0,003$); maduro ($P<0,001$) e regressão ($P<0,001$). Foi observada também uma diminuição significativa da concentração deste progestágeno, do animal em repouso para o animal em regressão ($P=0,047$).

As fêmeas adultas em repouso apresentaram um aumento de 2x na concentração de 17α -OHP ($140,83 \pm 30,70$ pg/ml) para a fase de maturação ($286,00 \pm 11,81$ pg/ml), sendo esta última a fase de maior concentração deste hormônio nos animais adultos. Após a fase de maturação, a 17α -OHP decaiu 4,4x o valor de sua concentração para o estágio maduro ($65,75 \pm 7,36$ pg/ml) e 6,1x para o estágio de regressão ($46,68 \pm 15,40$ pg/ml).

Nos machos, a 17α -OHP não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos 1 e 2.

Além dos esteróides plasmáticos, foi analisada a presença dos esteróides na composição do secreção cefálica. Durante as coletas, um líquido transparente e viscoso foi observado saindo de glândulas localizadas na região cefálica do animal e a presença deste líquido não ocorre somente durante a

reprodução do animal, ocorrendo tanto nos machos quanto em fêmeas, quanto nos animais imaturos. Por não haver nenhum dado sobre a função e composição desse líquido, na literatura pertinente e pela sua fácil obtenção, esse parâmetro foi adicionado ao presente trabalho. Os resultados demonstram a presença dos hormônios 17β -Estradiol, Testosterona e 17α -OHP na secreção cefálica tanto em machos quanto em fêmeas, até mesmo nos animais imaturos (tabela 26). Análises de 11ceto-T não foram realizadas para a secreção cefálica.

Nas fêmeas adultas, os maiores valores absolutos observados em todos os hormônios foram nos animais em maturação, mas somente o 17β -Estradiol demonstrou diferença estatística, com as maiores concentrações no estágio de maturação em relação à regressão ($P<0,05$). Os animais imaturos também apresentaram altas concentrações de 17β -Estradiol, sendo maior estatisticamente novamente em relação às fêmeas em regressão ($P<0,05$) (Tab.). Nos machos, o 17β -Estradiol da secreção cefálica não apresentou diferença estatística entre g1 e g2. A testosterona e 17α -OHP, ambos não apresentaram diferença estatística em machos e fêmeas entre os grupos experimentais.

Os esteróides gonadais plasmáticos e da secreção cefálica foram também comparados em cada estágio do ciclo reprodutivo. A concentração de 17β -Estradiol plasmático foi maior em relação à secreção cefálica nos estádios maduro ($P=0,002$) e regressão ($P<0,05$) das fêmeas, enquanto que nos machos do grupo 2, a concentração de 17β -Estradiol da secreção cefálica excedeu aquela encontrada no plasma.

As concentrações de testosterona plasmática também foram maiores em relação à secreção cefálica nos estádios de maturação ($P<0,05$) e maduro ($P=0,006$). Já as concentrações de 17α -OHP da secreção cefálica no estágio de regressão se apresentou maior do que a 17α -OHP plasmática ($P<0,001$).

4.9. Razão 11ceto-T e 17 β -Estradiol

Segundo Chu-Koo *et. al.* (2009), a razão entre 11ceto-T e 17 β -Estradiol é um indicador eficiente não invasivo para identificação do sexo em *Arapaima gigas*, uma vez que não há características sexuais externas viáveis suficientes para uma correta determinação do sexo nesses animais. Esses autores traçaram uma razão entre os esteróides sexuais 11ceto-T e 17 β -Estradiol nos animais amostrados por eles, nos quais o sexo era previamente conhecido através de observações direta das gônadas, com um acerto de 95% dos animais adultos corretamente sexados. Para os animais imaturos, o acerto foi de 100%. Esses autores encontraram um valor limite de 2,5 entre a razão 11ceto-T e 17 β -Estradiol, onde os animais que se encontram abaixo desse valor indicam são do sexo feminino e acima desta margem, masculino. Este padrão pode ser utilizado para inferir o sexo de animais adultos e imaturos.

Devido à importância de uma correta sexagem discutido por Chu-Koo *et. al.* (2009), resolveu-se analisar aqui a razão entre esses dois hormônios, uma vez que os animais do presente estudo também se encontram sexados através de observações direta das gônadas e pela disponibilidade dos resultados obtidos desses dois hormônios.

Foram amostrados 44 animais adultos, com um total de 39 animais corretamente sexados utilizando a razão 11ceto-T e 17 β -Estradiol proposta por Chu-Koo *et. al.* (2009), obtendo uma porcentagem de acerto de 88,63% (figura 9 a e b). Dos cinco animais que não entraram dentro dessa razão, quatro eram do sexo masculino que obtiveram valores inferiores a 2,5 e apenas um do sexo feminino com valor de 3,5.

Os três animais imaturos analisados eram do sexo feminino, e os valores obtidos se encontravam dentro da razão esperada, obtendo um acerto de 100%.

5. DISCUSSÃO

5.1. Características Reprodutivas e Fatores Ambientais

As gônadas de *Arapaima gigas* apresentam um padrão anatômico diferente da maioria dos teleósteos, apresentando uma única gônada funcional localizada no lado esquerdo da cavidade celomática. Segundo Coward *et. al.* (2002), embora as gônadas de teleósteos se desenvolvam em estruturas pares, algumas espécies possuem uma única gônada, sendo resultado de uma fusão durante as fases de desenvolvimento ou uma falha no desenvolvimento total da gônada. No caso de *Arapaima gigas*, a única gônada funcional é resultante da fusão durante o desenvolvimento gonadal. As características sobre a morfologia gonadal encontradas no presente trabalho corroboram com os trabalhos de Godinho *et. al.* (2005) e Chu-Koo *et. al.* (2009), que descrevem essas mesmas observações realizadas para animais adultos de *Arapaima gigas*.

Em observações diretas sobre a morfologia ovariana realizada em campo, para indivíduos adultos, constatou-se também que o ovário de *Arapaima gigas* não possui nenhuma cápsula ovariana de revestimento, e as lamelas ovígeras contendo os oócitos se encontram dispostas paralelamente. Além disso, o ovário de *A. gigas* ocupa uma grande porção da cavidade celomática quando este atinge seu desenvolvimento pleno, ou seja, no estágio maduro do ciclo reprodutivo. A ausência da cápsula ovariana também foi constatada por Godinho *et. al.* (2005), sugerindo que a ovulação ocorra dentro da cavidade celomática, assim como na maioria dos teleósteos primitivos.

Segundo van den Hurke and Peute (1979), duas formas de estrutura ovariana têm sido reconhecidas: 1) cisto-ovariana, na qual o lúmen ovariano tem continuidade com o oviduto; 2) gymno-ovariana, na qual o ovário é coberto parcialmente pelo peritônio e libera os oócitos maduros diretamente na cavidade corporal. Os oócitos são subsequenteiramente liberados para o meio externo pelo oviduto, uma posterior continuação do peritônio se abrindo dentro de um sinus urogenital.

De acordo com o conceito morfológico ovariano descrito em literatura, o ovário de *Arapaima gigas* possui o tipo estrutural gymno-ovariano, pois seu ovário apresenta lamelas ovígeras expostas diretamente para a cavidade celomática, sendo que essas observações também foram constatadas por Lima *et. al.* (1997), num estudo preliminar sobre anatofisiologia das gônadas de pirarucu.

Quando os ovários de *A. gigas* foram analisados histologicamente, verificou-se a presença de todos os estádios de desenvolvimento do oócito nos ovários maduros, mas com prevalência de oócitos vitelogênicos, indicando que o pirarucu exibe um desenvolvimento oocitário assincrônico.

Segundo Wallace & Sellman (1981), o mecanismo de desenvolvimento oocitário assincrônico ocorre quando, dentro dos ovários, não se evidenciam lotes de oócitos no mesmo estágio de maturação, estando presentes oócitos em todas as fases de desenvolvimento, ocorrendo sua eliminação à medida que vão atingindo a maturação completa.

Fontenele (1948), estudando a biologia básica do pirarucu, constatou ser o pirarucu um animal de desova parcelada com tipo de desenvolvimento oocitário assincrônico. No trabalho de Núñez & Duponchelle (2008), sobre escala de maturação para peixes ovíparos teleósteos neotropicais, esses autores citam também o pirarucu como peixe de desova múltipla.

Conjugando-se os dados macroscópicos e microscópicos obtidos do ovário dos animais ao longo de um ano, observou-se uma periodicidade em seu processo reprodutivo, com reproduções ocorrendo basicamente no período de cheia e em um ambiente lântico propício para sua reprodução. Segundo Hoar (1969), o pirarucu é uma espécie lântica, não realiza migração reprodutiva e os animais fazem seus ninhos em locais com pouca movimentação de água. Além disso, os ovos são geralmente maiores e em menor número do que nas espécies reofílicas, característica essa de animais de desova parcelada.

Segundo Flores (1980), o pirarucu desova todo o ano, mas com maior intensidade de setembro a dezembro nos rios Samiria e Pacaya, na Amazônia

Peruana. Ainda no Peru, no rio Ucayali e seus tributários, o período reprodutivo alcança o pico em novembro, se estendendo até julho.

No Brasil, na região da Amazônia, segundo Menezes (1951), o período reprodutivo do pirarucu inicia-se em dezembro estendendo-se até maio e segundo Fontenele & Vasconcelos (1982) de dezembro a maio. Pelas observações realizadas na Ilha Mexiana, o período reprodutivo do pirarucu ocorre entre dezembro a março neste local. Essas variabilidades podem ser explicadas pela combinação da diferença ambiental e antrópica das diferentes regiões, já que a Ilha Mexiana é uma região com baixa atividade antrópica.

Com relação à morfologia testicular de *Arapaima gigas*, diferentemente do ovário, o testículo de *Arapaima gigas* é pequeno, sendo fino e alongado, e seu tamanho não chega a ser representativo dentro da cavidade celomática, mesmo quando este alcança seu desenvolvimento pleno. O testículo também apresenta um único lobo, localizado no lado esquerdo da cavidade celomática e em todos os animais estudados, foi constatada uma grande quantidade de tecido adiposo envolvendo o órgão, sendo que essa característica também foi constatada por Chu-Koo *et. al.* (2009). A presença de tecido adiposo envolvendo todo o testículo sugere a necessidade de um rápido aporte energético durante o desenvolvimento testicular, principalmente nas fases de maior produção de espermatozóides.

Durante o acompanhamento reprodutivo anual realizado com o pirarucu, foi observado que, tanto as fêmeas quanto os machos não apresentaram características sexuais secundárias ao longo do ciclo reprodutivo, com exceção de alguns machos capturados em janeiro de 2008, que apresentavam uma coloração avermelhada da escama bastante acentuada na região da nadadeira caudal se estendendo ventralmente até a região do opérculo. Em todas as coletas, todos os animais capturados na Ilha Mexiana, tanto machos quanto fêmeas, apresentaram coloração vermelha bem forte na escama quando comparados com animais de outras regiões, tais como os pirarucus da Amazônia Peruana (Venturieri, com. pessoal). Talvez essa diferença ocorra devido às diferenças ambientais e geográficas presente em cada região. Por se

encontrarem em regiões geográficas diferentes, e conseqüentemente com diferentes organismos presentes na região que fazem parte de sua dieta, a alteração da alimentação desses animais pode ser um fator diferencial que também esteja influenciando na coloração desses animais.

Para os animais da Ilha, a intensificação da coloração dos machos no período reprodutivo foi observada, mas para muitos animais não foi um bom indicativo do sexo, pois machos e fêmeas possuem uma forte coloração, mesmo fora do período reprodutivo. Quando estes animais entram no período reprodutivo, essa mudança de coloração ocorre de tal maneira que a distinção entre machos e fêmeas não é possível. Sendo assim, para o presente trabalho, essa característica não pôde ser utilizada para identificação do sexo desses animais.

Monteiro (2005) constatou mudança na coloração da escama de *Arapaima gigas* de cativeiro, onde os machos apresentavam uma mancha alaranjada na parte inferior da cabeça, diferindo das fêmeas. Chu-Koo *et. al.* (2009), também encontraram essa diferença de coloração nos animais maduros, com uma coloração nos machos que varia do vermelho para o alaranjado e que vai da região caudal até o opérculo. Para esses autores, essa característica foi utilizada na discriminação de machos e fêmeas, sendo relevante principalmente no trabalho realizado por Monteiro (2005), para seleção dos casais em piscicultura comercial.

5.2. Estádios do Ciclo Reprodutivo

Como dito anteriormente, as análises histológicas detectaram a presença de todos os estádios de desenvolvimento oocitário nos ovários maduros, indicando que o pirarucu exibe um desenvolvimento oocitário assincrônico. Como característica de peixes de desova parcelada, os oócitos liberados em cada lote são maiores em diâmetro e menores em número do que aqueles que exibem um tipo de desova total. No trabalho de Godinho *et. al.* (2005), o diâmetro dos oócitos cromatina nucleolar, perinucleolar, cortical alveolar e

vitelogênico resultaram em uma média de 77, 145, 427 e 1270 μm respectivamente.

Os ovários imaturos de *A. gigas* apresentaram-se macroscopicamente sem nenhuma distinção com os ovários em repouso, tanto em tamanho quanto em coloração. Histologicamente, os ovários imaturos apresentaram oócitos cromatina nucleolar e perinucleolares. Já na fase de repouso, além dos tipos oocitários presente nos ovários imaturos, ocorre a predominância de oócitos perinucleolares nos estágios mais avançados. Quando as fêmeas atingem a fase de maturação existe um predomínio de oócitos cortical alveolar e vitelogênicos iniciais, permanecendo os últimos em maior proporção na fase madura, juntamente com os vitelogênicos.

A vitelogênese é o principal evento responsável pelo crescimento dos oócitos, em que o vitelo pode corresponder até 95% do tamanho dos mesmos. O oócito vitelogênico resulta de dois processos de acumulação: um endógeno, e outro exógeno. A vitelogênese endógena inicia-se no oócito cortical alveolar, sendo caracterizada pela deposição de vitelo lipídico, composto principalmente por triglicerídeos. A vitelogênese exógena é resultado da incorporação de proteínas sintetizadas pelo fígado, transportadas ao ovário e capturadas pelo oócito. Esta é dependente da ação de gonadotropinas e esteróides (Nagahama, 1983).

Nos ovários maduros, um outro aspecto encontrado foi a presença de oócitos com núcleo, ou vesícula germinal deslocado para a periferia. A migração da vesícula germinal para a periferia do oócito é indicadora de um estágio de pré-desova (Guraya, 1986). Os oócitos cortical alveolares observados em *A. gigas* apresentavam, em alguns casos, o núcleo deslocado do centro, sugerindo uma migração precoce.

O tempo de migração da vesícula germinal em direção à periferia do oócito varia entre as espécies. Em algumas espécies de salmonídeos, a vesícula germinal migra do centro do oócito antes de completar a vitelogênese, pois necessita de um longo período para realizar a migração completa (Sakun,

1966). Um caso extremo ocorre em *Lebistes reticulatus*, na qual a migração da vesícula germinal ocorre antes da fase de crescimento do oócito (Raven, 1961).

Um outro estágio encontrado em *A. gigas* foi a fase de regressão. O estágio de regressão é comum de se encontrar em animais de cativeiro, pois os mesmos não conseguem desovar naturalmente, sofrendo um processo de reabsorção do vitelo que foi direcionado aos ovários.

Segundo Baldisserotto (2002), caso o oócito não seja liberado na desova, ele degenera sendo fagocitado pelas células da granulosa. O número de oócitos que sofrem atresia pode aumentar se a fêmea não for colocada em condições ótimas para a reprodução. Em condições naturais, a atresia é muito reduzida, e sua ocorrência pode estar relacionada ao estresse da fêmea. Neste contexto, são conhecidos vários trabalhos que caracterizam o desenvolvimento oocitário e as camadas foliculares que envolvem o oócito (revisões em Tyler & Sumpter, 1996; Rocha & Rocha, 2006). No entanto, estudos sobre a atresia (processo de reabsorção e/ou regeneração do oócito) e a caracterização da involução e/ou degeneração dos folículos pós-ovulatórios são ainda bem restrito para as espécies nacionais (Santos *et al.*, 2006). O processo de atresia foi averiguado em *A. gigas* em seu ambiente natural na coleta referente ao mês de junho/2007, período este em que as chuvas diminuem. Provavelmente esses animais apresentaram problemas na desova por se encontraram no final do período reprodutivo, não desovando assim o último lote recrutado.

Considerando-se as análises histomorfológicas dos testículos, sabe-se que a maioria dos teleósteos apresenta uma espermatogênese do tipo cística (lobular), o que permite classificar os estádios de maturação dos testículos com bastante eficácia (Grier, 1993). No entanto, o epitélio seminífero do testículo de *A. gigas* apresentou características distintas quando comparados com a maioria dos teleósteos.

A estrutura testicular é classificada de acordo com a forma e organização do compartimento germinativo, sendo possível identificar dois tipos de organização testicular nos vertebrados. Essa organização é realizada com base nas variações morfológicas que ocorrem no compartimento germinativo durante

o ciclo reprodutivo. O primeiro tipo ocorre nos anamniotas (agnatas, condricties, osteicties e anfíbios) e o segundo tipo nos amniotas (répteis, aves e mamíferos) (Grier, 1993).

Nos anamniotas a espermatogênese ocorre no interior de estruturas conhecidas como espermatocisto, ou simplesmente chamado de cistos. As diferenças observadas em anamniotas são: em agnatas e condricties, o cisto é uma estrutura esférica formada pela membrana basal que envolve uma população de células de Sertoli e de células germinativas. A diferença entre os dois grupos é que em agnatas, quando os cistos se abrem, os espermatozóides são liberados na cavidade corpórea, pois neste grupo o sistema de ductos testiculares está ausente, já em condricties cada espermatocisto está conectado a um sistema de ductos e, portanto não são liberados na cavidade corpórea como em agnatas. Em relação aos osteicties e anfíbios, o epitélio germinativo está localizado dentro de estruturas alongadas, conhecidas como lóbulos ou túbulos, nas quais os cistos estão em contato com a membrana basal (que delimita uma estrutura tubular ou lobular), diferentemente dos agnatas e condricties, nos quais os cistos são estruturas esféricas, ou seja, os espermatocistos de agnatas e condricties estão completamente envolvidos pela membrana basal (Grier, 1993).

Nos amniotas, o compartimento germinativo é formado por túbulo, que não terminam na periferia testicular e, cujas extremidades estão conectadas a um sistema de ductos (*rete testis*). Nestes túbulos, uma população residente de células de Sertoli está conectada a uma população de células germinativas em diferentes fases de desenvolvimento (Grier, 1993).

Conforme o que foi exposto em literatura juntamente com o que foi observado histologicamente no testículo de *A. gigas*, verificou-se que este segue o padrão de testículo tubular descrito por Grier (1993) como em ocorre nos amniotas, sugerindo que o pirarucu possua uma espermatogênese parecida com a dos amniotas pois apresenta-se de forma não cística.

5.3. Índice Gonadosomático

Os ovários de *Arapaima gigas* foram avaliados desde os aspectos macroscópicos realizados diretamente em campo, até histologicamente, para assegurar uma correta classificação de maturidade reprodutiva, pois, segundo Vazzoler (1996), as características morfológicas das gônadas que permitem uma avaliação da época e local de desova, tais como tamanho, forma e coloração, são aspectos subjetivos e facilmente alteráveis, podendo resultar em erro de classificação da escala de maturidade.

Devido à subjetividade dos dados na avaliação macroscópica das gônadas, como citado acima, foi calculado também o índice gonadosomático (IGS), pois a variação temporal do IGS fornece indicações seguras sobre o período reprodutivo de uma espécie ou população. Assim as análises microscópicas gonadais realizadas no presente trabalho juntamente com o cálculo do IGS nos fornecem um diagnóstico correto da atividade reprodutiva de *Arapaima gigas*.

Apesar de demonstrar variação do IGS nas várias fases reprodutivas de *A. gigas*, esses valores diferiram quando comparados com animais de desova total. Em *Salminus hilarii* e *Colossoma macropomum*, dois peixes de água doce de cativeiro com desova total, a porcentagem do IGS no estágio maduro do ciclo reprodutivo alcançou um valor de 9,96 e 12,3% respectivamente (Honji *et al.*, 2009, Venturieri, 1997). O pirarucu apresentou neste mesmo estágio reprodutivo um IGS de 1,22%, ou seja, no momento que precede a eliminação de um lote de oócitos maduros, os ovários representam 1,22% do peso total da fêmea, um valor bem inferior quando verifica-se o IGS dos animais de desova total. Essa diferença ocorre principalmente pelo pirarucu ser um animal de massa corpórea muito elevada, apresentar somente uma gônada desenvolvida e também por exibir uma estratégia reprodutiva diferente. As espécies que apresentam desova total eliminam apenas um lote de oócitos maduros em um intervalo de tempo relativamente curto, sendo que o lote seguinte só irá maturar no período reprodutivo seguinte (Vazzoler, 1996). Nesses animais, o peso da

gônada pode atingir 40% do peso corporal (Baldisserotto, 2002). Já nos animais de desova parcelada, como é o caso do *A. gigas*, não se evidenciam nos ovários lotes, estando presente oócitos em todas as fases de desenvolvimento, ocorrendo sua eliminação à medida que vão atingindo a maturação completa. Desta forma, o tamanho dos ovários de peixes de desova parcelada é menor. Essas relações de baixo IGS em animais de desova parcelada são encontradas também em estudos realizados com *Iheringichthys labrosus*, um bagre de desova parcelada, no qual o ovário no estágio de repouso atingiu uma média de 0,62% de IGS e uma média de 4,55% para o ovário maduro (Santos *et al.*, 2006).

Estudos com o tucunaré (*Cichla ocellaris*) da Lagoa Piató no Rio Grande do Norte, mostraram o maior valor de IGS de 0,57% nos meses de maio a julho de 2005, época associada à estação chuvosa da região, e o menor valor de 0,08% nos meses de novembro a janeiro (Medeiros *et al.*, 2006). O tucunaré, assim como o pirarucu, é um peixe de desova parcelada que habita as águas do Rio Amazonas e apresenta período reprodutivo durante a estação chuvosa. Para o tucunaré, os valores de IGS mostraram-se abaixo ao encontrado em *A. gigas*. Esses números de IGS são característicos de peixes de desova parcelada e de baixa fecundidade.

Os valores de IGS em fêmeas de *A. gigas* também foram vistos por Godinho *et al.*, (2005), que se demonstraram inferiores aos animais aqui estudados, com valores de IGS de 0,65% para os animais na fase de maturação avançada. Essa diferença entre os valores obtidos por Godinho *et al.*, (2005) pode ter ocorrido em função do reduzido número amostral (5 indivíduos) destes autores. Entretanto, Chu-Koo *et al.* (2009), encontraram valores bastante diferentes ao encontrado no presente trabalho de IGS, com valores de 0,77% para as fêmeas imaturas e 8,41% para as fêmeas maduras.

Conforme relatos do IIAP (*Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana*) (2002), o ovário de um pirarucu, no momento da reprodução, atinge aproximadamente 1,5% da sua massa corpórea. Esse valor se mostrou bem

próximo ao obtido para as fêmeas maduras estudadas no presente trabalho (1,228%).

Nesse mesmo trabalho realizado por Godinho *et al.* (2005), com pirarucu de ambiente natural, os machos também apresentaram valores inferiores de IGS, variando de 0,012% para os animais juvenis e em repouso e 0,011% para os animais em maturação. No presente estudo, os animais do grupo 1 apresentaram IGS de 0,013% e os animais do grupo 2 um IGS de 0,017%. Novamente os valores obtidos de IGS para os animais da Ilha Mexiana foram ligeiramente maiores quando comparado com o trabalho de Godinho *et al.* (2005).

Os resultados de IGS aqui apresentados demonstram claramente que o IGS não é um dado confiável para a definição do estágio e período de maturação de machos de *A. gigas* e, no caso das fêmeas, estes dados somente podem ser confiáveis, desde que analisados ao longo de todo ciclo reprodutivo, pois os dados da literatura, associados aos do presente trabalho, evidenciam grande variabilidade nos valores absolutos deste índice.

5.4. Análises Metabólicas

O sucesso no desempenho reprodutivo em peixes está intimamente associado com as reservas de lipídios disponíveis para o desenvolvimento gonadal (Adams, 1999). Ao contrário dos mamíferos, os peixes podem sobreviver por longos períodos sem alimento (meses e até anos) e durante este período, os peixes sobrevivem com o uso da energia armazenada como os lipídios, proteínas e carboidratos. A forma na qual os animais priorizam a metabolização destes substratos varia com a espécie (Takama *et al.*, 1985).

De uma forma geral os peixes podem apresentar diferentes padrões de mobilização de lipídios durante o ciclo reprodutivo e esta variação ocorre devido principalmente às estratégias reprodutivas, disponibilidade e qualidade do

alimento na fase de vitelogênese, habitat, idade do animal e outros parâmetros (Love, 1980).

Em *A. gigas*, análises de lipídios totais foram realizadas em diversos tecidos ao longo do ciclo reprodutivo para caracterização e entendimento da mobilização desse substrato, pois segundo Love (1980), o processo de maturação gonadal envolve a transferência de lipídios armazenados no tecido adiposo, musculatura e/ou fígado para as gônadas.

Segundo Sheridan (1994), a musculatura em peixes possui uma apreciável quantidade de lipídios. O músculo branco, assim como nos mamíferos, contém células adiposas distribuídas ao longo das fibras e o músculo vermelho, contém substancialmente mais lipídios do que o músculo branco. Em fêmeas de *A. gigas* foi possível verificar que a *ventrecha* foi a principal musculatura armazenadora de lipídios, seguida do músculo vermelho. Ambos os tecidos apresentaram as maiores concentrações na fase madura do ciclo reprodutivo, sugerindo que estes sejam os principais locais de armazenamento de lipídios a serem mobilizados na fase vitelogênica.

Segundo Hochachka & Somero (2002), os peixes de piracema realizam movimentos migratórios longos, chegando ao caso extremo do salmão do Pacífico que migra cerca de 1000km, em estado hipofágico, funcionando como um sistema fechado, auto-sustentável, mobilizando as reservas armazenadas na fase anterior à migração.

O pirarucu, diferentemente dos peixes de piracema, não realiza migração reprodutiva, portanto os animais não param de se alimentar quando entram no período reprodutivo, justificando assim as altas concentrações lipídicas encontradas no estágio maduro do ciclo reprodutivo para o músculo vermelho e principalmente para a *ventrecha*. Além disso, quando atinge o momento da desova, os animais realizam o comportamento de corte. Para realizar a corte, ambos machos e fêmeas se movimentam incessantemente durante horas, movimento que necessita de um grande aporte energético para a musculatura (Venturieri, com. pessoal).

O músculo branco foi o tecido de menor concentração lipídica e não apresentou diferença no armazenamento deste substrato entre os estádios de maturação, ou seja, o teor de lipídios totais na musculatura branca não se altera significativamente ao longo do ciclo reprodutivo. A comercialização da carne do pirarucu (musculatura branca e *ventrecha*) é comum na região norte do Brasil, sendo a musculatura branca (lombo) considerada uma carne nobre por ser menos gordurosa em relação à *ventrecha*, o que fica comprovado com as análises do presente trabalho.

Em *Salminus hilarii*, um peixe reofílico de desova total, mantidos em cativeiro, os lipídios armazenados na musculatura branca não sofreram variações relacionadas ao ciclo reprodutivo, porém, no ambiente natural, *Salminus hilarii* demonstrou uma queda na deposição de lipídios com o avanço do ciclo reprodutivo (Camargo, 2007). Como os animais de cativeiro recebem uma dieta balanceada, e por serem sedentários, não ocorreu um déficit lipídico no músculo desse animal, porém quando em ambiente natural, por realizar migrações reprodutivas e não se alimentar, essa espécie provavelmente recruta lipídios armazenados da musculatura branca para a reprodução.

O padrão lipídico do músculo branco encontrado em fêmeas de *A. gigas* mostrou-se diferente em relação à *Salminus hilarii*, mas igual ao *Geophagus brasiliensis*, um cará de desova parcelada, de ambiente natural, que também não apresentou variações lipídicas na musculatura ao longo do ciclo reprodutivo (Gomes, 2007).

Com relação às proteínas totais dos diferentes tipos musculares em fêmeas, as maiores concentrações foram observadas na *ventrecha* seguida do músculo branco no animal imaturo, demonstrando que os animais jovens armazenam mais proteínas nesses tecidos em relação aos adultos que necessitam de uma disponibilidade maior desse substrato para a reprodução. Em peixes, ao contrário de mamíferos, a proteína é o primeiro substrato energético a ser utilizado, seguido dos lipídios e carboidratos (Sheridan, 1999).

As concentrações de proteínas no músculo branco e vermelho mostraram-se elevadas em relação aos lipídios armazenados nesses mesmos

tecidos, demonstrando que a musculatura é o principal armazenador de proteínas. Segundo Ogawa (1999), a composição protéica da carne de peixe pode variar em função da espécie, do tamanho, do sexo e da época do ano; porém, geralmente, o músculo contém cerca de 20% de proteína.

Os lipídios gonadais em fêmeas de *A. gigas* apresentaram as maiores concentrações no estágio maduro do ciclo reprodutivo decaindo no estágio de regressão. Esses resultados demonstram claramente que no estágio maduro há uma maior deposição lipídica nos ovários para formação do ovo, principalmente na forma de vitelogenina, uma fosfoglicolipoproteína necessária para o desenvolvimento da larva (Finn, 2007). Já a concentração lipídica decai na fase conseguinte de regressão por representar um estágio onde não houve desova, e conseqüentemente a vitelogenina começa a ser reabsorvida do ovário.

As proteínas totais encontradas nos ovários de fêmeas de *A. gigas* não apresentaram diferença durante o ciclo reprodutivo, mas as concentrações desse substrato foram menores que as concentrações lipídicas apenas na fase madura, contrariando o que é citado em literatura, que diz que as fêmeas acumulam mais proteínas do que lipídios no ovário com o avanço da maturação (Love, 1980). O pirarucu é uma espécie com poucas informações na literatura, principalmente no que diz respeito aos substratos energéticos relacionados com a reprodução. Talvez esse animal precise de um acúmulo maior de lipídio para formação do ovo em função da necessidade da larva, pois os ácidos graxos presentes nesses lipídios terão grande importância na formação dos tecidos da futura larva. Essa colocação é comprovada pelo aumento de ácidos graxos PUFA n3 nos ovários maduros, que será discutida em breve.

Com relação às concentrações lipídicas hepáticas em fêmeas de *A. gigas*, os maiores valores encontrados foram no estágio de regressão seguido do estágio maduro do ciclo reprodutivo. O fígado, durante a reprodução, é responsável pela produção de vitelogenina, sendo esta produzida pelos hepatócitos sob a ação do 17β -Estradiol. A vitelogenina sintetizada é rapidamente exportada para as gônadas, que é incorporada pelos oócitos por micropinocitose (Vilecco *et al.* 1999).

As altas concentrações lipídicas hepáticas no estágio maduro sugerem uma diminuição da síntese de vitelogenina, pois nos estádios anteriores, provavelmente o lipídio hepático armazenado e/ou recrutado de outros tecidos, estava sendo utilizado para a formação dessa molécula demonstrando assim baixas concentrações lipídicas no fígado nos estádios iniciais do ciclo reprodutivo. As altas concentrações de lipídios no estágio de regressão demonstram que esteja ocorrendo uma reabsorção do vitelo dos oócitos, sendo que estes são direcionados ao fígado para síntese *de novo* dos lipídios e posterior utilização ou armazenamento pelo próprio fígado ou mobilização para outros tecidos de armazenamento. Em *Salminus brasiliensis*, não foi observado esse padrão nos valores de lipídio hepático em fêmeas de ambiente natural. No “dourado” houve uma queda do lipídio hepático com o avanço da maturação sendo esta diferença significativa apenas nas fêmeas maduras em relação às fêmeas em repouso (Moreira *et al.* 2002).

Quanto à concentração protéica hepática em fêmeas, esta não se alterou durante o ciclo reprodutivo, já que o fígado não desempenha função de armazenar proteínas, e toda a proteína que chega a este órgão é rapidamente exportada (Sheridan, 1999).

Nos peixes, a gordura mesentérica (tecido adiposo) é o local primário de armazenamento de lipídio e o fígado e músculos são tecidos de armazenamento secundário. A mobilização desse substrato é realizada preferencialmente dos tecidos secundários, pois há uma tendência em preservar os estoques de gordura mesentérica (tecido adiposo). A base para esta informação está relacionada com o número de receptores presente nos adipócitos. Já no fígado e no músculo, os estoques de lipídios estão relacionados com o padrão de história de vida. Braekken (1959) sugere que o armazenamento lipídico no fígado está mais relacionado em peixes sedentários enquanto que as espécies mais ativas armazenam lipídios no músculo. Porém, tais correlações são difíceis de sustentar, pois certamente um grande número de fatores influencia na dinâmica do metabolismo de lipídios em peixes (revisão em Sheridan, 1994).

Em *A. gigas*, a concentração de lipídios foi maior na *ventrecha* do que no fígado nos diferentes estádios do ciclo reprodutivo, demonstrando que os lipídios são preferencialmente armazenados nessa musculatura, mesmo o pirarucu não sendo um peixe de natação rápida. Porém, quando analisada a musculatura branca e vermelha, as concentrações lipídicas se assemelham com as concentrações hepáticas. Como sugerido na literatura, as relações preferenciais de armazenamento lipídico nos tecidos é diferente para cada espécie e vários fatores podem influenciar nessa dinâmica.

Segundo Henderson & Tocher (1987), as concentrações de lipídio hepático em perca são maiores do que aqueles encontrados na musculatura branca. Para a perca, o fígado foi o órgão principal de armazenamento de lipídios. Por outro lado, em *Pleuronectes platessa*, o fígado apresenta uma contribuição insignificante de reserva energética, sendo que o principal órgão de reserva de energia nesse peixe é a musculatura (Dawson & Grimm, 1980). A explanação para essas diferenças com relação ao acúmulo lipídico nos diferentes tecidos já foi citada anteriormente por Sheridan (1994), considerando que a capacidade de armazenamento de lipídios varia com a espécie, hábito de vida e o estágio de desenvolvimento.

Nos machos de *A. gigas*, dentre as musculaturas, a maior concentração lipídica encontrada foi também na *ventrecha* quando comparada ao músculo branco e vermelho independente do grupo experimental. Porém, ao contrário do que foi observado para os lipídios, as concentrações de proteínas totais foram maiores no músculo branco e vermelho independente também do grupo experimental, confirmando novamente o que foi verificado para as fêmeas, ou seja, que a *ventrecha* é o principal músculo armazenador de lipídios e o músculo branco e vermelho os principais tecidos de armazenamento de proteínas.

Durante a maturação sexual, as fêmeas incorporam vitelogenina nos oócitos, sendo esta glicolipoproteína composta por 20% de lipídios e 80% de proteínas, sendo assim esperado que as fêmeas apresentem valores mais altos

destes substratos nas gônadas do que os machos neste período (Evans & Claiborne, 2006).

O testículo de *A. gigas* não sofreu alteração lipídica e protéica entre os grupos experimentais, e quando comparado com as fêmeas, estas apresentaram concentrações maiores absolutas desses substratos no estágio maduro do ciclo reprodutivo em relação aos machos dos grupos 1 e 2, corroborando com o que é citado em literatura, de serem esperadas maiores concentrações de ambos os substratos em fêmeas em decorrência da intensa deposição de vitelogenina nos oócitos nesse período.

Com relação aos lipídios plasmáticos em fêmeas de *A. gigas*, a menor concentração observada foi na fase madura do ciclo reprodutivo, sugerindo que todo o lipídio circulante na fase anterior foi absorvido ou pelo ovário ou até mesmo por um órgão de armazenamento, como o fígado e/ou músculo, pois todos eles demonstraram um aumento da concentração lipídica da fase de maturação para madura.

Assim como os lipídios plasmáticos, foram analisadas também as concentrações de colesterol plasmático nas fêmeas durante o ciclo reprodutivo, porém esse substrato não apresentou diferença entre os estádios reprodutivos, assim como nos machos, onde este também não apresentou diferença estatística entre os grupos 1 e 2. O colesterol é a molécula precursora da síntese de todos os hormônios esteróides (Norris, 1997), sendo seu papel muito importante no ciclo reprodutivo de peixes. Cerca de 70% do total de colesterol é produzido pelo próprio organismo e o restante é originário da dieta, principalmente de origem animal (Cormillot, 2002). No ambiente natural, como o aporte de colesterol certamente não é limitado, não é necessário o intenso recrutamento plasmático na fase reprodutiva.

5.5. Perfil de Ácidos Graxos

Os lipídios são requerimentos utilizados pelos peixes como fonte disponível de energia, como componentes estruturais de biomembranas,

carreadoras de vitaminas lipossolúveis, precursor de eicosanóides, hormônios e vitamina D e como enzimas e co-fatores (Higgs & Dong, 2000).

Lipídios polares em peixes, principalmente fosfolipídios, atuam basicamente como componente estrutural, responsável pela manutenção da fluidez das membranas, enquanto lipídios neutros (triacilgliceróis) atuam como fornecedores e armazenadores de energia, sendo usados como combustíveis para a realização de funções fisiológicas básicas, como no metabolismo, atividade migratória e desenvolvimento gonadal (Oliveira *et al.*, 2003).

Os ácidos graxos polinsaturados mais comuns, encontrados nos tecidos de peixe são: C18:2n6, C20:4n6, C20:5n3 e C22:6n3 (Bell *et al.*, 1986). Esses ácidos graxos foram observados em todos os tecidos analisados, em maior quantidade principalmente nos lipídios polares. Devido à grande importância dos ácidos graxos em inúmeros processos biológicos em peixes, estes foram caracterizados em tecidos diferentes nos animais imaturos e adultos ao longo do ciclo reprodutivo. A separação das frações neutra e polar dos ácidos graxos foi realizada para o fígado e gônadas para identificar, principalmente no período reprodutivo, os principais ácidos graxos mobilizados desses órgãos destinados ao armazenamento, para geração de energia ou posterior recrutamento para outras funções necessárias ao organismo, e também verificar os principais ácidos graxos que são destinados a formar membranas celulares.

No presente estudo, os ácidos graxos monoinsaturados, principalmente o 18:1, foram predominantemente maiores nas frações neutras do fígado e gônadas, seguidos pelas altas porcentagens de ácidos graxos saturados com os maiores valores para o 16:0 e 18:0, enquanto que os PUFA n6 foram os ácidos graxos predominantes nas frações polares.

Em *Labeo rohita*, um peixe de água doce de ambiente natural, os principais ácidos graxos saturados encontrados no fígado foram o 16:0 (ácido palmítico) e 18:0 e em termos de monoinsaturados, o 16:1 e 18:1 foram os mais abundantes (Sharma *et al.*, 2009).

Como dito anteriormente, a porção neutra do tecido refere-se aos ácidos graxos armazenados para energia, compostos principalmente pelos ácidos

graxos saturados e monoinsaturados, sendo estes armazenados principalmente na forma de triglicerídeos. Na porção neutra hepática em fêmeas, os ácidos graxos monoinsaturados apresentaram as maiores porcentagens na fase de regressão em relação aos animais em maturação, isso devido principalmente à alta porcentagem do 18:1 seguido do 16:1.

Durante a regressão, os oócitos não ovulados iniciam o processo de reabsorção do vitelo. As altas porcentagens de ácidos graxos monoinsaturados observadas em *A.gigas* sugerem que o fígado esteja sendo um importante local de armazenamento das moléculas mobilizadas do ovário, na forma de monoinsaturados, sendo que no estágio de maturação, as reservas energéticas armazenadas nos vários locais de deposição, inclusive no fígado, estejam sendo recrutadas para formação do ovo.

No ovo, todas as classes lipídicas (saturados, monoinsaturados e PUFA) podem ser metabolizados para prover energia durante o desenvolvimento do embrião e sabe-se que os ácidos graxos saturados e monoinsaturados são os primariamente utilizados, sendo os monoinsaturados utilizados inclusive ao final do desenvolvimento para o rompimento da casca pelo embrião (Wiegand, 1996).

Todas as espécies de vertebrados, incluindo os peixes, possuem um requerimento de ambos ácidos graxos polinsaturados n-6 e n-3. As formas biologicamente ativas dos ácidos graxos essenciais são geralmente as formas C₂₀ e C₂₂ derivados do ácido linoléico (C18:2n6) e ácido α -linolênico (C18:3n3) (Sargent *et al.*, 2002). Os ácidos linoléico e α -linolênico não podem ser biosintetizados por peixes e por outros vertebrados, sendo considerados essenciais (Cunnane, 2003).

Na fração neutra hepática em fêmeas, os PUFA n3 também apresentaram os maiores valores nos animais imaturos em relação aos animais em regressão. Com relação aos machos, os PUFA n3 também apresentaram as maiores concentrações nos animais que possuíam poucos espermatozóides no lúmen dos cistos do que aqueles que possuíam muitos espermatozóides no lúmen.

Estes resultados sugerem que esses animais, os jovens no caso das fêmeas, armazenam PUFA n3, provavelmente por haver uma grande disponibilidade desses ácidos graxos na dieta e baixa demanda na mobilização para as gônadas.

Henderson *et al.*, (1996), analisaram a composição lipídica hepática de duas espécies de Serrasalmídeos, *Serrasalmus nattereri* e *Mylossoma aureum*, e verificaram que o C18:2n6 foi o principal PUFA observado seguido por menores concentrações de C20:2n6, C20:3n6 e C22:5n6. O C18:2n6 também apresentou-se como o maior PUFA observado em *A. gigas* seguido do 20:4n6 e 22:6n3 na fração neutra hepática. Já na fração polar, o PUFA em maior porcentagem observada foi o 20:4n6 seguido de 22:6n3.

Na fração polar hepática, os PUFA n6 nos animais jovens foram maiores em relação aos adultos no estágio de repouso, maduro e regressão, isso devido às altas porcentagens do 20:4n6. Os animais jovens, de uma forma geral, apresentam maiores porcentagens de PUFA no fígado, o que sugere uma maior habilidade em converter C18:2n6 em HUFAs (ácidos graxos altamente insaturados) do que os animais adultos e/ou uma menor necessidade de mobilização, pois as gônadas ainda não iniciaram o seu desenvolvimento. Além disso, deve-se observar as diferenças entre as dietas dos animais jovens e adultos, pois a dieta natural muda substancialmente durante o seu desenvolvimento. O consumo de um animal jovem é basicamente de pequenos alimentos como insetos e zooplâncton, e os animais adultos tornam-se basicamente piscívoros, perdendo assim esta habilidade (Bell *et al.*, 1993, 1997). Isso pode ser constatado quando verificam-se as altas porcentagens de C20:4n6 nos animais jovens em relação aos adultos.

Oliveira *et al.*, (2005), em um estudo sobre alimentação de juvenis de pirarucu em seu ambiente natural, constatou que a dieta dos juvenis era basicamente de invertebrados com predominância de microcrustáceos. Já Fontenelle (1948), confirma que os adultos de pirarucu são essencialmente carnívoros, mostrando preferência por peixes da família Loricariidae. Esta

mudança de preferência alimentar pode influenciar nas alterações dos ácidos graxos observadas nesse trabalho.

Em *Perca fluviatilis*, um peixe de água doce, foi observado uma diminuição do 20:4n6 no fígado durante o ciclo reprodutivo (Blanchard *et al.*, 2005). Uma diminuição do 20:4n6 ao longo do ciclo reprodutivo também foi observada na fração polar hepática em *A. gigas*, principalmente do estágio de maturação para maduro, com um decréscimo de 8% desse ácido graxo. Essa alta porcentagem foi maior durante o período de vitelogênese exógena e essa diminuição provavelmente está associada com a transferência desse ácido graxo para os ovários.

O ácido araquidônico (C20:4n6) é precursor de uma ampla variedade de componentes ativos biológicos conhecidos coletivamente como eicosanóides onde incluem-se as prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, e é também o principal componente do fosfatidilinositol, que é crítico no processo de sinalização da transdução celular. O ácido araquidônico também está envolvido nas funções reprodutivas e na regulação das respostas imunes em peixes (Sargent *et al.*, 1989). Apesar destas conhecidas alterações do C20:4n6 na literatura, no presente trabalho, não foram observadas alterações neste ácido graxo e nem mesmo outros PUFA n6, nos ovários de *A. gigas*, no entanto, alterações nos PUFA n3 foram detectadas e serão discutidas a seguir.

Ainda na fração polar do fígado, os ácidos graxos saturados também mostraram-se com as maiores porcentagens no animal em regressão em relação aos animais imaturos. De acordo com Ackman & Hean-Howie (1995), os ácidos graxos saturados são dominados por C14:0, C16:0 e C18:0, que podem ser sintetizados por todos os animais. A incorporação destes ácidos graxos nas membranas celulares e no tecido adiposo pode variar de 15 a 35%, no entanto, nos hepatócitos de *A. gigas*, esse valor chegou até cerca de 46% nas fêmeas adultas, no final do ciclo reprodutivo.

A reprodução em peixes, como em outros vertebrados, é afetada por fatores ambientais, nutricionais e sociais. Um estudo feito com truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) demonstrou que a qualidade do ovo e o

desenvolvimento larval são altamente influenciados pela composição de ácidos graxos (Zengin & Akpınar, 2006).

Na fração polar gonadal, os PUFA n3 apresentaram-se com as maiores porcentagens no estágio maduro, sendo maior em relação aos demais estágios do ciclo reprodutivo, inclusive no animal imaturo. O ácido graxo 22:6n3 foi o principal PUFA em fêmeas maduras seguido do 20:5n3. A alta porcentagem de PUFA n3 nas gônadas foi devido à transferência desses ácidos graxos durante a vitelogênese para o futuro desenvolvimento da larva.

Os PUFA n3 possuem um importante papel no sistema neurotransmissor nos animais e na formação dos órgãos sensoriais tais como a retina ou *tapetum lucidum* em olho de peixe, onde o DHA é o mais importante (Nicol *et al.*, 1972). Todas as classes de ácidos graxos (saturados, monoinsaturados, e PUFA) podem ser metabolizadas para prover energia durante o desenvolvimento embrionário. Entretanto, a retenção de HUFAs tem sido constantemente observada em estudos sobre metabolismo de lipídios durante o desenvolvimento do ovo em peixes de água doce (Wiegand, 1996).

A utilização dos lipídios em ovos de peixes de água doce ocorre durante todo o período de embriogênese e a sua utilização varia de acordo com o tipo do ovo. Os lipídios neutros são os primeiros a serem utilizados em *stripped bass* (Chu & Ozkilzicik, 1995) e esturção (Gershanovich, 1991). Já os fosfolipídios são os lipídios predominantes catabolisados em *goldfish* (Wiegand, 1996). No *catfish* africano, os fosfolipídios parecem ser seletivamente retidos ou biossintetizados, sendo os triacilgliceróis catabolisados para energia (Verreth *et.al.*, 1994).

As concentrações de PUFA n3 em *Perca fluviatilis* foram mais abundantes do que PUFA n6 em todos os tecidos analisados, incluindo gônadas, sendo caracterizado principalmente por um alto conteúdo de ácido docosahexanóico (C22:6n3) (Blanchard *et. al.*, 2005).

Ainda no ovário de *A.gigas*, foi verificada uma alta porcentagem de ácidos graxos saturados na fração neutra dos ovários das fêmeas em regressão, que diferiu estatisticamente em relação aos animais imaturos. Os ácidos graxos

16:0 e 18:0, geralmente, são os saturados mais abundantes, como visto até agora, pois o 16:0 é o metabólito chave em peixes. Andrade *et al.* (1995) mostraram que em diversos peixes da fauna brasileira a porcentagem de saturados variou de 50 a 70%. Segundo Honji *et al.* (2009), nos ovários em regressão são encontrados muitos oócitos atrésicos, que são caracterizados por grande desorganização estrutural e degeneração celular, com reabsorção das estruturas que compõem o folículo ovariano. Certamente, estas características morfológicas dos oócitos têm estreitas relações com o aumento da porcentagem de ácidos graxos saturados na fase de regressão, haja vista a intensa atividade energética deste tecido neste momento de reestruturação celular.

Na musculatura branca, assim como ocorre na fração neutra do fígado, os ácidos graxos monoinsaturados apresentaram-se maiores nas fêmeas em regressão em relação aos demais estádios reprodutivos, sugerindo um redirecionamento destes ácidos graxos, dos ovos em processo de atresia, para o tecido muscular.

O tucunaré (*Cichla* sp.), assim como o pirarucu, é um peixe de água doce carnívoro também presente na bacia Amazônica e que possui uma carne de alto valor comercial. Os PUFA's analisados na musculatura de *Cichla* sp. apresentaram baixas porcentagens de EPA (0,9%) e altas porcentagens de DHA (10%) e AA (7%), durante a época de cheia (Inhamuns *et al.*, 2009). Os valores encontrados em tucunaré mostraram-se abaixo das porcentagens encontradas em *A. gigas* para o AA e EPA, mas apresentou porcentagem similar para DHA. De acordo com Henderson e Tocher (1987), a composição de ácidos graxos dos músculos deve ser cuidadosamente interpretada, devido às possibilidades de alongação e desaturação hepática de C18:2n6 e C18:3n3 em seus homólogos biologicamente ativos, C20:4n6, C20:5n3 e C22:6n3.

Segundo Krzynowek (1985), as porcentagens de ácidos graxos presente em algumas espécies de peixes podem variar em aproximadamente 10% de acordo com a estação de captura. Luzia *et al.* (2003) encontraram maiores porcentagens de EPA (1,87%) e DHA (11,3%) na musculatura de *Sardinella* spp.

coletadas no inverno quando comparado com os mesmos animais coletados no verão. Já o curimatã (*Prochilodus* spp.) apresentou as maiores porcentagens desses ácidos graxos (EPA 7,47% e DHA 6,01%) no verão em relação ao inverno.

Os lipídios consumidos pelos peixes podem ser degradados e rearranjados em classes de lipídios apropriados para a necessidade do animal, ou podem ser catabolizados para formação de energia. No lago Finnish, Muje *et al.*, (1989), verificaram a transferência de ácidos graxos na cadeia trófica de invertebrados para peixes e concluíram que peixes imaturos depositaram ácidos graxos de zooplâncton enquanto que peixes adultos foram mais seletivos em acumular os ácidos graxos em função da necessidade do organismo. Peixes imaturos possuem relativamente menos lipídios totais do que peixes adultos indicando que os peixes imaturos estão formando musculatura e requerem basicamente os fosfolipídios para formação de membranas celulares. (Ackman *apud* Arts & Wainman, 1998).

Em fêmeas, as porcentagens de PUFA n3 e n6 nas musculaturas (branca, vermelha e *ventrecha*) não apresentaram diferença estatística significativa entre os animais imaturos e adultos e conforme citado em literatura, os animais jovens necessitam de um maior aporte desses ácidos graxos para suprir o desenvolvimento tecidual muscular. Uma alta porcentagem de PUFA n3 e n6 foi observada nos animais jovens sendo também constatado para os animais adultos dentro do ciclo reprodutivo, pois também necessitam de um aporte desses ácidos graxos que são constituintes de importantes funções metabólicas nesse tecido.

Considerando-se os resultados do perfil de ácidos graxos em machos, foi observado um maior acúmulo de ácidos graxos monoinsaturados na musculatura branca e *ventrecha* dos animais do grupo 2, ou seja, no estágio mais avançado do ciclo reprodutivo. O comportamento dos PUFA n3 seguiu em direção oposta nos mesmos tecidos, com os animais do grupo 1 apresentando maior porcentagem destes ácidos graxos nestes tecidos e ainda na fração neutra hepática. Ainda em machos, foi verificado também um

acúmulo de ácidos graxos saturados na *ventrecha* nos animais do grupo 2. Estes dados mostram que os ácidos graxos com funções mais energéticas e menos estruturais, como é o caso dos saturados e monoinsaturados estão mais elevados nas fases mais avançadas do ciclo reprodutivo. Como esses animais estão bem próximos à espermição, as altas porcentagens nesse grupo desses ácidos graxos sugerem uma necessidade de um rápido aporte energético para a musculatura na construção de ninhos e realização da corte, pois o macho nada incessantemente durante horas atrás da fêmea quando está próximo ao momento da desova. Na construção dos ninhos, os casais escavam cerca de 40 a 50cm de largura e de 15 a 20 cm de profundidade em locais arenosos e após a eclosão dos ovos, os machos guardam os ninhos (Rebaza Alfaro *et. al.*, 2003).

Por outro lado, nas fases mais iniciais do ciclo reprodutivo, os ácidos graxos preferencialmente estruturais como os PUFAs n3 são mais elevados também nestes mesmos tecidos de reserva. Provavelmente o alto gasto energético para o desenvolvimento testicular está ocorrendo com a mobilização desses PUFAs n3, no entanto, a deposição de PUFA n3 não foi constatada nos testículos dos animais do grupo 2 e em nenhum outro tecido sugerindo que, embora sejam polinsaturados importantes que devem ser preservados pelo organismo, por ser um recurso abundante na natureza, está sendo utilizado como fonte de energia por esses animais conforme o ciclo reprodutivo avança.

5.6. Esteróides Gonadais

A reprodução em peixes está sob a regulação hormonal dos esteróides gonadais. A concentração dos esteróides sexuais nas gônadas e no plasma pode ser um indicador muito útil da atividade esteroidogênica em um determinado estágio do ciclo reprodutivo (Singh & Singh, 1987), e variações nos seus níveis em diferentes épocas do ano podem ser correlacionados com eventos específicos no ciclo maturacional ovariano.

Segundo Fostier *et al* (1981), em peixes teleósteos, o 17 β -Estradiol é encontrado em concentrações relativamente altas no final da vitelogênese e vai decaindo progressivamente durante a maturação final e ovulação. Nos teleósteos em geral, o 17 β -Estradiol é responsável em estimular a síntese de vitelogenina hepática, e é secretado pelas camadas foliculares do ovário durante o período pré-desova, caindo abruptamente durante o período de desova (Cornish, 1998).

Muitas espécies de teleósteos de desova parcelada apresentam por um curto período, flutuações nos níveis plasmáticos de 17 β -Estradiol e testosterona associadas com a maturação de diferentes grupos de oócitos em intervalos de dias ou semanas durante a época de desova (Kime, 1993; Pankhurst & Carragher, 1991). As concentrações de 17 β -Estradiol observadas em fêmeas adultas de *A. gigas* alcançaram o pico máximo na fase de maturação decaindo abruptamente na fase madura e regressão, seguindo o mesmo perfil descrito em literatura para a maioria dos teleósteos.

Foi constatado ainda um aumento na concentração de 17 β -Estradiol de 1,6x quando o animal passa do repouso para a fase vitelogênica, quando o animal passa a mobilizar prontamente as suas reservas para a formação do vitelo, como foi verificado pela avaliação morfológica das gônadas e pelas análises metabólicas. O marcado aumento na concentração de 17 β -Estradiol do repouso para maturação está provavelmente relacionado com a vitelogênese endógena, com conseguinte vitelogênese exógena, refletindo no papel do 17 β -Estradiol na síntese de vitelogenina hepática e posterior incorporação pelos oócitos.

Trabalhos realizados com diversas espécies de peixes, principalmente nas espécies tropicais, apresentaram um pico semelhante de 17 β -Estradiol antes de estar completa a maturação do oócito, como o tambaqui, *Colossoma macropomum* (Venturieri, 1997), tabarana, *Salminus hilarii* (Amaral *et al.* 2007), pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Gazola *et al.*, 1996), jundiá, *Rhamdia quelen* (Barcellos *et al.*, 2001) entre outros.

Para a espécie *Salminus brasiliensis*, os valores de 17 β -Estradiol mostraram-se diferente dos valores obtidos para as espécies de teleósteos tropicais citados acima, ou seja houve um aumento no estágio de repouso para maturação, com um pico na fase de maturação inicial até a transição da fase de maturação avançada, porém permanecendo alta na fase madura do ciclo reprodutivo (Moreira *et al.*, 1999). Por outro lado, as concentrações de 17 β -Estradiol obtidos em *A. gigas* foram menores (concentração máxima de 223,77 pg/ml) aos obtidos por *S. brasiliensis* (concentração máxima de 374,3 pg/ml).

A literatura pertinente apresenta uma ampla variação entre as concentrações de 17 β -Estradiol observados em outros teleósteos. Valores próximos a 8500 pg/ml foram observados para *Scomber japonicus* (Matsuyama *et al.*, 2005) e 10000 pg/ml em tilápia *Sarotherodon áurea* (Yaron *et al.*, 1977), e esses valores, quando comparados com as concentrações obtidas em *A. gigas*, se mostraram bastante elevados. Essas disparidades presumivelmente refletem na diversidade entre os taxos e como eles alteram essas concentrações conforme o estágio do ciclo sexual desses animais.

Segundo Cornish (1998), em fêmeas de *Oreochromis mossambicus*, a concentração de 17 β -Estradiol aumentou gradualmente nos meses de maio a julho, alcançando pico máximo em agosto, decaindo a valores indetectáveis em novembro e dezembro. Este autor relata que não ocorre declínio na concentração de 17 β -Estradiol dessa espécie até alcançar a fase de maturação oocitária. Esse mesmo perfil foi observado em *A. gigas*, porém as concentrações alcançadas por *O. mossambicus* foram maiores ao encontrado por *A. gigas*.

Nos machos adultos, o 17 β -Estradiol apresentou-se alto no grupo 1 em relação ao grupo 2, ou seja, há uma maior concentração de 17 β -Estradiol nos animais que apresentaram poucos espermatozóides no lúmen do túbulo nos testículos em relação aqueles que apresentaram uma maior quantidade de espermatozóides. Miura *et al.* (1999) estudaram e verificaram o papel dos estrógenos na espermatogênese em *Anguilla japonica* *in vivo* e *in vitro*, e verificou que os estrógenos, principalmente o 17 β -Estradiol, promoveram a

renovação mitótica das células embrionárias (*stem cells*) em ambos os tratamentos. Segundo esses autores, a mitose das *stem cells* induzida pelo 17β -Estradiol não é para a formação de esperma, mas para manter um *pool* de células germinativas nessa espécie.

Além dos animais adultos, foi constatado também nos animais imaturos, altas concentrações de 17β -Estradiol, que foram iguais estatisticamente aos animais adultos dentro do ciclo reprodutivo, exceto na fase de regressão. Esse resultado foi constatado também para a testosterona, que manteve-se alta nos animais imaturos exceto aos adultos em maturação e regressão, e principalmente referente à 17α -OHP, que foi mais elevada nos animais imaturos em relação a todos os estádios do ciclo reprodutivo. Essa alta concentração desses hormônios nos animais imaturos é facilmente justificada, pois segundo Reinecke *et al.*, (2006), em peixes imaturos, os hormônios gonadais geralmente estimulam a diferenciação sexual, com o desenvolvimento dos caracteres secundários, desenvolvimento neural, crescimento e maturação sexual em machos e fêmeas. Além disso, a 17α -OHP em animais imaturos não deve estar sendo convertida para $17\alpha,20\beta$ -DHP.

A síntese de 17β -Estradiol pelo ovário diminui com o final da vitelogênese e durante a maturação dos oócitos ocorre um aumento da síntese de $17\alpha,20\beta$ -DHP, um esteróide que é crítico na maturação final do oócito e ovulação na maioria dos teleósteos (Young *et al.*, 2005). A ovulação é definida como a expulsão do oócito do folículo, onde ocorrem vários processos preparatórios críticos que precedem a ovulação. Atualmente, esses processos estão bem estabelecidos em peixes, e a maturação do oócito e conseqüente ovulação são reguladas por três principais mediadores: gonadotropinas (principalmente o LH), hormônio da maturação final ($17\alpha,20\beta$ -DHP ou MIS) e fator de maturação do oócito (MPF). Esses três mediadores agem respectivamente nas células foliculares ovarianas, na superfície do oócito e no citoplasma do oócito (Nagahama, 1997).

Em muitas espécies de teleósteos, a ovulação está associada com uma onda de LH, promovendo a ovulação de um grande número de oócitos, ou até

mesmo de uma população inteira de oócitos. Estudos com *goldfish* sugerem que níveis elevados de ambos os hormônios, testosterona e 17β -Estradiol são importantes na liberação pré-ovulatória de LH através de *feedback* negativo (Kobayashi *et al.*, 1989).

No presente estudo, foi dosado o hormônio 17α -OHP, precursor do $17\alpha,20\beta$ -DHP, sendo este último, como dito anteriormente, o principal progestágeno responsável pela maturação final e ovulação em teleósteos. Pesquisas realizadas em truta arco-íris mostraram que, mudanças previsíveis de níveis circulantes de 17β -Estradiol, gonadotropinas e $17\alpha,20\beta$ -DHP foram observadas durante a maturação final e ovulação. Especificamente com a diminuição de 17β -Estradiol, pôde-se verificar um aumento dos níveis de gonadotropinas, seguido por um rápido aumento de $17\alpha,20\beta$ -DHP no momento da ovulação (Jalabert *et al.*, 1976).

Nas fêmeas adultas de *A. gigas*, a 17α -OHP apresentou as maiores concentrações no estágio de maturação, decaindo significativamente nos estádios posteriores maduro e regressão. As altas concentrações plasmáticas na fase de maturação evidenciam a disponibilidade do precursor para a síntese de $17\alpha,20\beta$ -DHP, e a baixa concentração no estágio seguinte sugere que a 17α -OHP esteja sendo convertida em $17\alpha,20\beta$ -DHP, já que os animais, por serem de ambiente natural, provavelmente não estejam apresentando problemas na desova.

Os machos não apresentaram diferença na concentração de 17α -OHP em ambos os grupos, porém, quando comparado com as fêmeas, as concentrações excederam aquelas observadas nas fêmeas adultas, exceto para os animais imaturos. Em machos, a $17\alpha,20\beta$ -DHP está envolvida na maturação final das células germinativas, mas tem sido identificada principalmente como um potente ferormônio em peixes (Dulka *et al.*, 1987). As concentrações plasmáticas de $17\alpha,20\beta$ -DHP normalmente são elevadas durante a espermição, permitindo a motilidade dos espermatozoides através do aumento do pH do ducto espermático (Miura *et al.*, 1992; Nagahama, 1994).

Nesse contexto, as altas concentrações de 17α -OHP averiguadas em machos sugerem a disponibilidade desse hormônio para a conversão a $17\alpha,20\beta$ -DHP, que atua na motilidade dos espermatozóides, já que ambos os grupos estudados no presente trabalho apresentavam espermatozóides no lúmen dos cistos.

Com relação à testosterona plasmática, as concentrações desse hormônio em fêmeas foram bastante altas quando comparado com a 11ceto-T. Nas fêmeas, a maior concentração obtida de testosterona foi no estágio de maturação e de 11ceto-T no estágio maduro. Nas fêmeas, a testosterona não possui somente o papel de substrato para a formação de estrógeno, mas também desempenha um importante papel no *feedback* hipotalâmico (Matsubara *et al.*, 2003). A 11ceto-T tem sido identificada como sendo um hormônio “macho específico”, porém, em fêmeas, ainda permanece desconhecido qual o papel fisiológico que a 11ceto-T exerce na reprodução (Lokman *et al.*, 2002).

Segundo Matsubara *et al.* (2003), um aumento de 11ceto-T plasmática foi detectada em fêmeas de *Anguilla spp.*, conforme a maturação gonadal avançava. Quando o tecido ovariano de *Anguilla sp.* foi submetido a várias incubações enzimáticas, verificou-se uma grande capacidade de síntese de 11ceto-T *in vitro*, sugerindo que as concentrações de 11ceto-T detectadas no plasma são, na sua maioria, de origem ovariana. Nesse mesmo trabalho, o ovário submetido a tratamento com 11ceto-T demonstrou um aumento no diâmetro dos oócitos devido a presença de maior quantidade de grânulos de lipídios, sugerindo que a 11ceto-T desempenha um importante papel no controle do crescimento do oócito pré-vitelogênico nessa espécie.

Contudo, segundo Lokman *et al.* (2002), a testosterona pode mediar a ação de outros andrógenos. Em algumas espécies de teleósteos, as concentrações de testosterona podem exceder as concentrações de 11ceto-T e vice versa. Esses mesmos autores, estudando uma ampla variedade de espécies de teleósteos, verificaram baixas concentrações de 11ceto-T na maioria das fêmeas estudadas, concluindo que a 11ceto-T não é um hormônio

importante nas fêmeas da maioria das espécies. Porém, a 11ceto-T foi quantitativamente importante em fêmeas pertencentes às famílias Anguillidae, Acipenseridae e Mugilidae, e para *A. gigas* sugere-se também seu papel como importante no ciclo reprodutivo em fêmeas.

Segundo Borg (1994), as variações dos níveis circulantes de andrógenos em machos são marcadas pela mudança sazonal. Na maioria dos teleósteos, os níveis plasmáticos de 11ceto-T alcançam um pico durante a pré-desova e em poucas espécies, este pico é detectado somente no momento da desova. A 11ceto-T é considerada o andrógeno efetivo na espermatogênese, estimulando o comportamento reprodutivo e estimulando as características sexuais secundárias na maioria dos teleósteos.

De acordo com a literatura, a 11ceto-T é considerada o andrógeno principal para *Pseudopleuronectes americanus* (Campbell *et al.*, 1976), *Hyppoglossus stenolepis* (Liu *et al.*, 1991), *Parophrys vetulus* (Sol *et al.*, 1998), *Hyppoglossus hippoglossus* (Weltzien *et al.*, 2002), entre outros. Porém, a 11ceto-T não foi considerada o principal andrógeno para *Glossogobius olivaceus* (Asahina *et al.*, 1985), e *Sardinops melanosticus* (Matsuyama *et al.*, 1991), sendo que outros andrógenos derivativos foram considerados como andrógenos principais nessas espécies.

Nos machos de *A. gigas*, as concentrações de testosterona e 11ceto-T não apresentaram diferença entre os grupos, porém as concentrações de testosterona excederam as concentrações de 11ceto-T. Isso demonstra que os machos de *A. gigas* apresentam uma grande disponibilidade do precursor para a síntese da 11ceto-T.

As concentrações de 11ceto-T averiguadas em machos foram menores do que aquelas encontradas no pacu, *Piaractus mesopotamicus*, um peixe tropical migrador, que apresentou concentrações entre 3000 pg/ml em machos em maturação (Gazola & Borella, 1997). Para os peixes de clima temperado, concentrações excedentes ao encontrado em *A. gigas* também foram averiguadas, como em *Perca fluviates* (em torno de 6000 pg/ml), *Oncorhynchus*

nerka (em torno de 7000 pg/ml) (Roseblum *et al.* 1985) e *Carassius auratus* (em torno de 900pg/ml) (Kobayashi & Nakanishi, 1999).

As altas concentrações encontradas nas diferentes espécies sugerem que o pirarucu esteja utilizando outros andrógenos que não somente a 11ceto-T para a reprodução, que pode ser justificado pelas altas concentrações de testosterona nesses animais, ou mesmo a própria testosterona esteja sendo o andrógeno efetivo em machos de *A. gigas*. Sabe-se que a testosterona é o principal andrógeno nos mamíferos, e a estrutura testicular de *A. gigas* assemelha-se mais aos mamíferos do que aos demais teleósteos estudados. Desta forma, uma questão que fica para a discussão em relação a esta espécie, seria uma maior semelhança nas vias de síntese de andrógenos em *A. gigas* com aquelas de mamíferos do que nos demais teleósteos, ou seja, menor atividade da enzima 11 β -hidroxiesteróide desidrogenase (que converte a testosterona em 11ceto-T).

Além dos esteróides plasmáticos, foram determinados também os esteróides do secreção cefálica em fêmeas e machos ao longo do ciclo reprodutivo. Nenhum estudo até o momento foi conduzido com o objetivo de investigar o real papel deste secreção cefálica em *A.gigas*. Desta forma, consideramos que a investigação da concentração dos principais esteróides neste líquido e uma possível variação ao longo do ciclo reprodutivo poderia ser um indicativo de um envolvimento no processo reprodutivo.

Os dados encontrados mostram que em machos, não ocorrem variações dos principais esteróides gonadais no secreção cefálica, considerando-se os diferentes grupos experimentais, mas altas concentrações de testosterona e 17 α -OHP são encontradas, quando comparadas ao 17 β -Estradiol, padrão semelhante aquele observado no plasma. Destaca-se que em machos, a concentração de 17 β -Estradiol no secreção cefálica dos animais do grupo 2, excede àquela do plasma e é ligeiramente mais elevada (sem diferença estatística) do que os animais do grupo 1, perfil contrário ao encontrado no plasma. Esse perfil sugere um possível processo de eliminação deste esteróide pelo secreção cefálica.

A análise da secreção cefálica das fêmeas mostra uma queda de 17β -Estradiol nos animais em regressão, etapa do ciclo reprodutivo em que este estrógeno também se reduz no plasma. Os valores de 17α -OHP mostraram-se maiores aos valores encontrados desse mesmo esteróide no plasma para os estádios finais do ciclo reprodutivo, como maduro e regressão, sugerindo também para fêmeas uma possível via de eliminação desse hormônio.

Esses valores excedentes de 17α -OHP na secreção cefálica de fêmeas e 17β -Estradiol em machos, coincidentemente nas fases de maior desenvolvimento gonadal, podem levar a um questionamento sobre o papel destes esteróides como feromônios, como discutido por Munakata & Kobayashi (2009). Este comportamento seria semelhante ao que ocorre com a vitelogenina, que quando em excesso, é eliminada junto ao muco cutâneo (Moncaut et al, 2003) e é considerada como feromônio.

5.7. Razão 11ceto-T e 17β -Estradiol

A determinação sexual é um pré-requisito para manter a razão sexual apropriada de uma espécie durante seu cultivo. Na maioria das espécies, a identificação do sexo é possível devido às características externas e em alguns casos, biópsias intra-ovarianas e endoscopia em animais anestesiados permitem a identificação sexual nos animais até mesmo fora do período reprodutivo (Kynard & Kieffer 2002; Hurvitz *et al.* 2007; Bryan *et al.* 2007; Swenson *et al.* 2007).

Atualmente, o pirarucu é uma espécie com grande potencialidade para a piscicultura comercial devido à grande rusticidade, alto valor de mercado, excelente sabor da carne, porte e extraordinário desenvolvimento ponderal, que pode chegar até 10 kg no primeiro ano de vida (Imbiriba, 1985; Bard & Imbiriba, 1986; Imbiriba, 1991; Carvalho & Nascimento, 1992; Imbiriba, 2001). Além disso, esforços estão sendo conduzidos para a criação desta espécie em piscicultura de conservação, uma vez que a mesma encontra-se na lista de espécies

sobreexplotada, segundo CITES (*Convention on International Trade of Endangered Species of Wild Fauna and Flora*).

No entanto, a primeira dificuldade encontrada na criação desta espécie é a identificação de machos e fêmeas para a formação de casais em piscicultura sejam para o cultivo comercial quanto de conservação, pois o pirarucu é uma espécie que não possui nenhuma característica externa que permita a distinção do sexo. O padrão de coloração que esses animais assumem durante o ciclo reprodutivo foi adotado por alguns autores para distinguir machos e fêmeas (Monteiro, 2005; Chu-Koo *et al*, 2009), porém a coloração dos animais pode variar regionalmente.

No presente trabalho, essa característica não foi considerada critério de sexagem, pois as observações diretas realizadas em campo em relação ao padrão de coloração que o animal assume durante o período reprodutivo e a determinação sexual através da visualização das gônadas foram divergentes em vários animais.

Pela divergência das informações relacionadas à sexagem do pirarucu, optou-se por realizar a razão entre 11ceto-T e 17 β -Estradiol seguindo metodologia descrita por Chu-Koo *et al*. (2009), encontrando uma porcentagem de 88,63% de acerto na sexagem correta dos animais. É importante salientar que os cinco animais que não entraram na razão estipulada por essa metodologia, eram machos, e três deles encontravam-se nos estádios mais avançados do ciclo reprodutivo (grupo 2). Segundo Chu-Koo *et al*. (2009), a razão desses hormônios pode variar muito ao final da vitelogênese ou próximo à espermição, pois os níveis de 11ceto-T e 17 β -Estradiol podem alcançar o pico máximo nestes estágios reprodutivos.

Os resultados obtidos utilizando esses dois hormônios foram considerados satisfatórios no presente trabalho, sendo esta metodologia considerada viável para a determinação sexual de *A. gigas*.

6. CONCLUSÕES

- O IGS não pode ser utilizado para definir o estágio e período de maturação em machos. Já nas fêmeas, o IGS pode ser confiável para definir estágio reprodutivo, desde que analisados ao longo de todo o ciclo reprodutivo;
- A *ventrecha* é o principal local de armazenamento de lipídios totais para machos e fêmeas;
- Na fase madura, houve a menor concentração lipídica plasmática, concomitante à maior concentração lipídica no ovário, e essa deposição demonstra a necessidade desse substrato na formação do ovo;
- Em fêmeas, os ácidos graxos monoinsaturados foram maiores na fase de regressão na fração neutra hepática e na musculatura branca, sugerindo um redirecionamento destes monoinsaturados do ovário para esses tecidos de armazenamento na fase de reabsorção gonadal;
- Os PUFA n3 em fêmeas na fração neutra hepática foram maiores nos animais imaturos em relação a fase de regressão sugerindo que os PUFA n3 estejam sendo armazenados nesse tecido por haver uma grande disponibilidade desses ácidos graxos na dieta e baixa demanda para as gônadas;
- Na fração polar ovariana, os PUFA n3 foram maiores na fase madura em relação às demais fases reprodutivas, inclusive no animal imaturo, sendo que essa alta porcentagem reflete na importância desses ácidos graxos no ovo, que serão utilizados para o futuro desenvolvimento da larva;
- Nos machos, os ácidos graxos monoinsaturados foram maiores no grupo 2 no músculo branco e *ventrecha*, devido à necessidade de um maior aporte energético na musculatura para o comportamento reprodutivo;
- Os animais imaturos apresentaram as maiores concentrações plasmática de 17β -Estradiol e 17α -OHP em relação aos adultos, já que esses hormônios estimulam o desenvolvimento de características secundárias,

desenvolvimento neural, crescimento e maturação sexual nos animais imaturos em machos e fêmeas;

- Nos machos, a concentração plasmática de 17β -Estradiol foi maior nos animais do grupo 1 sugerindo o papel do 17β -Estradiol em manter um *pool* de células germinativas nessa espécie;
- As concentrações de testosterona excedem à de 11ceto-T em machos, sugerindo que essa espécie esteja utilizando outros andrógenos e não somente a 11ceto-T para a reprodução, ou mesmo a própria testosterona esteja sendo o andrógeno efetivo nos machos de *A. gigas*;
- As concentrações de 17α -OHP na secreção cefálica em fêmeas e 17β -Estradiol em machos do grupo 2 excedem às concentrações plasmáticas, sugerindo uma possível via de eliminação desses hormônios, levando também a hipótese do papel desses esteróides como feromônios.
- Não é possível utilizar características secundárias como coloração da escama como indicativo do sexo, porém a sexagem é possível de se realizar utilizando a razão entre os hormônios plasmáticos 11ceto-T e 17β -Estradiol.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ackman, R. G. e Kean-Howie, J. 1995. Fatty Acids in Aquaculture: Are n-3 Fatty Acids Always Important?. *Nutrition and Utilization Technology in Aquaculture*. AOCS PRESS, p. 82-104.
- Adams, S. M. 1999. Ecological role of lipids in the health and success of fish populations. In: M.T. Arts and B.C.Wainman (eds.). *Lipids in freshwater ecosystems*. Springer (Publ.), New York, EUA, p.132-153.
- Amaral, J.S., Melo, R.G., Honji, R.M., Moreira, R.G., 2007. Effects of migration impediment of *Salminus hilarii* (Teleost: Characidae) on the pituitary-gonad axis. *Comparative Biochemistry and Physiology*. V148A, suppl.1, p.S44.
- Andrade, A. D., Rubira, A. F., Matsushita, M. e Souza, N. E. 1995. Omega 3 fatty acids in freshwater fish from South Brazil. *JAOCs*, v. 72, n. 10, p. 1207-1210.
- Arts, M. T., Wainman. B.C., 1998. *Lipids in freshwater ecosystems*. Springer-Verlag, New York.
- Arts, M.T., Ackman, R.G., Holub, B.J. 2001. Essential fatty acids in aquatic ecosystems: a crucial link between diet and human health and evolution. *J. Fish. Aquatic. Sci.*, v. 58, p. 122-137.
- Asahina, K.; Suzuki, K.; Aida, K.; Hibiya, T.; Tamaoki, B., 1985. Relationship between the structures and steroidogenic functions of testes of the urohaze-goby (*Glossogobius olivaceus*). *Gen. Comp. End.* 57: 281-292.
- Baldisserotto, B. 2002. *Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura*. Rio Grande do Sul, Ed. UFSM. 211p.
- Barcellos, J.G. Wassermann, G.F. Scott A.P., Woehl, V.M. Quevedo, R.M. Itzes, I. Krieger M.H.and Lulhier, F., 2001. Steroid profiles in cultured female jundia, the siluridae *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pisces Teleostei), during the first reproductive cycle, *Gen. Comp. Endocrinol.* 121, pp. 325–332.
- Bard, J.; Imbiriba, E. P. 1986. Piscicultura do pirarucu, *Arapaima gigas*. Belém: EMBRAPA-CPATU, 17p. (Circular Técnica, 52).

- Bell, J.G., Dick, J.R. McVicar, A.H., Sargent, J.R. Thompson, K.D., 1993. *Fatty Acids* 49: 665.
- Bell, J.G., Tocher, D.R., Farndale, B.M., Cox, D.I., McKinney, R.W., Sargent, J.R. 1997. *Lipids*. 32, 515.
- Bell, M. V., Henderson, R. J., Sargent, J. R. 1986. The role of polyunsaturated fatty acids in fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 83B, n. 4, p. 711-719.
- Blanchard, G., Druart, X., Kestemont, P. 2005. Lipid content and fatty acid composition of target tissues in wild *Perca fluviatilis* in relation to hepatic status and gonad maturation. *Journal of Fish Biology*, v. 66, p. 73-85.
- Borg, B. 1994. Androgens in teleost fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology* 109C, 219-45.
- Braekken, O.R., 1959. A comparative study of vitamins in the trunk muscles of fishes. *Rep. Technol. Res. Norway. Fish Ind.* 3(8):1-51.
- Bryan BJL, Wildhaber ML, Papoulias DM, DeLonay AJ, Tillitt DE, Annis ML (2007) Estimation of gonad volume, fecundity, and reproductive stage of shovelnose sturgeon using sonography and endoscopy with application to the endangered pallid sturgeon. *J Appl Ichthyol* 23:411–419.
- Camargo, C. 2007. Efeitos do bloqueio da migração reprodutiva nas reservas metabólicas da tabarana *Salminus hilarii* (Characiformes: Characidae). *Dissertação de mestrado em Biotecnologia*. Universidade de Mogi das Cruzes-SP. 65p.
- Campbell, C. M., Walsh, J. M., and Idler, D. R. 1976. Steroids in the plasma of the winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) Walbaum. A seasonal study and investigation of steroid involvement in oocyte maturation. *General and Comparative Endocrinology* 29, 14-20.
- Carvalho, L. O. D. de M.; Nascimento, C. N. B. 1992. Engorda de pirarucus (*arapaima gigas*) em associação com búfalos e suínos. Belém, *EMBRAPA CPATU*, 21p. (Circular técnica, 65).
- CHRISTIE, W.W. *Lipids Analysis*. The Oily Press, Bridgwater, UK, 2003.
- Chu, F.L.E., Ozkizilcik, S., 1995. *Comp. Biochem. Physiol.* 111B, 665.

- Chu-Koo, F., Dugué, R., Aguilar, M.A., Daza, A.C., Bocanegra, F.A., Veintemilla, C.C., Duponchelle, F., Renno, J.F., Tello, S., Nuñez, J., 2009. Gender determination in the paiche or pirarucu (*Arapaima gigas*) using plasma vitelogenina, 17 β -estradiol, and 11-ketotestosterone levels. *Fish Physiology Bioch.* 35(1): 125-36
- Cormillot, A. 2002. *O colesterol: O que é, quando prejudica a saúde e o que fazer para controlá-lo*. São Paulo: Editora Caras, 191 p.
- Cornish, D.A. 1998. Seasonal steroid hormone profiles in plasma and gonads of tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Water SA.* 24(3):257-263.
- Coward, K., Bromage, O., Parrington, J., 2002. Gamete physiology and egg activation in teleost fish. *Reviews in fish Biology and Fisheries.* 12: 33-58.
- Cunnane, S.C. 2003. Problems with essential fatty acids: time for a new paradigm? *Progress in Lipid Research* 42: 544– 568.
- Cyr, D. G., Eales, J.G. 1996. Interrelationships between thyroidal and reproductive endocrine system in fish. *Rev. Fish Biol. Fish.*, v.6, p.165-200.
- Cyrino, J. E. P., Urbinati, E. C., Fracalossi, D. M. e Castagnolli, N. 2004. *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva*. Ed. TecArt, São Paulo, p. 75-81.
- Dawson, A.S. and Grimm, A.S. 1980. Quantitative seasonal changes in the protein, lipid and energy content of the carcass, ovaries and liver of adult female plaice, *Pleuronectes platessa* L., *J. Fish Biol.*, vol. 16. p. 493-504.
- Dulka, J. G., N. E. Stacey, P. W. Sorensen, and G. J. Van Der Kraak. 1987. Sex steroid pheromone synchronizes male-female spawning readiness in the goldfish. *Nature* 325: 251-253.
- Evans, D.H., Claiborne, J.B., 2006. *The Physiology of Fishes*. Third edition, CRC Press, Taylor & Francis Group. 602 pp.
- Ferraris J.R. C. J. 2003. Family Arapaimatidae (Bonytongues). In: Reis, R. E.; Kullander, S. O.; Ferraris J.R., C. J. (org.). *Check list of the freshwater fishes of South and Central America*. Porto Alegre: Edipucrs, 742p.

- Finn, R.N. 2007. Vertebrate yolk complexes and the functional implications of phosvitins and other subdomains in vitellogenins. *Biology of Reproduction*. 76,926-935.
- Flores, H.G. 1980. Sexual development of *Arapaima gigas* in the national reserve area of the Pacaya-Samiria rivers during 1971-1975. Report 67, 20pp. *Marine Institute of Peru*. Callao, Peru.
- Folch, J., Less, M., Stanley, G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226:497-503.
- Fontenele, O. 1948. Contribuição para o conhecimento da biologia do pirarucu, *Arapaima gigas*, (Cuvier), em cativo (Actinopterygii, Osteoglossidae). *Revista Brasileira de Biologia*, Rio de Janeiro, v. 8, n. 4, p. 445-459, dez.
- Fontenele, O., Vasconcelos, E.A. 1982. The arapaima, *Arapaima gigas* (CUVIER, 1817) in the northeast ponds: results on adaptation and probable causes of stock depletion. *Boletim Técnico DNOCS*. 40: 43-66p.
- Fostier J.J., Campbell C.M., Sabin G.C.W. 1981. The fish catching process relevant to trawls. *Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences* 58:229–246.
- Frings, C.S., Fendly, T.W., Dunn, R.T., Quenn, C.A. 1972. Improved determination of total lipids by the sulpho-phospho-vanilin reaction. *Clin. Chem.*, 18: 673-674.
- Gazola, R.; Borela, M.I.; Donaldson, E.M., Val-sella, M.V.; Sukumasavin, N.; Favade-Moraes, F.; Bernardino, G. 1997. Plasma steroid and corticosteroid levels in female pacu *Piaractus mesopotamicus*, Teleostei-Characidae. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 29(5): 659-664.
- Gershanovick, A.D., 1991. Proc. *First Int. Symp. Sturgeon*, Bordeaux (Gironde), France, Oct 1989. p41.
- Godinho, H.P., Santos, J.E., Formagio, P.S., Guimarães-Cruz, R.J., 2005. Gonadal morphology and reproductive traits of the Amazonian fish *Arapaima gigas* (Schinz, 1822). *Acta Zoologica* (Stockholm). 86: 289-294p.

- Gomes, A.D., 2007. Utilização de ácidos graxos como ferramenta na identificação trófica de peixes em ambiente aquático submetidos às ações antrópicas. *Relatório de Iniciação Científica*. São Paulo. 34p.
- Goulding, M. 1979. *Ecologia da pesca do rio Madeira*. Manaus. INPA. 172p.
- Grier, H.J., 1993. Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli barrier. In: Russel, L.D. & Griswald, M.D. editors. *The Sertoli cell*. Clearwater: Cache river press. P.703-739.
- Guraya, S.S. 1986. The cell and molecular biology of fish oogenesis. *Monogr. Dev. Biol.*, New York, Karger, v. 18.
- Henderson, R.J., Tocher, D.R. 1987. The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. *Prog. Lipid Res.*, v. 26, p. 281-347
- Henderson, T. R., Hamosh, M. & Hayman, L., 1996. Serum long chain polyunsaturated fatty acids are adequate in full term breastfed infants in spite of low milk LC-PUFA after 3 months lactation. *Pediatr. Res.* 39: 311A (abs.).
- Hickman, C. P., Roberts, L. S., Larson, A. 2004. *Princípios integrados de zoologia*. 11th. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Higgs, D.A., Dong, F.M. 2000. Lipids and fatty acids. In: Stickney RR (ed.) *Encyclopedia of Aquaculture*, pp. 476–496. John Wiley & Sons, New York.
- Hilborn, R., T. A. Branch, B. Ernst, A. Magnusson, C. V. Minte-Vera, M. D. Scheuerell, and J. L. Valero. 2003. State of the world's fisheries. *Annual Review of Environment and Resources* 28:359–399.
- Hoar, W. S. 1969. *Reproduction*. In: Hoar, W. S.; Randall, D. J. Fish Physiology. New York: Academic Press, cap. 1, p. 1-72.
- Hochachka, P.W., Somero, G.M., 2002. *Biochemical adaptation mechanism and process in physiological evolution*. New York.: Oxford University Press, 466p.
- Honji, R.M., Narcizo, A.M., Borella, M.I., Romagosa, E., Moreira, R.G., 2009, Patterns of oocyte development in natural habitat and captive *Salminus hilarii* Valenciennes, 1850 (Teleostei: characidae). *Fish Physiology Biochem.* 35: p.109-123.
- Horn, M.H. 1972. The amount of space available for marine and freshwater fishes. *Fish Bulletin*. 70:1295-1297.

- Hurvitz A, Jackson K, Degani G, Levavi-Sivan B (2007) Use of endoscopy for gender and ovarian stage determinations in Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) grown in aquaculture. *Aquaculture* 270:158–166.
- Imbiriba, E. P. 1985. Resultados preliminares da criação do pirarucu, *Arapaima gigas* (CUVIER), em cativeiro. Belém: EMBRAPA-CPATU, 1985. 4p. (Circular técnica, 144).
- Imbiriba, E. P. 2001. Potencial de criação de pirarucu, *Arapaima gigas*, em cativeiro. *Acta Amazônica*, Manaus, v. 31, n. 2, p. 299-316.
- Imbiriba, E., P. 1991. Produção e manejo de alevinos de pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier). *Circular Técnica*, EMBRAPA, n.57.
- Inhamuns, A.J., Franco, M.R.B., Batista, W.S. 2009. Seasonal variations in total fatty acid composition of muscles and eye sockets of tucunaré (*Cichla* sp.) from the Brazilian Amazon area. *Food Chemistry*. Doi: 10.1016/j.foodchem.2009.03.113.
- Jalabert, B. 1976. In vitro oocyte maturation and ovulation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*), northern pike (*Esox Indus*), and goldfish (*Carassius auratus*); *J. Fish Res. Board Can.* 33 974-988
- Jobling, M. 1994. *Fish Bioenergetics*. Chapman & Hall: London, 309 p.
- Kawauchi, H. & Sower, S.A. 2006. The dawn and evolution of hormones in the adenohypophysis. *General and Comparative Endocrinology*. 148: 3-14.
- Kime, D. 1993. 'Classical' and 'non-classical' reproductive steroids in fish, *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 3, pp. 160–180.
- Kobayashi, M., Nakanishi, T., 1999. 11-Ketotestosterone induces male-type sexual behavior and gonadotropin secretion in gynogenetic crucian carp, *Carassius auratus langsdorfii*. *Gen. Comp.Endocrinol.* 115, 178–187.
- Krzynowek, J., 1985., Sterols and fatty acids in seafood. *Food Technology* 39: 61–68.
- Kynard B, Kieffer M (2002) Use of a borescope to determine the sex and egg maturity stage of sturgeons and the effect of borescope use on reproductive structures. *J Appl Ichthyol* 18:505–508.

- Lima, R.L.V.A., Mimura, O.M., Val-Sella, M.V., Bernardino, G., Moreira, R.G., 1997. Fisiologia Reprodutiva do pirarucu *Arapaima gigas* CUVIER, 1817. I. Anatofisiologia das gônadas – Estudos preliminares. In: *XII Encontro Brasileiro de Ictiologia*, São Paulo, 1997. Resumo.
- Liu, H.W., Stickney, R.R., Dickhoff, W.W., 1991. Changes in plasma concentrations of sex steroids in adult Pacific halibut, *Hippoglossus stenolepis*. *J. World Aquacult. Soc.* 22, 30–35.
- Lockman, P.M. Harris, B. Kusakabe, M. Kime, D.E. Schulz, R.W. Adachi S. and Young, G. 2002. 11-oxygenated androgens in female teleosts : prevalence, abundance, and life history implications, *Gen. Comp. Endocrinol.* 129, pp. 1–12
- Love, R. M. 1980. *The chemical biology of fishes*. London: Acad. Press., 943p.
- Lovshin, L. L.; Cyrino, J. E. P. 1997. Status of commercial fresh water fish culture in Brasil. *World Aquaculture*, Rio de Janeiro, p. 23-38.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- Luzia, L. A. 2003. The influence of season on the lipid profiles of five commercially important species of Brazilian fish. *Food Chemistry*, v. 83, n1, p. 93-97.
- Matsubara et al., H. Matsubara, H., Lokman, P.M., Senaha, A., Kazeto, Y. Ijiri, S., Kambegwa, A., Hirai, T., Young, G., Hirai, T., Adachi S. Yamauchi, K. 2003. Synthesis and possible function of 11-ketotestosterone during oogenesis in eel (*Anguilla* spp.), *Fish Physiol. Biochem.* 28, pp. 353–354.
- Matsuyama T, Kamaishi T, Ooseko N, Kurohara K. and Lida T. 2005. Pathogenicity of motile and non-motile *Edwardsiella tarda* to some marine fish; *Fish Pathol.* 40 133–136.
- Matsuyama, M., Adashi, S., Nagahama, Y., Kitajima, C., Matura, S., 1991. Annual reproductive cycle of captive females Japanese sardine *Sardinops melanostictus*: relationship to ovarian development and serum levels of gonadal steroid hormones. *Marine Biology.* 108: 21-29.

- Medeiros, I. M. Magalhães, K. D. Costa, S. A. G. L. Mendonça, M. C. F. B. Costa, M. L. Segundo, A.I.N.M. Da silva D.A. Nascimento, R. S. S. 2006. Ciclo reprodutivo de fêmeas de Tucunaré (*Cichla ocellaris*) Bloch & Schneider, 1801, da Lagoa do Piató no Município de Assú – Rio Grande do Norte, Brasil. *Nota Científica Universidade do Estado do R.G. do Norte*. 1-6p.
- Meffe, G.K., Snelson, F.F.J.R. 1993. Annual lipid cycle in eastern mosquitofish (*Gambusia holbrooki*: Poeciliidae). *Copeia*, vol. 3. p. 596-604.
- Menezes, R.S., 1951. Biological and economical notes on the arapaima *Arapaima gigas* (Actinopterygii: Arapaimidae), *Série Estudos Técnicos*, 3. *Brasil Ministério da Agricultura*, Serviço de Informação agrícola, RJ.
- Milligan, C. L., Girard , S. S. Lactate metabolism in rainbow trout. 1993. *J. Exp. Biol.*, v. 180, p. 175-193.
- Miura, C. Miura, T. Ohta, M.R. Nader, T. Todo and K. Yamauchi, 1999. Estradiol-17 β stimulates the renewal of spermatogonial stem cells in males, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 264, pp. 230–234.
- Mommsen, T. P. 2001. Paradigms of growth in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology* 129B: 207-219.
- Moncaut, N., Lo Nostro, F., Maggese, M.C., 2003. Vitellogenin detection in surface mucus fo South América ciclid fish *Cichlassoma dimerus* (Hickel, 1940), induced by estradiol. Effects on liver and gonads. *Aquatic toxicology* 63: 127-137.
- Monteiro, L.B.B., 2005. Caracterização do crescimento, reprodução e perfil hormonal dos esteróides sexuais do pirarucu, *arapaima gigas* (schinz,1822), em condições de cativeiro. *Dissertação de mestrado em recursos pesqueiros e aqüicultura*, Universidade Federal Rural de Pernambuco.
- Moreira R.G., Venturieri, R.L.L., Mimura, O.M., 2002. Lipid and protein alteration in the liver and plasma of the migratory teleost *Salminus maxillosus* during the reproductive cycle. *J. Aquac.Trop.* 17: 209-219.
- Moreira, R.G., Mimura, O.M., Oliveira-Filho, R.M., Lima, R.L.V.A., Bernardino, G. 1999. Níveis plasmáticos de esteróides gonadais em *Salminus maxillosus*

- (Valenciennes, 1840) coletados em ambiente natural. *XII Encontro Brasileiro de Ictiologia* – São Carlos.
- Muje, P., Agren, J.J., Lindovist, O.V., Hanninen, O. 1989. Fatty acid composition of vendace *Coregonus albula* L. muscle and its plankton feed. *Comp. Biochem. And Physiol.* 92:75-79.
- Munakata, A., Kobayashi, M., 2009. Endocrine control of sexual behavior in teleost fish. *Gen. Comparative Endocrinology*. Doi:10.1016/j.ygcen.2009.04.011.
- Nagahama, Y. 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *The International Journal of Developmental Biology*. 38. p.217-229.
- Nagahama, Y. 1997. 17α , 20β -Dihydroxy-4-pregnen-3-one, a maturation-inducing hormone in fish oocytes: Mechanisms of synthesis and action. *Steroids*, 62: 190-196.
- Nagahama, Y., 1983. The functional morphology of teleost gonad. In: Hoar, W.S., Randall, D.J., Donaldson, E., (Ed). *Fish Physiology*. New York: Academic Press. V9A, 223-275p.
- Nagahama, Y., 1994, Endocrine control of gametogenesis. *Int. J. Dev. Biol.*, 38: 217-229.
- Nassour, I., Léger, C.L., 1989. Deposition and mobilization of body fat during sexual maturation in female trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Aquat. Living Resour.*, v2, n3, 153-159p.
- Nelson, D. L., Cox, M. M. 2005. *Lehninger: Principles of biochemistry*. Freeman, New York, EUA, 1119 p.
- Nelson, J.S. 1994. *Fishes of the world*, 3.ed. John Wiley & Sons, New York. 600p.
- Nelson, J.S., 2006. *Fishes of the world*, New York. Wiley – Interscience. 4th Edition. 624 pgs.
- Nicol, J.A.C., Arnott, H.J., Mizuno, G.R., Ellison, E.C., Chipault, J.R., 1972. Occurrence of glyceryl tridocosahexaenoate in the eye of the sand trout *Cynoscion arenarius*. *Lipids*. 7:171-177.

- Nikolsky, G. 1976. The interrelation between variability of characters, effectiveness of energy utilization and karyotype structure in fishes. *Evolution*, 30, 180—185.
- Norris, D.O. *Vertebrate Endocrinology*. 1997. Third edition. Academic Press. California. USA. 633p.
- Núñez, J., Duponchelle, F., 2008. Towards a universal scale to assess sexual maturation and related life history traits in oviparous teleost fishes. *Fish Physiology Biochem*. DOI 10.1007/s10695-008-9241-2.
- Ogawa, M. 1999. Química do pescado. In: MASAYOSHI, M.; MAIA, E.L. (Eds.). *Manual de pesca – ciência e tecnologia do pescado*. São Paulo: Varela, cap. 4, p. 29-71.
- Oliveira, E. R. N., Agostinho, A. A. e Matsushita, M. 2003. Effect of biological variables and capture period on the proximate composition and fatty acid composition of the dorsal muscle tissue of *Hypophthalmus edentulus* (Spix, 1829). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 46, p. 105-114.
- Oliveira, V., Poletto, S.L., Venere, P.C., Feeding of juvenile pirarucu *Arapaima gigas*, Arapaimatidae, in their environment, Lago Quatro Bocas, Araguaina-MT, Brazil. *Neotropical Ichthyology*. 3(2):312-314.
- Pankhurst, N. W., and Carragher, J. F. 1991. Seasonal endocrine cycles in marine teleosts. In *Reproductive Physiology of Fish*. (Eds A. P. Scott, J. P. Sumpter, D. E. Kime and M. S. Rolfe.) pp. 131-5. (FishSymp 91: Sheffield.)
- Pereira, N.O., 1954. O pirarucu, Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, *Divisão de caça e pesca*, 23pg.
- Peter, R.E., Yu, K.L., 1997. Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: basics and applied aspects. *Rev. Fish Bio. and Fish*. v.7, 173-197.
- Pinese, J.F., 1996. Morfologia funcional da alimentação do pirarucu (*Arapaima gigas*). Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Programa de Pós Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos.
- Raven, C.P., 1961. Oogenesis: *The storage of developmental information*. Pergamont. New York.

- Rebaza Alfaro M, Rebaza Alfaro C, Deza Taboada S., 2003. Observaciones de la reproducción de paiche *Arapaima gigas* (Cuvier) en ambientes controlados en el IIAP Ucayali. In: Alcantara Bocanegra F, Montreuil Frias V (eds) *Fish Physiol Biochem* (2009) 35:125–136.
- Reinecke, M., 2006. Insulin-like growth factor I and II in fish. In *Fish Endocrinology*, vol 1, pp 87–130. Eds M Reinecke, G Zaccone & BG Kapoor. Enfield, Jersey, Plymouth: Science Publishers.
- Rocha, M.J., Rocha, E. 2006. Morphofunctional aspects of reproduction from synchronous to asynchronous fishes – an overview. In: *Fish Endocrinology*, volume 2. Science Publisher, USA. 571-624p.
- Rosenblum, P.M., Yamada, L., Callard, I.P., Callard, G.V., 1985. Validation of radioimmunoassay systems for the measurement of 11-keto- and 11b-hydroxytestosterone in teleost blood. *Comp. Biochem. Physiol.* 82, 659–665.
- Sakun OF. 1966. Transition to meiotic division in oocytes with uncomplete vitellogenesis under the influence of hormonal stimulation in the salmon *Salmo salar* L. *Doklady Akademii nauk SSSR*. 169(1):241-4.
- Santos, J.E., Padilha, G.E.V., Bomcompagni-Júnior, O., Santos, G.B., Rizzo, E., Bazzoli, N., 2006. Ovarian follicle growth in the catfish *Iheringichthys labrosus* (Siluriformes: Pimelodidae). *Tissue and Cell*. 38: 303-310p.
- Sargent, J. R., Parkers, R. J., Mueller-Harvey e Henderson, R. J. 1989. Lipid biomarkers in marine ecology. In: *Microbes in the sea*. Ed Ellis Horwood Limited, p. 119-138.
- Sargent, J.R, Tocher, D.R, Bell, J.G. 2002. The lipids. In: Halver JE, Hardy RW (eds) *Fish Nutrition*, pp. 181–257. Academic Press, Elsevier, San Diego.
- Schreiner, M. 2003. The incorporation and position of omega-3 fatty acids into egg yolk lipid and sensory attributes of egg yolk from laying hens fed seal Blubber oil. Phd Thesis. Boku Universität, Vienna, 173 p.
- Sharma, P., Kumar,V., Sinha, A.M., Kithsiri, H.M.P., Venkateshwaru, G., 2009. Comparative fatty acid profile of wild and farmed tropical freshwater fish rohu *Labeo rohita*. *Fish physiol. Biochem*. DOI: 10.1007/s10695-009-9309-7.

- Sheridan, M.A., 1994. Regulation of lipid metabolism in poikilothermic vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.197B, p.495-508p.
- Singh, S., Singh, T.P., 1987. Seasonal profiles of Sex steroids in blood plasma and ovarian tissue of *Clarias batrachus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, v.65, p.216-224.
- Sol, S.Y., Olson, O.P., Lomax, D.P., Johnson, L.L., 1998. Gonadal development and associated changes in plasma reproductive steroids in English sole, *Pleuronectes vetulus*, from Puget Sound, Washington. *Fish. Bull.* 96, 859–870.
- Swenson EA, Rosenberger AE, Howell PJ (2007) Validation of endoscopy for determination of maturity in small Salmonids and sex of mature individuals. *Trans Am Fish Soc* 136:994–998
- Takama, K., Love, R.M, Smith, G.L., 1985. Selectivity in mobilization of stored fatty acids by maturing cod *Gadus morrhua* L., *Comp. Biochem. Physiol.* 80B, 713-718.
- Tyler, C.R. & Sumpter, J.P., 1996, Oocyte growth and development in teleosts. *Reviews in Fish Biology and Fisheries.* 6: 287-318.
- Van den Hurk, R., Peute, J., 1979. Cyclic changes in the ovary of the rainbow trout *Salmo gairdneri* with special reference to sites of steroidogenesis. *Cell Tissue Res.* 199:289-306.
- Vazzoler, A.E.A.M. 1996. *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: Teoria e Prática*. Maringá: EDUEM.
- Venturieri R. L.L. 1997. Determinação de Esteróides e Eletrólitos Plasmáticos em Fêmeas adultas de Tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) Pisces, Teleostei Durante a Maturação Gonadal. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. 133p.
- Venturieri, R.; Bernardino, G. 1999. Pirarucu: Espécie ameaçada pode ser salva através do cultivo. *Panorama da Aqüicultura*, Rio de Janeiro, v. 9, n. 53, p. 13-21.
- Venturieri, R.L.L. 1997. Determinação de esteróides e eletrólitos plasmáticos em fêmeas adultas de tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818)

- Pisces, Teleostei durante a maturação gonadal. *Tese de doutorado*. São Paulo. 133p.
- Venturieri, R.L.L., Batlouni, S.R., Moreira, R.G., Bernardino, G., 2002, Ultrastructure of male germ cells in the amazonian pirarucu *Arapaima gigas* (Teleostei, Osteoglossidae), *Tropical fish: News and Reviews*, 101-104p.
- Verreth, J., Coppoolse, J., Segner, H., 1994. *Aquaculture*. 126: 137.
- Vilecco, E.I.; Aybar, M.J.; Riera, A.N.S.; Sánchez, S.S. 1999. Comparative study of vitellogenesis in the anuran amphibians *Ceratophrys cranwelli* (Leptodactylidae) and *Bufo arenarum* (Bufonidae). *Zygote*. 7, 11-19.
- Wallace, R.A. & Sellman, K. 1981. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleost. *American zoologist*. 21: 325-343.
- Wiegand, M. D., 1996. Composition, accumulation and utilization of yolk lipids in teleost fish. *Rev. Fish. Biol. Fish.*, Dordrecht, v. 6, p. 259-286.
- Wootton, R.J. 1990. *Ecology of teleost fish*. London – New York. Chapman and Hall. 404p.
- Wootton, R.J., 1990, *Ecology of teleost fishes*. Chapman & Hall, London, 404p.
- YANG, Z. Development of a gas chromatographic method for profiling neutral lipids in marine samples. MSc Thesis. Memorial University of Newfoundland St. John's, 2005.
- Yaron, Z., Terkatin-Shimony. 1977. Occurrence and biological activity of estradiol-17 β in the intact and ovariectomized *Tilapia aurea* (Cichlidae, Teleostei). *Gen. Comp. Endocrinol.* 33, 45-52
- Young, G., Kusakabe, M., Nakamura, I., Lokman, P.M., Goetz, F.W. 2005. Gonadal Steroidogenesis in Teleost Fish. In: *Hormones and their Receptors in Fish Reproduction*. Melamed, P., Sherwood, N., World Scientific Publishing Co. Pte. Ltda. 1° ed. Singapore. p.155-223.
- Zengin, H., Akpınar, M.A. 2006. Fatty acid composition of *Oncorhynchus mykiss* during embryogenesis and other developmental stages. *Biologia, Bratislava*, 61/3: 305—311.

TABELAS

Tabela 01: Dados morfométricos e ponderais de *A. gigas* e IGS (Índice Gonadossomático). (Média $\pm$ EP).

FÊMEAS	Lt(m)	Wt(Kg)	IGS (%)
Imaturo	1,35 $\pm$ 0,09	23,02 $\pm$ 4,41	0,026 $\pm$ 0,002
Repouso	1,5 $\pm$ 0,15	31,84 $\pm$ 11,48	0,048 $\pm$ 0,020
Maturação	1,67 $\pm$ 0,04	47,88 $\pm$ 13,63	0,217 $\pm$ 0,102
Maduro	1,61 $\pm$ 0,17	37,71 $\pm$ 13,89	1,228 $\pm$ 0,343 ^a
Regressão	1,29 $\pm$ 0,37	11,18 $\pm$ 1,15	0,218 $\pm$ 0,117
MACHOS	Lt(m)	Wt(Kg)	IGS (%)
Grupo 1	1,41 $\pm$ 0,04	25,44 $\pm$ 2,39	0,013 $\pm$ 0,002
Grupo 2	1,60 $\pm$ 0,06	41,60 $\pm$ 4,25	0,017 $\pm$ 0,002

^{ab} Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas entre os estádios de maturação

Lt – Comprimento total

Wt – Peso total

IGS – Índice Gonadossomático

Tabela 02: Dados de lipídios e proteínas totais da musculatura branca, vermelha e ventrecha de fêmeas de *Arapaima gigas* ao longo do ciclo reprodutivo. (Média $\pm$ Erro padrão).

FÊMEAS	Músculo Branco	Músculo vermelho	Ventrecha
Lipídios Totais	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)
Imaturo	5,97 $\pm$ 0,50	12,39 $\pm$ 0,58	30,77 $\pm$ 13,50 ^c
Repouso	6,24 $\pm$ 0,38	13,17 $\pm$ 2,23	171,18 $\pm$ 40,77 ^b
Maturação	6,46 $\pm$ 0,60	8,61 $\pm$ 0,57 ^b	26,79 $\pm$ 6,26 ^c
Maduro	8,59 $\pm$ 1,34	82,19 $\pm$ 10,47 ^a	221,87 $\pm$ 21,62 ^a
Regressão	11,58 $\pm$ 2,68	19,33 $\pm$ 4,33	24,99 $\pm$ 2,66 ^c
FÊMEAS	Músculo Branco	Músculo vermelho	Ventrecha
Proteínas Totais	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)
Imaturo	188,33 $\pm$ 1,92 ^a	144,96 $\pm$ 7,94	182,64 $\pm$ 9,38 ^a
Repouso	128,04 $\pm$ 28,87 ^c	93,63 $\pm$ 19,95	92,82 $\pm$ 24,33 ^c
Maturação	156,26 $\pm$ 18,61 ^c	114,60 $\pm$ 11,96	123,07 $\pm$ 15,99 ^c
Maduro	68,52 $\pm$ 6,66 ^b	62,84 $\pm$ 4,30	23,56 $\pm$ 3,95 ^b
Regressão	92,22 $\pm$ 9,10 ^c	88,08 $\pm$ 19,50	77,39 $\pm$ 11,84 ^c

^{abc} Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas entre os estádios de maturação em um mesmo tecido

Tabela 03: Dados de lipídios e proteínas totais do fígado e gônadas de fêmeas de *Arapaima gigas* ao longo do ciclo reprodutivo. (Média $\pm$ Erro padrão).

FÊMEAS	Fígado	Gônada
Lipídios Totais	(mg/g)	(mg/g)
Imaturo	7,05 $\pm$ 0,42 ^a	13,61 $\pm$ 1,94 ^b
Repouso	17,57 $\pm$ 5,33 ^a	17,47 $\pm$ 3,26 ^b
Maturação	7,67 $\pm$ 3,17 ^a	31,76 $\pm$ 9,18 ^b
Maduro	31,59 $\pm$ 3,30 ^b	133,06 $\pm$ 8,70 ^a
Regressão	33,19 $\pm$ 2,97 ^b	36,98 $\pm$ 11,55 ^b
FÊMEAS	Fígado	Gônada
Proteínas Totais	(mg/g)	(mg/g)
Imaturo	79,96 $\pm$ 2,80	50,92 $\pm$ 5,68
Repouso	61,73 $\pm$ 12,34	47,18 $\pm$ 6,24
Maturação	38,23 $\pm$ 11,91	51,40 $\pm$ 4,20
Maduro	40,68 $\pm$ 8,78	62,07 $\pm$ 4,65
Regressão	66,05 $\pm$ 7,21	52,24 $\pm$ 5,84

^{ab} Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas entre os estádios de maturação em um mesmo tecido.

Tabela 04: Dados de lipídios e proteínas totais da musculatura branca, vermelha e ventrecha em machos de *Arapaima gigas* dos grupos 1 e 2. (Média $\pm$ Erro padrão).

MACHOS	Músculo Branco	Músculo vermelho	Ventrecha
Lipídios Totais	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)
Grupo 1	6,35 $\pm$ 0,61	18,80 $\pm$ 4,02	142,16 $\pm$ 24,55
Grupo 2	7,79 $\pm$ 0,60	14,33 $\pm$ 2,58	141,90 $\pm$ 30,78
MACHOS	Músculo Branco	Músculo vermelho	Ventrecha
Proteínas Totais	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)
Grupo 1	121,60 $\pm$ 27,13	90,16 $\pm$ 16,76	96,81 $\pm$ 18,53
Grupo 2	122,09 $\pm$ 15,78	104,73 $\pm$ 10,71	99,07 $\pm$ 13,91

Tabela 05: Dados de lipídios e proteínas totais do fígado e gônadas em machos de *Arapaima gigas* dos grupos 1 e 2. (Média $\pm$ Erro padrão).

MACHOS	Fígado	Gônada
Lipídios Totais	(mg/g)	(mg/g)
Grupo 1	20,09 $\pm$ 4,47	51,80 $\pm$ 13,73
Grupo 2	18,09 $\pm$ 2,93	44,50 $\pm$ 6,53
MACHOS	Fígado	Gônada
Proteínas Totais	(mg/g)	(mg/g)
Grupo 1	51,95 $\pm$ 4,62	43,06 $\pm$ 2,28
Grupo 2	57,16 $\pm$ 5,51	39,54 $\pm$ 3,56

Tabela 06: Dados de lipídios totais, proteínas totais e colesterol plasmático em fêmeas de *Arapaima gigas* ao longo do ciclo reprodutivo. (Média $\pm$ Erro padrão).

FÊMEAS	Lipídios totais (mg/dl)	Proteínas totais (mg/ml)	Colesterol (mg/dl)
Imaturo	1640,56 $\pm$ 179,9 ^a	26,48 $\pm$ 1,84	57,85 $\pm$ 9,64
Repouso	989,3 $\pm$ 255,10	33,12 $\pm$ 6,00	86,44 $\pm$ 22,89
Maturação	1199,26 $\pm$ 193,6 ^{ac}	32,80 $\pm$ 6,38	65,32 $\pm$ 26,13
Maduro	257,71 $\pm$ 23,44 ^b	37,65 $\pm$ 3,06	160,98 $\pm$ 9,05
Regressão	468,08 $\pm$ 45,64	35,10 $\pm$ 2,75	100,73 $\pm$ 17,92

^{abc} Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas entre os estádios de maturação

Tabela 07: Dados de lipídios totais, proteínas totais e colesterol plasmático em machos de *Arapaima gigas* dos grupos 1 e 2. (Média $\pm$ Erro padrão).

MACHOS	Lipídios totais (mg/dl)	Proteínas totais (mg/ml)	Colesterol (mg/dl)
Grupo 1	704,62 $\pm$ 120,63	39,54 $\pm$ 3,56	107,85 $\pm$ 13,29
Grupo 2	623,92 $\pm$ 89,64	43,06 $\pm$ 2,28	123,62 $\pm$ 19,48

Tabela 08 : Perfil dos ácidos graxos da fração neutra dos lipídios hepático em fêmeas de *Arapaima gigas* nos diferentes estádios de maturação gonadal (Média $\pm$ Erro Padrão).

Ácido graxo	Imaturo	Repouso	Maturação	Maduro	Regressão
C14:0	1,40 $\pm$ 0,07	1,47 $\pm$ 0,20	1,59 $\pm$ 0,16	2,08 $\pm$ 0,36	1,18 $\pm$ 0,13
C15:0	1,03 $\pm$ 0,07	0,94 $\pm$ 0,12	1,27 $\pm$ 0,17	1,36 $\pm$ 0,13	0,82 $\pm$ 0,09
plasm16:0	n.d.	n.d.	0,27	n.d.	n.d.
C16:0	23,22 $\pm$ 0,66	24,11 $\pm$ 1,24	23,85 $\pm$ 1,06	23,35 $\pm$ 0,58	24,93 $\pm$ 0,85
C17:0	2,56 $\pm$ 0,04	1,79 $\pm$ 0,21	3,01 $\pm$ 0,22	2,43 $\pm$ 0,20	1,88 $\pm$ 0,14
plasm18:0	n.d.	n.d.	0,63	n.d.	n.d.
C18:0	12,69 $\pm$ 0,35	12,33 $\pm$ 2,19	14,23 $\pm$ 1,28	14,22 $\pm$ 2,30	18,10 $\pm$ 2,25
C20:0	0,32 $\pm$ 0,01	0,41 $\pm$ 0,08	0,44 $\pm$ 0,06	0,40 $\pm$ 0,05	0,53 $\pm$ 0,11
C21:0	n.d.	0,86	n.d.	n.d.	n.d.
C22:0	0,24 $\pm$ 0,03	n.d.	0,24 $\pm$ 0,02	0,32	0,30
Σ saturado	41,47 $\pm$ 0,25	41,89 $\pm$ 3,19	45,55 $\pm$ 0,83	44,14 $\pm$ 2,34	47,74 $\pm$ 3,31
C14:1	0,58 $\pm$ 0,02	0,53 $\pm$ 0,12	0,96 $\pm$ 0,20	1,11 $\pm$ 0,13	0,53 $\pm$ 0,08
C15:1	0,44 $\pm$ 0,05	0,37 $\pm$ 0,08	0,58 $\pm$ 0,09	0,61 $\pm$ 0,04	0,36 $\pm$ 0,03
C16:1	2,51 $\pm$ 0,77	3,89 $\pm$ 0,30	4,21 $\pm$ 0,44	5,83 $\pm$ 0,73	3,79 $\pm$ 0,38
C17:1	0,83 $\pm$ 0,02	0,72 $\pm$ 0,11	0,79 $\pm$ 0,13	0,77 $\pm$ 0,11	0,63 $\pm$ 0,10
C18:1n11	20,93 $\pm$ 0,55	23,13 $\pm$ 1,65	15,96 $\pm$ 0,93	16,97 $\pm$ 1,36	26,22 $\pm$ 0,69
C18:1n9	5,26 $\pm$ 0,26	5,37 $\pm$ 0,88	6,73 $\pm$ 0,36	7,59 $\pm$ 0,61	4,38 $\pm$ 0,22
C20:1n11	0,35 $\pm$ 0,03	0,33 $\pm$ 0,06	0,71 $\pm$ 0,06	1,13 $\pm$ 0,27	0,33 $\pm$ 0,05
C20:1n9	1,30 $\pm$ 0,11	1,53 $\pm$ 0,24	1,01 $\pm$ 0,10	1,65 $\pm$ 0,18	1,25 $\pm$ 0,25
Σ mono	32,19 $\pm$ 0,15	35,87 $\pm$ 0,58	30,96 $\pm$ 0,42^a	35,65 $\pm$ 2,89	37,50 $\pm$ 0,71^b
C18:2n6	7,75 $\pm$ 0,31	8,05 $\pm$ 0,77	5,98 $\pm$ 0,34	5,86 $\pm$ 0,55	6,02 $\pm$ 0,88
C18:3n6	0,21 $\pm$ 0,01	0,32 $\pm$ 0,05	0,50 $\pm$ 0,04	n.d.	0,32
C18:4n6	0,36 $\pm$ 0,02	0,32 $\pm$ 0,05	0,57 $\pm$ 0,04	0,81 $\pm$ 0,24	0,40 $\pm$ 0,06
C20:2n6	1,26 $\pm$ 0,07	1,14 $\pm$ 0,19	1,27 $\pm$ 0,12	1,06 $\pm$ 0,21	0,95 $\pm$ 0,22
C20:3n6	1,20 $\pm$ 0,04	0,82 $\pm$ 0,13	1,15 $\pm$ 0,10	0,84 $\pm$ 0,12	0,56 $\pm$ 0,10
C20:4n6	3,36 $\pm$ 0,08	2,99 $\pm$ 0,71	4,54 $\pm$ 0,41	3,79 $\pm$ 0,63	1,98 $\pm$ 0,40

C22:2n6	n.d.	n.d.	0,22 ± 0,01	1,80	0,23
C22:4n6	1,42 ± 0,04	0,99 ± 0,24	1,42 ± 0,11	1,24 ± 0,20	0,57 ± 0,13
C22:5n6	1,00 ± 0,08	1,06 ± 0,37	0,82 ± 0,09	0,52 ± 0,09	0,50 ± 0,11
Σ PUFA_n6	16,55 ± 0,14	15,69 ± 2,16	16,49 ± 0,77	15,91 ± 1,47	11,53 ± 1,73
C18:3n3	3,11 ± 0,16	3,54 ± 0,72	2,17 ± 0,24	1,64 ± 0,38	1,92 ± 0,47
C18:4n3	n.d.	n.d.	1,60	n.d.	0,23
C20:3n3	0,78 ± 0,01	0,98 ± 0,17	0,53 ± 0,05	0,76 ± 0,22	0,69 ± 0,13
C20:4n3	0,45 ± 0,03	0,32 ± 0,05	0,36 ± 0,07	n.d.	0,29
C20:5n3	0,68 ± 0,07	0,62 ± 0,13	0,96 ± 0,31	0,67 ± 0,39	0,40 ± 0,08
C22:4n3	n.d.	n.d.	n.d.	1,32	n.d.
C22:5n3	1,08 ± 0,08	0,80 ± 0,13	0,77 ± 0,12	0,46 ± 0,05	0,55 ± 0,13
C22:6n3	2,58 ± 0,29	1,50 ± 0,48	2,03 ± 0,42	1,19 ± 0,20	0,59 ± 0,21
Σ PUFA_n3	8,68 ± 0,40^a	7,76 ± 1,63	8,42 ± 0,69	6,04 ± 0,74	4,66 ± 1,03^b
C16:2	1,26 ± 0,06	0,96 ± 0,12	1,50 ± 0,20	1,42 ± 0,05	1,02 ± 0,06

^{ab} Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas entre os estádios de maturação

Tabela 09: Perfil dos ácidos graxos da fração neutra dos lipídios hepático em machos de *Arapaima gigas* do grupo 1 (Poucos espermatozóides no lúmen) e grupo 2 (Muitos espermatozóides no lúmen) (Média ± Erro Padrão).

Ácido Graxo	Grupo 1	Grupo 2
C14:0	1,26 ± 0,17	1,56 ± 0,14
C15:0	0,77 ± 0,10	0,99 ± 0,07
plasm16:0	0,33 ± 0,04	n.d.
C16:0	19,52 ± 1,83	22,42 ± 1,29
C17:0	1,75 ± 0,16	2,14 ± 0,14
plasm18:0	0,39 ± 0,17	0,35 ± 0,05
C18:0	13,82 ± 1,79	14,89 ± 0,91
C20:0	0,41 ± 0,05	0,43 ± 0,04
C22:0	0,27 ± 0,02	0,35 ± 0,03
C24:0	0,36	0,35 ± 0,09

Σ saturado	38,89 ± 1,15	43,47 ± 1,78
C14:1	0,58 ± 0,06	0,74 ± 0,08
C15:1	0,37 ± 0,04	0,45 ± 0,03
C16:1	3,21 ± 0,45	4,08 ± 0,33
C17:1	0,69 ± 0,12	0,67 ± 0,06
C18:1n11	20,98 ± 1,92	20,87 ± 1,32
C18:1n9	4,75 ± 0,39	5,74 ± 0,29
C20:1n11	0,51 ± 0,10	0,65 ± 0,08
C20:1n9	1,53 ± 0,16	1,42 ± 0,14
C24:1	0,29	0,31
Σ mono	32,92 ± 2,38	34,93 ± 1,15
C18:2n6c	7,87 ± 0,67	6,47 ± 0,51
C18:3n6	0,25 ± 0,02	0,34 ± 0,04
C18:4n6	0,40 ± 0,06	0,65 ± 0,18
C20:2n6	1,42 ± 0,10	1,18 ± 0,09
C20:3n6	1,05 ± 0,08	0,91 ± 0,09
C20:4n6	6,31 ± 1,99	4,22 ± 0,67
C22:2n6	0,33 ± 0,01	0,45 ± 0,10
C22:4n6	1,64 ± 0,33	1,25 ± 0,18
C22:5n6	1,40 ± 0,34	0,89 ± 0,18
Σ PUFA_n6	20,67 ± 2,20	16,37 ± 1,27
C18:3n3	2,95 ± 0,33	2,23 ± 0,25
C20:3n3	0,75 ± 0,06	0,55 ± 0,04
C20:4n3	0,27 ± 0,02	0,35 ± 0,06
C20:5n3	0,69 ± 0,12	0,54 ± 0,05
C22:4n3	n.d.	0,65 ± 0,22
C22:5n3	0,84 ± 0,08	0,69 ± 0,10
C22:6n3	2,86 ± 0,81	1,82 ± 0,50
Σ PUFA_n3	8,36 ± 0,80^a	6,83 ± 0,74^b
C16:2	0,95 ± 0,11	1,17 ± 0,06

^{ab} Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas entre os estádios de maturação

Tabela 10: Perfil dos ácidos graxos da fração polar dos lipídios hepático em fêmeas de *Arapaima gigas* nos diferentes estádios de maturação gonadal (Média $\pm$ Erro Padrão).

Ácido graxo	Imaturo	Repouso	Maturação	Maduro	Regressão
C14:0	0,30	0,63 $\pm$ 0,20	0,33 $\pm$ 0,06	0,41 $\pm$ 0,06	0,31 $\pm$ 0,09
C15:0	0,26	0,39 $\pm$ 0,10	0,38 $\pm$ 0,06	0,33 $\pm$ 0,06	0,27 $\pm$ 0,01
plasm16:0	0,37	0,48 $\pm$ 0,06	0,32 $\pm$ 0,04	0,31 $\pm$ 0,02	0,66 $\pm$ 0,11
C16:0	5,34 $\pm$ 0,69	9,32 $\pm$ 1,34	8,95 $\pm$ 0,97	10,27 $\pm$ 1,32	8,29 $\pm$ 0,60
C17:0	1,03 $\pm$ 0,12	1,22 $\pm$ 0,11	1,94 $\pm$ 0,25	1,98 $\pm$ 0,27	1,51 $\pm$ 0,15
plasm18:0	1,12 $\pm$ 0,53	1,22 $\pm$ 0,31	0,76 $\pm$ 0,14	0,66 $\pm$ 0,11	1,65 $\pm$ 0,19
C18:0	24,37 $\pm$ 0,78	23,64 $\pm$ 3,00	24,74 $\pm$ 1,24	28,84 $\pm$ 2,15	31,15 $\pm$ 1,91
C20:0	0,35 $\pm$ 0,01	0,45 $\pm$ 0,04	0,37 $\pm$ 0,04	0,47 $\pm$ 0,07	0,56 $\pm$ 0,09
C21:0	n.d.	n.d.	0,22	n.d.	n.d.
C22:0	0,34 $\pm$ 0,02	0,39 $\pm$ 0,03	0,41 $\pm$ 0,07	0,94 $\pm$ 0,15	0,42 $\pm$ 0,06
C23:0	0,20	0,31	0,39 $\pm$ 0,11	0,75 $\pm$ 0,18	0,35 $\pm$ 0,04
C24:0	0,26 $\pm$ 0,02	0,36 $\pm$ 0,03	0,42 $\pm$ 0,09	1,09 $\pm$ 0,30	0,32 $\pm$ 0,03
Σ saturado	32,82$\pm$1,50^a	37,60 $\pm$ 3,35	39,22 $\pm$ 4,29	46,05 $\pm$ 4,00	45,49$\pm$ 2,00^b
C14:1	n.d.	0,38	0,24	0,22	n.d.
C15:1	0,31	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
C16:1	1,01 $\pm$ 0,13	1,52 $\pm$ 0,41	1,29 $\pm$ 0,20	1,77 $\pm$ 0,28	0,84 $\pm$ 0,08
C17:1	1,08 $\pm$ 0,33	0,57 $\pm$ 0,10	0,50 $\pm$ 0,12	0,31 $\pm$ 0,01	0,29 $\pm$ 0,04
C18:1n11	6,61 $\pm$ 0,25	10,99 $\pm$ 2,05	7,43 $\pm$ 0,96	8,90 $\pm$ 0,60	8,71 $\pm$ 0,75
C18:1n9	2,20 $\pm$ 0,21	2,91 $\pm$ 0,34	3,36 $\pm$ 0,30	3,54 $\pm$ 0,30	2,26 $\pm$ 0,08
C20:1n11	n.d.	0,62	0,32	0,31	n.d.
C20:1n9	0,34 $\pm$ 0,06	0,93 $\pm$ 0,15	0,61 $\pm$ 0,18	0,75 $\pm$ 0,07	0,66 $\pm$ 0,09
C24:1	n.d.	0,33 $\pm$ 0,03	0,38 $\pm$ 0,06	0,39 $\pm$ 0,07	0,33
Σ mono	10,99 $\pm$ 1,09	16,91 $\pm$ 4,79	14,14 $\pm$ 2,37	16,19 $\pm$ 0,95	13,08 $\pm$ 0,85
C18:2n6c	4,19 $\pm$ 0,08	5,51 $\pm$ 0,85	4,48 $\pm$ 0,34	4,57 $\pm$ 0,10	4,41 $\pm$ 0,28
C18:3n6	n.d.	0,29	n.d.	n.d.	n.d.
C18:4n6	0,86 $\pm$ 0,05	0,71 $\pm$ 0,07	0,92 $\pm$ 0,10	1,82 $\pm$ 0,14	1,17 $\pm$ 0,15
C20:2n6	0,90 $\pm$ 0,05	1,05 $\pm$ 0,08	1,07 $\pm$ 0,16	1,16 $\pm$ 0,05	0,93 $\pm$ 0,09

C20:3n6	1,68 ± 0,09	1,45 ± 0,12	1,72 ± 0,30	1,47 ± 0,05	1,54 ± 0,15
C20:4n6	22,67 ± 0,69	16,72 ± 2,12	19,44 ± 1,80	11,45 ± 1,81	16,89 ± 1,37
C22:2n6	n.d.	0,25 ± 0,02	0,23	0,48 ± 0,10	0,54 ± 0,31
C22:4n6	5,09 ± 0,27	3,20 ± 0,26	3,12 ± 0,22	3,32 ± 0,41	2,98 ± 0,21
C22:5n6	5,02 ± 0,20	3,12 ± 0,31	4,13 ± 0,40	3,07 ± 0,56	3,25 ± 0,37
Σ PUFA_{n6}	40,41 ± 1,02^a	31,92 ± 3,01^b	35,11 ± 3,98^{ab}	27,33 ± 2,63^b	31,71 ± 1,53^b
C18:3n3	1,22 ± 0,08	1,96 ± 0,54	1,04 ± 0,21	0,70 ± 0,15	0,94 ± 0,09
C20:3n3	0,43 ± 0,04	0,58 ± 0,10	0,31 ± 0,04	0,40 ± 0,07	0,41 ± 0,07
C20:4n3	0,33	0,29 ± 0,07	0,52	n.d.	0,30 ± 0,03
C20:5n3	1,83 ± 0,24	1,79 ± 0,26	1,58 ± 0,14	0,79 ± 0,22	1,64 ± 0,22
C22:5n3	1,42 ± 0,14	1,18 ± 0,10	1,12 ± 0,05	1,18 ± 0,17	0,96 ± 0,10
C22:6n3	10,56 ± 0,47	7,55 ± 0,75	8,82 ± 1,11	7,78 ± 1,73	6,92 ± 0,83
ΣPUFA_{n3}	15,57 ± 0,83	13,17 ± 1,31	13,39 ± 1,81	10,85 ± 2,23	11,18 ± 1,12
C16:2	0,32 ± 0,03	0,41 ± 0,06	0,58 ± 0,08	0,69 ± 0,09	0,42 ± 0,04

^{ab} Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas entre os estádios de maturação

Tabela 11: Perfil dos ácidos graxos da fração polar dos lipídios hepático em machos de *Arapaima gigas* do grupo 1 (Poucos espermatozóides no lúmen) e grupo 2 (Muitos espermatozóides no lúmen) (Média ± Erro Padrão).

Ácido Graxo	Grupo 1	Grupo 2
C14:0	0,55 ± 0,17	0,50 ± 0,10
C15:0	0,42 ± 0,09	0,44 ± 0,07
plasm16:0	0,41 ± 0,06	0,43 ± 0,04
C16:0	11,69 ± 2,01	10,01 ± 1,01
C17:0	1,41 ± 0,14	1,68 ± 0,17
plasm18:0	1,16 ± 0,20	1,04 ± 0,12
C18:0	23,53 ± 2,10	28,75 ± 2,45
C20:0	0,41 ± 0,02	0,56 ± 0,06
C22:0	0,47 ± 0,06	0,65 ± 0,09
C23:0	0,32 ± 0,05	0,50 ± 0,05

C24:0	0,39 ± 0,04	0,66 ± 0,10
Σ saturado	40,76 ± 2,54	45,20 ± 4,09
C14:1	0,61	0,44 ± 0,07
C16:1	1,72 ± 0,35	1,39 ± 0,24
C17:1	0,75 ± 0,12	0,39 ± 0,08
C18:1n11	12,28 ± 1,62	9,92 ± 1,23
C18:1n9	3,29 ± 0,48	3,08 ± 0,24
C20:1n11	0,54	0,57 ± 0,08
C20:1n9	0,69 ± 0,13	0,74 ± 0,13
C24:1	0,32 ± 0,04	0,42 ± 0,05
Σ mono	20,21 ± 3,86	16,95 ± 2,21
C18:2n6c	5,75 ± 0,47	4,01 ± 0,33
C18:3n6	0,76	n.d.
C18:4n6	0,65 ± 0,06	1,10 ± 0,17
C20:2n6	1,19 ± 0,10	0,86 ± 0,05
C20:3n6	1,38 ± 0,13	1,20 ± 0,14
C20:4n6	13,94 ± 1,90	14,20 ± 2,00
C22:2n6	0,42 ± 0,14	0,37 ± 0,06
C22:4n6	2,85 ± 0,31	2,57 ± 0,33
C22:5n6	2,94 ± 0,49	3,32 ± 0,56
Σ PUFA_{n6}	29,88 ± 3,59	27,63 ± 3,50
C18:3n3	1,70 ± 0,26	0,91 ± 0,13
C18:4n3	0,92	n.d.
C20:3n3	0,57 ± 0,06	0,30 ± 0,03
C20:4n3	0,49 ± 0,15	0,39 ± 0,13
C20:5n3	1,26 ± 0,15	1,37 ± 0,19
C22:4n3	0,68	0,41
C22:5n3	1,02 ± 0,10	1,06 ± 0,15
C22:6n3	7,31 ± 1,24	8,24 ± 1,52
Σ PUFA_{n3}	13,94 ± 1,71	12,68 ± 2,17
C16:2	0,56 ± 0,11	0,66 ± 0,08

^{ab} Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas entre os estádios de maturação

Tabela 12: Perfil dos ácidos graxos da fração neutra dos lipídios gonadais em fêmeas de *Arapaima gigas* nos diferentes estádios de maturação gonadal (Média $\pm$ Erro Padrão).

Ácido graxo	Imaturo	Repouso	Maturação	Maduro	Regressão
C14:0	0,83 $\pm$ 0,02	0,96 $\pm$ 0,18	1,33 $\pm$ 0,32	1,75 $\pm$ 0,19	0,97 $\pm$ 0,48
C15:0	0,52 $\pm$ 0,05	0,59 $\pm$ 0,08	1,00 $\pm$ 0,22	1,26 $\pm$ 0,15	0,59 $\pm$ 0,32
plasm16:0	n.d.	1,69	2,29	0,61	0,56 $\pm$ 2,37
C16:0	11,48 $\pm$ 0,48	14,64 $\pm$ 2,63	16,28 $\pm$ 2,03	20,34 $\pm$ 1,64	18,63 $\pm$ 0,80
C17:0	1,15 $\pm$ 0,23	1,38 $\pm$ 0,19	2,15 $\pm$ 0,24	2,04 $\pm$ 0,19	1,24 $\pm$ 0,27
plasm18:0	n.d.	1,51 $\pm$ 1,22	4,58	n.d.	0,79
C18:0	9,36 $\pm$ 1,47	13,84 $\pm$ 1,01	12,80 $\pm$ 0,83	10,68 $\pm$ 0,17	18,97 $\pm$ 2,86
C20:0	0,58 $\pm$ 0,17	0,67 $\pm$ 0,08	0,46 $\pm$ 0,05	0,38 $\pm$ 0,05	0,77 $\pm$ 0,13
C22:0	0,45	0,53 $\pm$ 0,05	0,54 $\pm$ 0,17	0,42	0,31 $\pm$ 0,04
C23:0	n.d.	0,32	0,43	n.d.	n.d.
C24:0	n.d.	0,37 $\pm$ 0,06	0,60	0,38 $\pm$ 0,11	0,31
Σ saturado	24,38 $\pm$ 2,52^a	36,49 $\pm$ 2,86	42,46 $\pm$ 2,92	37,86 $\pm$ 2,10	43,14 $\pm$ 3,65^b
C14:1	0,24 $\pm$ 0,01	0,43 $\pm$ 0,01	0,88 $\pm$ 0,19	0,95 $\pm$ 0,10	0,71 $\pm$ 0,27
C15:1	n.d.	0,28 $\pm$ 0,02	0,46 $\pm$ 0,04	0,50 $\pm$ 0,07	n.d.
C16:1	2,47 $\pm$ 0,05	2,42 $\pm$ 0,54	3,91 $\pm$ 0,85	5,29 $\pm$ 0,52	2,33 $\pm$ 0,15
C17:1	0,54	0,42 $\pm$ 0,08	0,72 $\pm$ 0,20	0,65 $\pm$ 0,05	0,65
C18:1n11	13,95 $\pm$ 1,40	17,68 $\pm$ 2,89	11,14 $\pm$ 1,31	14,84 $\pm$ 0,43	21,62 $\pm$ 2,62
C18:1n9	2,87 $\pm$ 0,46	4,06 $\pm$ 0,37	5,67 $\pm$ 0,46	6,76 $\pm$ 0,65	4,01 $\pm$ 0,96
C20:1n11	0,56 $\pm$ 0,19	0,86 $\pm$ 0,31	0,54 $\pm$ 0,15	0,56 $\pm$ 0,09	0,41 $\pm$ 0,03
C20:1n9	0,93 $\pm$ 0,20	1,34 $\pm$ 0,23	0,75 $\pm$ 0,12	0,97 $\pm$ 0,11	0,76 $\pm$ 0,18
C24:1	n.d.	0,50	0,29	n.d.	n.d.
Σ mono	21,57 $\pm$ 2,42	27,99 $\pm$ 3,47	24,35 $\pm$ 2,75	30,52 $\pm$ 0,78	30,49 $\pm$ 2,25
C18:2n6	6,28 $\pm$ 0,53	7,41 $\pm$ 1,20	6,18 $\pm$ 0,76	6,99 $\pm$ 0,11	6,57 $\pm$ 0,92
C18:3n6	4,92 $\pm$ 1,38	0,31	1,78 $\pm$ 1,14	0,24 $\pm$ 0,01	0,79 $\pm$ 0,52
C18:4n6	1,98 $\pm$ 0,32	0,89 $\pm$ 0,41	1,27 $\pm$ 0,52	0,98 $\pm$ 0,70	0,52 $\pm$ 0,10
C20:2n6	0,89 $\pm$ 0,12	1,62 $\pm$ 0,33	1,08 $\pm$ 0,11	1,62 $\pm$ 0,12	1,20 $\pm$ 0,32

C20:3n6	3,43 ± 2,65	1,24 ± 0,27	1,00 ± 0,12	0,93 ± 0,10	0,94 ± 0,21
C20:4n6	4,31 ± 0,76	8,88 ± 3,15	8,65 ± 2,73	4,87 ± 0,51	5,34 ± 1,56
C22:2n6	5,33 ± 1,89	0,37 ± 0,05	3,44 ± 2,93	0,24 ± 0,02	0,69 ± 0,45
C22:4n6	1,32 ± 0,37	3,07 ± 1,20	2,37 ± 0,83	2,35 ± 0,45	1,73 ± 0,60
C22:5n6	1,37 ± 0,56	3,26 ± 1,25	1,85 ± 0,15	1,83 ± 0,37	1,95 ± 0,77
Σ PUFA_{n6}	29,84 ± 2,55	27,05 ± 5,24	27,61 ± 3,08	20,05 ± 1,94	19,73 ± 3,54
C18:3n3	3,24 ± 0,15	3,24 ± 0,98	3,31 ± 0,80	2,72 ± 0,28	2,29 ± 0,68
C18:4n3	8,89 ± 0,86	n.d.	9,13	n.d.	1,85
C20:3n3	0,75 ± 0,04	0,78 ± 0,15	0,50 ± 0,08	0,96 ± 0,07	0,60 ± 0,09
C20:4n3	n.d.	0,41 ± 0,06	0,41 ± 0,05	0,32 ± 0,01	0,26 ± 0,01
C20:5n3	7,03 ± 2,05	1,03 ± 0,28	2,89 ± 1,77	0,83 ± 0,11	1,02 ± 0,20
C22:5n3	4,00 ± 1,21	1,40 ± 0,34	1,09 ± 0,09	1,81 ± 0,33	0,91 ± 0,19
C22:6n3	3,66 ± 1,75	5,50 ± 1,15	4,14 ± 0,48	5,83 ± 1,13	4,69 ± 1,35
Σ PUFA_{n3}	27,56 ± 4,48	12,36 ± 1,97	21,47 ± 3,31	12,47 ± 1,07	11,61 ± 1,70

^{ab} Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas entre os estádios de maturação

Tabela 13: Perfil dos ácidos graxos da fração neutra dos lipídios gonadais em machos de *Arapaima gigas* do grupo 1 (Poucos espermatozóides no lúmen) e grupo 2 (Muitos espermatozóides no lúmen) (Média ± Erro Padrão).

Ácido Graxo	Grupo 1	Grupo 2
C14:0	0,70 ± 0,13	1,39 ± 0,25
C15:0	0,47 ± 0,08	0,69 ± 0,09
plasm16:0	1,97 ± 0,18	1,75 ± 0,04
C16:0	11,98 ± 1,29	14,52 ± 1,25
C17:0	1,14 ± 0,12	1,37 ± 0,13
plasm18:0	3,27 ± 0,70	3,52 ± 0,85
C18:0	13,44 ± 0,78	13,47 ± 0,95
C20:0	0,71 ± 0,11	0,76 ± 0,08
C21:0	n.d.	0,33 ± 0,04
C22:0	0,59 ± 0,09	0,60 ± 0,07

C23:0	0,41 ± 0,05	0,38 ± 0,08
C24:0	0,50 ± 0,11	0,53 ± 0,10
Σ saturado	35,18 ± 1,40	39,33 ± 2,27
C14:1	0,38 ± 0,04	0,56 ± 0,07
C15:1	0,27 ± 0,01	0,38 ± 0,05
C16:1	2,08 ± 0,38	2,91 ± 0,40
C17:1	0,51 ± 0,07	0,53 ± 0,05
C18:1n11	15,14 ± 2,47	17,24 ± 1,63
C18:1n9	3,59 ± 0,31	3,76 ± 0,23
C20:1n11	0,65 ± 0,14	1,00 ± 0,15
C20:1n9	1,50 ± 0,41	1,27 ± 0,19
C24:1	0,56 ± 0,10	0,49 ± 0,12
Σ mono	24,69 ± 6,02	28,14 ± 4,61
C18:2n6c	6,37 ± 0,95	6,38 ± 0,51
C18:3n6	1,07 ± 0,73	0,45 ± 0,16
C18:4n6	0,59 ± 0,73	0,78 ± 0,10
C20:2n6	1,45 ± 0,10	1,35 ± 0,08
C20:3n6	1,46 ± 0,11	1,35 ± 0,11
C20:4n6	14,47 ± 3,14	9,67 ± 2,19
C22:2n6	0,58 ± 0,14	0,42 ± 0,09
C22:4n6	5,85 ± 1,31	5,53 ± 1,10
C22:5n6	2,73 ± 0,56	2,29 ± 0,27
Σ PUFA_{n6}	34,58 ± 7,04	28,23 ± 6,28
C18:3n3	2,41 ± 0,06	2,15 ± 0,30
C18:4n3	1,53 ± 0,98	0,79 ± 0,50
C20:3n3	0,61 ± 0,06	0,95 ± 0,32
C20:4n3	0,42 ± 0,06	0,40 ± 0,05
C20:5n3	0,94 ± 0,19	0,94 ± 0,15
C22:4n3	0,85	n.d.
C22:5n3	1,25 ± 0,10	1,54 ± 0,19
C22:6n3	4,15 ± 0,48	4,14 ± 0,42
Σ PUFA_{n3}	12,15 ± 1,89	10,92 ± 1,53

Tabela 14: Perfil dos ácidos graxos da fração polar dos lipídios gonadais em fêmeas de *Arapaima gigas* nos diferentes estádios de maturação gonadal (Média $\pm$ Erro Padrão).

Ácido graxo	Imaturo	Repouso	Maturação	Maduro	Regressão
C14:0	0,54 $\pm$ 0,15	0,47 $\pm$ 0,10	0,70 $\pm$ 0,12	0,34 $\pm$ 0,04	0,38 $\pm$ 0,05
C15:0	0,45 $\pm$ 0,18	0,35 $\pm$ 0,04	0,50 $\pm$ 0,07	0,33 $\pm$ 0,04	0,31 $\pm$ 0,03
plasm16:0	2,21 $\pm$ 0,27	2,41 $\pm$ 0,40	2,46 $\pm$ 0,09	1,49 $\pm$ 0,23	3,00 $\pm$ 0,28
C16:0	9,32 $\pm$ 1,06	12,48 $\pm$ 1,16	10,83 $\pm$ 0,92	9,11 $\pm$ 0,59	10,92 $\pm$ 0,55
C17:0	0,89 $\pm$ 0,10	1,03 $\pm$ 0,06	1,55 $\pm$ 0,15	1,33 $\pm$ 0,12	0,99 $\pm$ 0,09
plasm18:0	4,31 $\pm$ 0,12	4,85 $\pm$ 0,43	2,83 $\pm$ 0,19	0,79 $\pm$ 0,12	3,54 $\pm$ 0,40
C18:0	21,09 $\pm$ 1,37	16,91 $\pm$ 1,61	15,47 $\pm$ 0,97	17,96 $\pm$ 1,27	15,45 $\pm$ 1,07
C20:0	0,31	0,42 $\pm$ 0,07	0,40 $\pm$ 0,10	0,33 $\pm$ 0,02	0,32 $\pm$ 0,03
Σ saturado	39,46 $\pm$ 2,39	39,65 $\pm$ 2,69	37,42 $\pm$ 0,81	32,97 $\pm$ 1,70	35,24 $\pm$ 1,52
C21:0	n.d.	n.d.	1,89	n.d.	n.d.
C22:0	0,34 $\pm$ 0,03	0,42 $\pm$ 0,08	0,44 $\pm$ 0,05	0,39	0,33 $\pm$ 0,02
C23:0	n.d.	n.d.	n.d.	0,38	n.d.
C24:0	n.d.	0,32	0,36	0,53	n.d.
C14:1	n.d.	n.d.	0,66	n.d.	n.d.
C15:1	1,46	n.d.	0,45	n.d.	n.d.
C16:1	1,07 $\pm$ 0,16	1,45 $\pm$ 0,32	2,01 $\pm$ 0,32	1,40 $\pm$ 0,19	1,38 $\pm$ 0,21
C17:1	2,40	0,55	0,85	n.d.	n.d.
C18:1n11	7,87 $\pm$ 0,17	11,24 $\pm$ 2,33	9,56 $\pm$ 1,64	7,94 $\pm$ 0,38	10,72 $\pm$ 0,85
C18:1n9	4,03 $\pm$ 0,54	4,21 $\pm$ 0,28	4,25 $\pm$ 0,29	3,33 $\pm$ 0,25	3,97 $\pm$ 0,32
C20:1n11	n.d.	0,86	2,44	n.d.	n.d.
C20:1n9	0,37 $\pm$ 0,01	0,92 $\pm$ 0,30	0,55 $\pm$ 0,11	0,55 $\pm$ 0,03	0,59 $\pm$ 0,07
Σ mono	17,19 $\pm$ 1,93	19,24 $\pm$ 3,00	20,76 $\pm$ 2,95	13,21 $\pm$ 0,44	16,66 $\pm$ 1,27
C18:2n6c	3,25 $\pm$ 0,23	5,16 $\pm$ 1,29	4,34 $\pm$ 0,87	4,44 $\pm$ 0,31	4,58 $\pm$ 0,30
C18:4n6	3,40 $\pm$ 0,40	1,10 $\pm$ 0,34	2,19 $\pm$ 0,45	0,97 $\pm$ 0,11	1,32 $\pm$ 0,69
C20:2n6	1,13 $\pm$ 0,07	1,55 $\pm$ 0,09	1,15 $\pm$ 0,09	1,24 $\pm$ 0,09	1,50 $\pm$ 0,21
C20:3n6	1,40 $\pm$ 0,10	1,38 $\pm$ 0,10	1,64 $\pm$ 0,25	1,59 $\pm$ 0,05	2,09 $\pm$ 0,66
C20:4n6	21,13 $\pm$ 0,14	17,50 $\pm$ 3,28	16,43 $\pm$ 1,90	15,80 $\pm$ 0,65	17,57 $\pm$ 1,44
C22:2n6	1,68 $\pm$ 1,44	0,34	0,46 $\pm$ 0,04	0,48 $\pm$ 0,21	5,83

C22:4n6	4,61 ± 0,44	4,13 ± 0,69	5,79 ± 0,69	6,49 ± 0,74	5,76 ± 0,74
C22:5n6	5,44 ± 0,55	4,52 ± 0,77	5,89 ± 0,86	4,80 ± 0,44	5,39 ± 0,51
Σ PUFAn6	42,03 ± 1,43	35,67 ± 3,39	37,89 ± 2,96	35,82 ± 1,32	44,02 ± 1,63
C18:3n3	0,36 ± 0,12	2,10 ± 1,42	1,19 ± 0,46	0,81 ± 0,08	0,82 ± 0,18
C18:4n3	2,91	0,48	n.d.	n.d.	2,02 ± 1,64
C20:3n3	0,32 ± 0,01	0,61 ± 0,18	0,41 ± 0,08	0,43 ± 0,02	0,46 ± 0,07
C20:4n3	n.d.	0,67	0,45	n.d.	n.d.
C20:5n3	2,10 ± 1,58	0,78 ± 0,17	1,18 ± 0,24	1,37 ± 0,06	1,45 ± 0,98
C22:5n3	0,55 ± 0,03	0,92 ± 0,30	1,08	2,53 ± 0,28	0,89 ± 0,15
C22:6n3	3,91 ± 0,18	4,38 ± 0,65	7,05	13,65 ± 0,73	5,81 ± 0,64
Σ PUFAn3	10,15 ± 2,08	9,94 ± 2,47	11,36 ± 0,93	18,78± 0,94^a	11,45 ± 1,68

^{ab} Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas entre os estádios de maturação

Tabela 15: Perfil dos ácidos graxos da fração polar dos lipídios gonadais em machos de *Arapaima gigas* do grupo 1 (Poucos espermatozóides no lúmen) e grupo 2 (Muitos espermatozóides no lúmen) (Média ± Erro Padrão).

Ácido Graxo	Grupo 1	Grupo 2
C14:0	1,12 ± 0,20	0,65 ± 0,10
C15:0	0,65 ± 0,12	0,43 ± 0,05
plasm16:0	1,52 ± 0,09	1,73 ± 0,46
C16:0	13,49 ± 2,16	10,56 ± 1,18
C17:0	1,20 ± 0,16	1,21 ± 0,09
plasm18:0	4,22 ± 0,23	2,56 ± 0,39
C18:0	14,53 ± 1,23	15,94 ± 0,86
C20:0	0,61 ± 0,07	0,59 ± 0,08
C22:0	0,62 ± 0,08	0,53 ± 0,03
C23:0	0,44	0,34 ± 0,02
C24:0	0,66 ± 0,08	0,52 ± 0,03
Σ saturado	39,05 ± 1,73	35,04 ± 1,38

C14:1	0,56 ± 0,10	0,39 ± 0,04
C15:1	0,30 ± 0,01	0,59 ± 0,09
C16:1	2,47 ± 0,53	1,96 ± 0,26
C17:1	0,65 ± 0,10	0,76 ± 0,14
C18:1n11	14,97 ± 2,46	13,07 ± 1,71
C18:1n9	3,37 ± 0,39	3,58 ± 0,17
C20:1n11	0,81 ± 0,16	1,05 ± 0,12
C20:1n9	1,18 ± 0,19	1,03 ± 0,17
C24:1	0,69 ± 0,02	n.d.
Σ mono	25,00 ± 3,16	22,43 ± 2,37
C18:2n6c	6,90 ± 1,06	4,99 ± 0,70
C18:3n6	0,53 ± 0,12	1,71 ± 0,16
C18:4n6	0,90 ± 0,31	1,04 ± 0,16
C20:2n6	1,46 ± 0,25	1,29 ± 0,08
C20:3n6	1,32 ± 0,14	1,47 ± 0,10
C20:4n6	12,51 ± 2,93	16,65 ± 2,21
C22:2n6	0,39 ± 0,04	0,55 ± 0,10
C22:4n6	5,09 ± 1,65	7,82 ± 1,15
C22:5n6	2,44 ± 0,43	3,08 ± 0,35
Σ PUFA_{n6}	31,54 ± 3,99	38,59 ± 3,10
C18:3n3	3,07 ± 0,78	1,62 ± 0,36
C18:4n3	n.d.	1,38 ± 0,20
C20:3n3	0,69 ± 0,09	0,49 ± 0,05
C20:4n3	0,54 ± 0,02	0,38 ± 0,02
C20:5n3	1,46 ± 0,59	1,15 ± 0,15
C22:5n3	1,21 ± 0,23	1,49 ± 0,16
C22:6n3	4,05 ± 0,79	4,29 ± 0,46
Σ PUFA_{n3}	11,01 ± 1,50	10,78 ± 0,80

Tabela 16: Perfil dos ácidos graxos da musculatura branca em fêmeas de *Arapaima gigas* nos diferentes estádios do ciclo reprodutivo (Média $\pm$ Erro Padrão).

Ácido graxo	Imaturo	Repouso	Maturação	Maduro	Regressão
C14:0	0,63 $\pm$ 0,21	0,62 $\pm$ 0,10	0,63 $\pm$ 0,09	0,76 $\pm$ 0,08	0,72 $\pm$ 0,11
C15:0	0,36 $\pm$ 0,05	0,44 $\pm$ 0,10	0,44 $\pm$ 0,07	0,48 $\pm$ 0,05	0,47 $\pm$ 0,12
plasm16:0	3,73 $\pm$ 0,30	3,61 $\pm$ 0,91	2,34 $\pm$ 0,73	4,20 $\pm$ 1,04	4,36 $\pm$ 1,55
C16:0	13,17 $\pm$ 1,41	11,49 $\pm$ 3,74	12,42 $\pm$ 0,82	12,64 $\pm$ 0,78	14,58 $\pm$ 0,74
C17:0	0,92 $\pm$ 0,07	0,84 $\pm$ 0,21	1,10 $\pm$ 0,10	1,10 $\pm$ 0,13	1,06 $\pm$ 0,21
plasm18:0	1,01 $\pm$ 0,22	0,95 $\pm$ 0,17	0,69 $\pm$ 0,19	0,93 $\pm$ 0,15	0,99 $\pm$ 0,24
C18:0	11,88 $\pm$ 0,61	11,01 $\pm$ 0,55	10,84 $\pm$ 0,72	10,26 $\pm$ 0,48	11,36 $\pm$ 0,76
C20:0	0,28 $\pm$ 0,03	0,36 $\pm$ 0,06	0,46 $\pm$ 0,07	0,59 $\pm$ 0,14	0,52 $\pm$ 0,08
C21:0	n.d.	n.d.	n.d.	0,23	n.d.
C22:0	0,40 $\pm$ 0,05	0,37 $\pm$ 0,04	0,50 $\pm$ 0,10	0,68 $\pm$ 0,19	0,43 $\pm$ 0,06
C23:0	n.d.	n.d.	0,36 $\pm$ 0,14	0,46 $\pm$ 0,19	0,30
C24:0	n.d.	0,23	0,39 $\pm$ 0,13	0,57 $\pm$ 0,29	0,29
Σ saturado	32,37 $\pm$ 1,74	29,91 $\pm$ 7,17	30,15 $\pm$ 2,25	32,89 $\pm$ 1,59	35,09 $\pm$ 2,75
C14:1	0,24	0,33 $\pm$ 0,01	0,34 $\pm$ 0,05	0,32 $\pm$ 0,05	0,30 $\pm$ 0,07
C15:1	0,35	0,22	1,05 $\pm$ 0,34	0,31	n.d.
C16:1	1,94 $\pm$ 0,14	4,80 $\pm$ 2,26	2,34 $\pm$ 0,40	2,75 $\pm$ 0,16	2,84 $\pm$ 0,36
C17:1	0,32 $\pm$ 0,02	0,57 $\pm$ 0,19	0,51 $\pm$ 0,13	0,26 $\pm$ 0,04	0,29 $\pm$ 0,03
C18:1n11	10,44 $\pm$ 0,86	12,87 $\pm$ 1,41	11,44 $\pm$ 1,10	11,91 $\pm$ 1,33	17,28 $\pm$ 1,08
C18:1n9	4,75 $\pm$ 0,38	4,02 $\pm$ 0,20	3,93 $\pm$ 0,16	3,22 $\pm$ 0,21	3,76 $\pm$ 0,65
C20:1n11	0,26 $\pm$ 0,03	0,35 $\pm$ 0,04	0,73 $\pm$ 0,11	0,80 $\pm$ 0,22	0,51 $\pm$ 0,08
C20:1n9	0,63 $\pm$ 0,09	0,93 $\pm$ 0,23	0,76 $\pm$ 0,13	0,82 $\pm$ 0,21	1,07 $\pm$ 0,16
C22:1n9	n.d.	n.d.	0,26	n.d.	0,21
C24:1	n.d.	0,27 $\pm$ 0,01	0,56	0,57 $\pm$ 0,31	0,24
Σ mono	18,93 $\pm$ 1,40	24,09 $\pm$ 2,62	21,37 $\pm$ 1,82	20,39 $\pm$ 2,83	26,27 $\pm$ 1,44^a
C18:2n6c	4,76 $\pm$ 0,23	5,23 $\pm$ 0,91	4,87 $\pm$ 0,45	4,75 $\pm$ 0,65	6,85 $\pm$ 0,49
C18:3n6	n.d.	0,55 $\pm$ 0,25	2,79 $\pm$ 1,79	0,38	0,41 $\pm$ 0,07
C18:4n6	0,69 $\pm$ 0,05	0,60 $\pm$ 0,09	0,55 $\pm$ 0,03	1,22 $\pm$ 0,17	0,56 $\pm$ 0,16

C20:2n6	1,02 ± 0,03	1,10 ± 0,09	0,95 ± 0,08	0,99 ± 0,21	1,01 ± 0,21
C20:3n6	1,30 ± 0,12	1,22 ± 0,13	1,23 ± 0,07	1,34 ± 0,08	1,13 ± 0,05
C20:4n6	16,09 ± 0,92	14,57 ± 2,66	15,90 ± 1,61	15,98 ± 1,93	10,78 ± 1,68
C22:2n6	n.d.	0,76 ± 0,55	1,48 ± 0,89	0,92	0,42 ± 0,09
C22:4n6	2,81 ± 0,32	2,85 ± 0,47	3,12 ± 0,24	3,53 ± 0,50	2,44 ± 0,41
C22:5n6	3,62 ± 0,28	3,00 ± 0,44	3,32 ± 0,31	3,64 ± 0,46	2,54 ± 0,39
Σ PUFA_{n6}	30,28 ± 1,49	29,88 ± 3,83	34,21 ± 2,28	32,76 ± 2,34	26,14 ± 1,72
C18:3n3	1,50 ± 0,14	1,80 ± 0,51	1,38 ± 0,26	1,37 ± 0,18	2,02 ± 0,49
C18:4n3	n.d.	1,51	1,71 ± 0,50	n.d.	0,52 ± 0,05
C20:3n3	0,44 ± 0,03	0,44 ± 0,09	0,50 ± 0,12	0,31 ± 0,04	0,53 ± 0,12
C20:4n3	0,45 ± 0,05	0,32 ± 0,04	0,26 ± 0,03	0,32	0,30 ± 0,02
C20:5n3	1,61 ± 0,15	1,93 ± 0,24	2,40 ± 0,56	1,44 ± 0,17	1,30 ± 0,13
C22:5n3	1,41 ± 0,48	1,63 ± 0,36	1,69 ± 0,16	1,77 ± 0,22	1,40 ± 0,31
C22:6n3	13,29 ± 1,48	10,01 ± 1,83	9,17 ± 1,21	9,89 ± 1,41	7,25 ± 1,52
Σ PUFA_{n3}	18,70 ± 1,64	17,63 ± 2,78	17,09 ± 1,68	15,10 ± 1,83	13,32 ± 2,09

^{ab} Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas entre os estádios de maturação

Tabela 17: Perfil dos ácidos graxos da musculatura branca em machos de *Arapaima gigas* do grupo 1 (Poucos espermatozóides no lúmen) e grupo 2 (Muitos espermatozóides no lúmen) (Média ± Erro Padrão).

Ácido Graxo	Grupo 1	Grupo 2
C14:0	0,59 ± 0,11	0,95 ± 0,12
C15:0	0,39 ± 0,06	0,53 ± 0,06
plasm16:0	3,26 ± 0,33	3,09 ± 0,29
C16:0	12,30 ± 1,15	13,91 ± 0,91
C17:0	0,92 ± 0,07	1,11 ± 0,10
plasm18:0	0,96 ± 0,09	0,72 ± 0,07
C18:0	10,11 ± 0,18	10,21 ± 0,26
C20:0	0,41 ± 0,04	0,52 ± 0,03
C22:0	0,42 ± 0,03	0,49 ± 0,05
C23:0	0,29 ± 0,02	0,35 ± 0,05
C24:0	0,33 ± 0,03	0,48 ± 0,11

Σ saturado	29,97 ± 1,94	32,35 ± 1,79
C14:1	0,28 ± 0,04	0,37 ± 0,04
C15:1	0,76	0,33 ± 0,02
C16:1	2,23 ± 0,21	3,04 ± 0,19
C17:1	0,33 ± 0,02	0,42 ± 0,03
C18:1n11	12,68 ± 0,73	15,06 ± 0,77
C18:1n9	3,50 ± 0,23	3,61 ± 0,12
C20:1n11	0,47 ± 0,07	0,70 ± 0,05
C20:1n9	0,80 ± 0,12	0,95 ± 0,07
C22:1n9	0,51 ± 0,11	0,24
C24:1	0,33 ± 0,04	1,46 ± 1,21
Σ mono	21,92 ± 1,28^a	26,18 ± 1,62^b
C18:2n6c	5,53 ± 0,42	5,97 ± 0,32
C18:3n6	0,63 ± 0,24	0,47 ± 0,09
C18:4n6	0,45 ± 0,06	0,49 ± 0,05
C20:2n6	1,16 ± 0,12	1,04 ± 0,04
C20:3n6	1,34 ± 0,07	1,23 ± 0,04
C20:4n6	14,15 ± 1,20	12,61 ± 0,81
C22:2n6	0,65 ± 0,27	0,79 ± 0,41
C22:4n6	3,42 ± 0,29	2,55 ± 0,26
C22:5n6	3,54 ± 0,25	3,10 ± 0,21
Σ PUFA_n6	30,85 ± 1,76	28,26 ± 1,59
C18:3n3	2,21 ± 0,28	2,14 ± 0,19
C18:4n3	n.d.	0,73 ± 0,16
C20:3n3	0,50 ± 0,07	0,43 ± 0,03
C20:4n3	0,34 ± 0,02	0,29 ± 0,01
C20:5n3	1,68 ± 0,18	1,61 ± 0,18
C22:4n3	1,68	2,15 ± 0,87
C22:5n3	2,12 ± 0,19	1,93 ± 0,16
C22:6n3	11,85 ± 0,88	8,10 ± 0,91
Σ PUFA_n3	20,39 ± 1,50^a	17,39 ± 1,85^b

^{ab} Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas entre os estádios de maturação

Tabela 18: Perfil dos ácidos graxos da musculatura vermelha em fêmeas de *Arapaima gigas* nos diferentes estádios do ciclo reprodutivo (Média $\pm$ Erro Padrão).

Ácido graxo	Imaturo	Repouso	Maturação	Maduro	Regressão
C14:0	1,47 $\pm$ 0,24	1,29 $\pm$ 0,46	0,97 $\pm$ 0,15	1,66 $\pm$ 0,27	0,99 $\pm$ 0,11
C15:0	0,90 $\pm$ 0,13	0,80 $\pm$ 0,25	0,61 $\pm$ 0,08	1,10 $\pm$ 0,17	0,68 $\pm$ 0,10
plasm16:0	0,66 $\pm$ 0,24	4,54 $\pm$ 2,42	1,75 $\pm$ 0,54	0,60 $\pm$ 0,06	2,55 $\pm$ 0,84
C16:0	16,80 $\pm$ 0,42	14,47 $\pm$ 4,49	14,13 $\pm$ 1,40	18,18 $\pm$ 1,73	14,58 $\pm$ 0,74
C17:0	1,58 $\pm$ 0,05	1,41 $\pm$ 0,46	1,60 $\pm$ 0,10	1,99 $\pm$ 0,13	1,49 $\pm$ 0,13
plasm18:0	n.d.	0,65 $\pm$ 0,28	0,57 $\pm$ 0,25	n.d.	0,48 $\pm$ 0,11
C18:0	12,04 $\pm$ 0,22	11,76 $\pm$ 0,55	12,36 $\pm$ 0,35	11,24 $\pm$ 0,32	11,29 $\pm$ 0,27
C20:0	0,63 $\pm$ 0,03	0,60 $\pm$ 0,08	0,70 $\pm$ 0,04	0,79 $\pm$ 0,07	0,68 $\pm$ 0,11
C21:0	n.d.	n.d.	0,21 $\pm$ 0,01	0,33 $\pm$ 0,02	0,37 $\pm$ 0,15
C22:0	0,36 $\pm$ 0,04	0,44 $\pm$ 0,05	0,56 $\pm$ 0,09	0,49 $\pm$ 0,09	0,50 $\pm$ 0,08
C23:0	n.d.	0,27	0,36 $\pm$ 0,13	0,36	0,30 $\pm$ 0,01
C24:0	n.d.	0,29 $\pm$ 0,01	0,36 $\pm$ 0,09	0,34 $\pm$ 0,13	0,33 $\pm$ 0,04
Σ saturado	34,43 $\pm$ 0,68	36,50 $\pm$ 4,50	34,18 $\pm$ 1,09	37,07 $\pm$ 1,77	34,22 $\pm$ 0,91
C14:1	0,50 $\pm$ 0,08	0,62 $\pm$ 0,29	0,51 $\pm$ 0,04	0,85 $\pm$ 0,14	0,47 $\pm$ 0,08
C15:1	0,58 $\pm$ 0,11	0,81 $\pm$ 0,31	0,29 $\pm$ 0,05	0,47 $\pm$ 0,06	0,33 $\pm$ 0,04
C16:1	4,03 $\pm$ 0,25	2,96 $\pm$ 1,02	3,04 $\pm$ 0,26	4,51 $\pm$ 0,49	3,22 $\pm$ 0,46
C17:1	1,08 $\pm$ 0,05	0,51 $\pm$ 0,13	0,49 $\pm$ 0,06	0,82 $\pm$ 0,08	0,52 $\pm$ 0,09
C18:1n11	16,78 $\pm$ 0,09	18,78 $\pm$ 1,29	16,64 $\pm$ 1,22	18,86 $\pm$ 0,89	17,45 $\pm$ 0,10
C18:1n9	4,61 $\pm$ 0,07	4,18 $\pm$ 0,41	4,69 $\pm$ 0,10	4,86 $\pm$ 0,14	4,63 $\pm$ 0,24
C20:1n11	0,62 $\pm$ 0,09	0,86 $\pm$ 0,22	1,32 $\pm$ 0,14	1,47 $\pm$ 0,26	0,99 $\pm$ 0,24
C20:1n9	1,15 $\pm$ 0,13	1,51 $\pm$ 0,29	1,00 $\pm$ 0,07	1,45 $\pm$ 0,11	1,27 $\pm$ 0,08
C22:1n9	n.d.	n.d.	n.d.	0,26	n.d.
C24:1	n.d.	0,30 $\pm$ 0,05	0,41	n.d.	n.d.
Σ mono	29,34 $\pm$ 0,31	30,53 $\pm$ 3,20	28,39 $\pm$ 1,53	33,56 $\pm$ 0,75	28,87 $\pm$ 1,45
C18:2n6c	8,99 $\pm$ 0,82	9,08 $\pm$ 0,84	7,90 $\pm$ 0,63	8,11 $\pm$ 0,37	8,07 $\pm$ 0,30
C18:3n6	0,37 $\pm$ 0,02	0,21	0,32 $\pm$ 0,06	0,31 $\pm$ 0,02	0,27 $\pm$ 0,06
C18:4n6	0,59 $\pm$ 0,01	0,44 $\pm$ 0,03	0,58 $\pm$ 0,08	0,54 $\pm$ 0,03	0,57 $\pm$ 0,04

C20:2n6	1,02 ± 0,04	1,26 ± 0,11	1,28 ± 0,10	1,21 ± 0,13	1,33 ± 0,14
C20:3n6	1,15 ± 0,07	1,22 ± 0,25	1,35 ± 0,18	1,03 ± 0,09	1,36 ± 0,10
C20:4n6	8,21 ± 0,53	7,05 ± 1,12	10,93 ± 1,71	5,49 ± 0,70	9,90 ± 1,21
C22:2n6	n.d.	0,34 ± 0,08	0,87	0,22	0,30 ± 0,04
C22:4n6	1,52 ± 0,11	1,51 ± 0,39	2,38 ± 0,46	1,59 ± 0,30	2,05 ± 0,28
C22:5n6	1,87 ± 0,18	1,42 ± 0,38	2,05 ± 0,30	1,37 ± 0,25	2,05 ± 0,22
Σ PUFA_{n6}	23,72 ± 0,82	22,53 ± 3,79	27,66 ± 2,18	19,89 ± 1,34	25,90 ± 1,34
C18:3n3	4,11 ± 0,56	4,25 ± 1,27	2,63 ± 0,26	3,20 ± 0,18	3,09 ± 0,28
C18:4n3	0,25 ± 0,01	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
C20:3n3	0,55 ± 0,05	0,64 ± 0,17	0,44 ± 0,03	0,51 ± 0,04	0,57 ± 0,08
C20:4n3	0,37 ± 0,02	0,38 ± 0,11	0,32 ± 0,03	0,32 ± 0,02	0,34 ± 0,02
C20:5n3	1,09 ± 0,03	0,95 ± 0,15	1,39 ± 0,12	0,91 ± 0,12	1,31 ± 0,12
C22:5n3	1,43 ± 0,11	1,31 ± 0,38	1,73 ± 0,20	1,34 ± 0,24	1,60 ± 0,23
C22:6n3	4,06 ± 0,43	3,43 ± 1,08	4,31 ± 0,42	3,09 ± 0,62	4,36 ± 0,46
Σ PUFA_{n3}	11,86 ± 0,17	10,97 ± 4,13	10,83 ± 0,57	9,37 ± 0,95	11,27 ± 0,90

Tabela 19: Perfil dos ácidos graxos da musculatura vermelha em machos de *Arapaima gigas* do grupo 1 (Poucos espermatozóides no lúmen) e grupo 2 (Muitos espermatozóides no lúmen) (Média ± Erro Padrão).

Ácido Graxo	Grupo 1	Grupo 2
C14:0	1,09 ± 0,20	1,20 ± 0,15
C15:0	0,65 ± 0,11	0,69 ± 0,07
plasm16:0	1,80 ± 0,66	1,87 ± 0,35
C16:0	15,35 ± 1,36	14,77 ± 0,89
C17:0	1,36 ± 0,11	1,45 ± 0,10
plasm18:0	0,70 ± 0,19	0,66 ± 0,10
C18:0	11,87 ± 0,21	11,23 ± 0,17
C20:0	0,64 ± 0,05	0,71 ± 0,04
C21:0	0,24 ± 0,02	0,35 ± 0,09
C22:0	0,52 ± 0,05	0,55 ± 0,04
C23:0	0,32 ± 0,03	0,32 ± 0,03

C24:0	0,39 ± 0,04	0,36 ± 0,05
Σ saturado	34,93 ± 1,19	34,16 ± 1,42
C14:1	0,46 ± 0,08	0,53 ± 0,05
C15:1	0,26 ± 0,03	0,36 ± 0,03
C16:1	3,33 ± 0,43	3,46 ± 0,23
C17:1	0,61 ± 0,09	0,55 ± 0,05
C18:1n11	18,11 ± 0,95	17,83 ± 0,56
C18:1n9	3,92 ± 0,24	4,34 ± 0,14
C20:1n11	1,03 ± 0,20	1,09 ± 0,11
C20:1n9	1,22 ± 0,11	1,29 ± 0,09
C22:1n9	0,25 ± 0,02	0,24 ± 0,01
C24:1	0,28 ± 0,02	0,43 ± 0,08
Σ mono	29,46 ± 1,08	30,11 ± 1,58
C18:2n6c	8,56 ± 0,54	7,59 ± 0,30
C18:3n6	0,30 ± 0,03	0,31 ± 0,01
C18:4n6	0,47 ± 0,04	0,49 ± 0,03
C20:2n6	1,38 ± 0,15	1,27 ± 0,05
C20:3n6	1,28 ± 0,11	1,35 ± 0,07
C20:4n6	8,38 ± 1,34	9,37 ± 0,78
C22:2n6	0,33 ± 0,03	0,39 ± 0,06
C22:4n6	2,01 ± 0,30	2,30 ± 0,24
C22:5n6	1,80 ± 0,19	2,24 ± 0,22
Σ PUFA_{n6}	24,51 ± 1,55	25,33 ± 1,97
C18:3n3	3,89 ± 0,42	2,77 ± 0,20
C18:4n3	0,25 ± 0,01	0,21
C20:3n3	0,67 ± 0,09	0,50 ± 0,02
C20:4n3	0,35 ± 0,02	0,33 ± 0,01
C20:5n3	1,06 ± 0,07	1,22 ± 0,08
C22:5n3	1,58 ± 0,18	1,92 ± 0,20
C22:6n3	4,20 ± 0,43	4,80 ± 0,53
Σ PUFA_{n3}	11,99 ± 0,71	11,74 ± 2,50

Tabela 20: Perfil dos ácidos graxos da *ventrecha* em fêmeas de *Arapaima gigas* nos diferentes estádios do ciclo reprodutivo (Média ± Erro Padrão).

Ácido graxo	Imaturo	Repouso	Maturação	Maduro	Regressão
C14:0	1,34 ± 0,04	1,06 ± 0,20	1,67 ± 0,17	1,64 ± 0,19	1,79 ± 0,34
C15:0	0,85 ± 0,02	0,69 ± 0,11	1,00 ± 0,09	1,00 ± 0,09	1,10 ± 0,22
plasm16:0	0,43	0,41 ± 0,15	0,76 ± 0,29	0,47 ± 0,02	0,79
C16:0	16,47 ± 1,06	15,59 ± 1,25	18,20 ± 1,33	16,44 ± 1,24	19,48 ± 1,32
C17:0	1,58 ± 0,01	1,51 ± 0,25	1,91 ± 0,04	1,69 ± 0,17	1,75 ± 0,17
plasm18:0	1,94	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
C18:0	10,32 ± 0,29	11,14 ± 0,93	10,80 ± 0,29	10,24 ± 0,13	11,71 ± 0,56
C20:0	0,79 ± 0,02	0,79 ± 0,05	0,68 ± 0,10	0,95 ± 0,12	0,76 ± 0,07
C21:0	n.d.	0,24	0,35	0,37 ± 0,08	0,25 ± 0,02
C22:0	0,63 ± 0,17	0,54 ± 0,05	0,45 ± 0,11	0,80 ± 0,18	0,53 ± 0,07
C23:0	n.d.	0,29 ± 0,04	0,35 ± 0,08	0,48 ± 0,13	0,31 ± 0,08
C24:0	0,25 ± 0,03	0,30 ± 0,07	0,37 ± 0,10	0,70 ± 0,23	0,44 ± 0,18
Σ saturado	34,59 ± 0,84	32,56 ± 2,29	36,55 ± 1,41	30,70 ± 1,19	38,84 ± 2,58
C14:1	0,42 ± 0,04	0,53 ± 0,14	0,77 ± 0,06	0,84 ± 0,07	0,84 ± 0,20
C15:1	0,33 ± 0,02	0,33 ± 0,15	0,49 ± 0,04	0,41 ± 0,03	0,35 ± 0,07
C16:1	3,69 ± 0,27	3,45 ± 0,46	4,58 ± 0,20	4,38 ± 0,39	4,84 ± 0,76
C17:1	0,77 ± 0,06	0,63 ± 0,04	0,71 ± 0,03	0,95 ± 0,14	0,81 ± 0,11
C18:1n11	18,90 ± 0,76	20,96 ± 0,69	19,04 ± 0,99	19,60 ± 1,41	21,65 ± 0,89
C18:1n9	4,05 ± 0,02	3,69 ± 0,40	4,46 ± 0,08	4,27 ± 0,11	3,68 ± 0,15
C20:1n11	0,82 ± 0,09	1,45 ± 0,37	1,39 ± 0,14	1,82 ± 0,28	1,17 ± 0,21
C20:1n9	1,35 ± 0,08	1,85 ± 0,26	1,04 ± 0,14	1,69 ± 0,23	1,40 ± 0,10
C22:1n9	0,46	0,24 ± 0,02	0,24	0,34	0,31 ± 0,09
C24:1	n.d.	n.d.	n.d.	0,33	n.d.
Σ mono	30,77 ± 1,29	33,14 ± 1,38	32,71 ± 0,82	34,83 ± 1,18	36,41 ± 0,73
C18:2n6c	8,86 ± 1,06	10,45 ± 1,03	8,65 ± 0,58	8,33 ± 0,49	8,81 ± 0,45
C18:3n6	1,95 ± 1,07	0,32 ± 0,02	0,45 ± 0,08	0,32 ± 0,02	0,29 ± 0,02
C18:4n6	0,52 ± 0,10	0,38 ± 0,03	0,48 ± 0,04	0,46 ± 0,02	0,42 ± 0,04
C20:2n6	1,05 ± 0,05	1,42 ± 0,10	1,09 ± 0,12	1,40 ± 0,17	1,15 ± 0,17

C20:3n6	1,07 ± 0,03	1,19 ± 0,13	1,08 ± 0,13	1,40 ± 0,21	0,94 ± 0,08
C20:4n6	5,03 ± 0,44	4,75 ± 0,64	5,86 ± 0,57	4,88 ± 0,27	3,91 ± 0,41
C22:2n6	1,07	0,22	0,30 ± 0,01	0,36	n.d.
C22:4n6	1,40 ± 0,16	1,35 ± 0,24	1,52 ± 0,25	2,03 ± 0,40	1,22 ± 0,19
C22:5n6	1,52 ± 0,25	1,36 ± 0,22	1,46 ± 0,25	1,72 ± 0,28	1,08 ± 0,18
Σ PUFA_{n6}	22,46 ± 0,50	21,44 ± 1,24	20,89 ± 0,80	22,53 ± 0,87	18,05 ± 1,42
C18:3n3	4,58 ± 0,91	5,81 ± 1,58	3,31 ± 0,27	3,26 ± 0,26	3,74 ± 0,43
C18:4n3	3,30 ± 1,95	n.d.	0,45 ± 0,12	n.d.	n.d.
C20:3n3	0,72 ± 0,03	0,78 ± 0,15	0,45 ± 0,07	0,54 ± 0,04	0,55 ± 0,11
C20:4n3	0,46 ± 0,04	0,48 ± 0,10	0,34 ± 0,06	0,37 ± 0,01	0,31 ± 0,04
C20:5n3	2,09	1,09 ± 0,16	1,22 ± 0,14	0,81 ± 0,08	0,70 ± 0,10
C22:5n3	1,49 ± 0,13	1,41 ± 0,30	1,29 ± 0,26	1,69 ± 0,30	1,12 ± 0,23
C22:6n3	4,41 ± 0,69	3,40 ± 0,74	3,06 ± 0,45	3,24 ± 0,47	2,58 ± 0,60
Σ PUFA_{n3}	17,05 ± 1,34	12,97 ± 2,44	10,12 ± 0,97	10,97 ± 0,56	5,38 ± 1,66
C16:2	0,65 ± 0,07	0,85 ± 0,20	1,06 ± 0,03	1,07 ± 0,07	0,97 ± 0,11

Tabela 21: Perfil dos ácidos graxos da *ventrecha* em machos de *Arapaima gigas* do grupo 1 (Poucos espermatozóides no lúmen) e grupo 2 (Muitos espermatozóides no lúmen) (Média ± Erro Padrão).

Ácido Graxo	Grupo 1	Grupo 2
C14:0	1,00 ± 0,09	1,63 ± 0,28
C15:0	0,63 ± 0,04	0,82 ± 0,06
plasm16:0	0,54	0,49 ± 0,09
C16:0	15,01 ± 0,60	15,84 ± 1,04
C17:0	1,45 ± 0,09	1,63 ± 0,09
plasm18:0	n.d.	0,45
C18:0	9,86 ± 0,31	10,94 ± 0,51
C20:0	0,74 ± 0,04	0,81 ± 0,06
C21:0	0,24 ± 0,02	0,64 ± 0,42
C22:0	0,59 ± 0,04	0,57 ± 0,04
C23:0	0,29 ± 0,02	0,45 ± 0,19
C24:0	0,32 ± 0,03	0,50 ± 0,19

Σ saturado	30,67 ± 1,07^a	33,62 ± 1,11^b
C14:1	0,46 ± 0,04	0,62 ± 0,06
C15:1	0,31 ± 0,02	0,36 ± 0,04
C16:1	3,19 ± 0,18	3,90 ± 0,34
C17:1	0,70 ± 0,05	0,75 ± 0,05
C18:1n11	20,16 ± 0,80	21,28 ± 1,15
C18:1n9	3,78 ± 0,19	4,02 ± 0,17
C20:1n11	1,26 ± 0,19	1,33 ± 0,16
C20:1n9	1,47 ± 0,10	1,53 ± 0,13
C22:1n9	0,24 ± 0,01	0,27 ± 0,02
Σ mono	31,56 ± 0,92^a	33,83 ± 1,37^b
C18:2n6c	9,66 ± 0,51	8,58 ± 0,45
C18:3n6	0,88 ± 0,52	0,45 ± 0,12
C18:4n6	0,38 ± 0,43	0,45 ± 0,03
C20:2n6	1,39 ± 0,14	1,25 ± 0,07
C20:3n6	1,95 ± 0,65	1,13 ± 0,05
C20:4n6	5,06 ± 0,29	5,18 ± 0,62
C22:2n6	0,95 ± 0,97	0,56 ± 0,29
C22:4n6	1,55 ± 0,11	1,73 ± 0,14
C22:5n6	1,54 ± 0,88	1,75 ± 0,16
Σ PUFA_n6	23,37 ± 1,05	20,70 ± 0,85
C18:3n3	5,20 ± 0,43	3,52 ± 0,34
C18:4n3	0,27	1,23
C20:3n3	0,85 ± 0,07	0,54 ± 0,05
C20:4n3	0,56 ± 0,09	0,57 ± 0,18
C20:5n3	1,96 ± 0,71	1,00 ± 0,09
C22:5n3	1,92 ± 0,27	1,57 ± 0,10
C22:6n3	3,80 ± 0,23	3,59 ± 0,56
Σ PUFA_n3	14,56 ± 0,68^a	10,90 ± 0,82^b
C16:2	0,76 ± 0,07	0,88 ± 0,05
plasm18:2	2,98	1,19

^{ab} Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas entre os estádios de maturação

Tabela 22: Perfil dos ácidos graxos do tecido adiposo cavitário em fêmeas de *Arapaima gigas* nos diferentes estádios do ciclo reprodutivo (Média $\pm$ Erro Padrão).

Ácido graxo	Imaturo	Repouso	Maturação	Maduro	Regressão
C14:0	3,03 $\pm$ 0,32	1,44 $\pm$ 0,43	2,50 $\pm$ 0,29	1,65 $\pm$ 0,46	1,47 $\pm$ 0,28
C15:0	1,59 $\pm$ 0,12	0,87 $\pm$ 0,20	1,41 $\pm$ 0,14	0,98 $\pm$ 0,25	0,98 $\pm$ 0,20
plasm16:0	n.d.	0,24 $\pm$ 0,03	0,76 $\pm$ 0,01	n.d.	0,55
C16:0	24,37 $\pm$ 0,81	17,93 $\pm$ 1,09	20,53 $\pm$ 1,00	16,59 $\pm$ 2,51	17,86 $\pm$ 1,80
C17:0	1,79 $\pm$ 0,03	1,59 $\pm$ 0,32	2,15 $\pm$ 0,08	1,72 $\pm$ 0,21	1,68 $\pm$ 0,23
C18:0	11,04 $\pm$ 0,97	10,62 $\pm$ 0,62	11,98 $\pm$ 1,50	9,98 $\pm$ 0,15	10,53 $\pm$ 0,33
C20:0	0,47 $\pm$ 0,06	0,74 $\pm$ 0,11	0,65 $\pm$ 0,09	0,93 $\pm$ 0,18	0,88 $\pm$ 0,13
C21:0	n.d.	0,24 $\pm$ 0,01	0,30 $\pm$ 0,05	0,29 $\pm$ 0,07	0,29 $\pm$ 0,04
C22:0	0,28 $\pm$ 0,02	0,43 $\pm$ 0,06	0,43 $\pm$ 0,09	0,77 $\pm$ 0,25	0,61 $\pm$ 0,08
C23:0	n.d.	0,23	0,38	0,44 $\pm$ 0,15	0,29 $\pm$ 0,02
C24:0		0,25 $\pm$ 0,01	0,23 $\pm$ 0,01	0,53 $\pm$ 0,23	0,37 $\pm$ 0,03
Σ saturado	42,60 $\pm$ 1,09	34,60 $\pm$ 2,35	41,31 $\pm$ 1,61	33,89 $\pm$ 2,51	35,52 $\pm$ 2,18
C14:1	0,97 $\pm$ 0,08	0,72 $\pm$ 0,31	1,27 $\pm$ 0,15	0,88 $\pm$ 0,22	0,77 $\pm$ 0,18
C15:1	n.d.	0,27 $\pm$ 0,02	0,41	0,47 $\pm$ 0,10	0,25 $\pm$ 0,03
C16:1	6,64 $\pm$ 0,35	4,07 $\pm$ 0,77	6,28 $\pm$ 0,49	4,30 $\pm$ 0,80	4,48 $\pm$ 0,78
C17:1	1,24 $\pm$ 0,01	0,71 $\pm$ 0,11	1,08 $\pm$ 0,13	0,79 $\pm$ 0,10	0,79 $\pm$ 0,10
C18:1n11	19,01 $\pm$ 1,19	21,94 $\pm$ 1,35	17,84 $\pm$ 0,65	20,55 $\pm$ 1,41	22,40 $\pm$ 1,12
C18:1n9	2,87 $\pm$ 0,19	3,35 $\pm$ 0,19	4,18 $\pm$ 0,48	4,21 $\pm$ 0,12	4,14 $\pm$ 0,55
C20:1n11	0,58 $\pm$ 0,06	1,15 $\pm$ 0,40	1,45 $\pm$ 0,12	1,82 $\pm$ 0,32	1,33 $\pm$ 0,31
C20:1n9	0,85 $\pm$ 0,09	1,83 $\pm$ 0,31	1,00 $\pm$ 0,17	1,75 $\pm$ 0,23	1,64 $\pm$ 0,13
C22:1n9	n.d.	0,22 $\pm$ 0,01	0,30	0,23 $\pm$ 0,02	n.d.
Σ mono	32,20 $\pm$ 1,45	34,20 $\pm$ 1,35	33,81 $\pm$ 1,19	35,00 $\pm$ 1,20	35,79 $\pm$ 0,52
C18:2n6c	8,60 $\pm$ 0,58	10,55 $\pm$ 1,31	8,85 $\pm$ 0,33	8,75 $\pm$ 0,26	9,55 $\pm$ 0,57
C18:3n6	0,46 $\pm$ 0,01	0,33 $\pm$ 0,02	0,43 $\pm$ 0,03	0,31 $\pm$ 0,03	0,33 $\pm$ 0,04
C18:4n6	0,30 $\pm$ 0,03	0,36 $\pm$ 0,05	0,39 $\pm$ 0,04	0,42 $\pm$ 0,03	0,43 $\pm$ 0,06
C20:2n6	0,73 $\pm$ 0,04	1,25 $\pm$ 0,09	0,97 $\pm$ 0,09	1,44 $\pm$ 0,22	1,29 $\pm$ 0,19
C20:3n6	0,68 $\pm$ 0,02	1,07 $\pm$ 0,11	1,04 $\pm$ 0,12	1,23 $\pm$ 0,15	1,06 $\pm$ 0,10

C20:4n6	3,09 ± 0,22	3,60 ± 0,29	4,20 ± 0,44	4,29 ± 0,48	3,64 ± 0,34
C22:2n6	n.d.	n.d.	0,20	0,33	n.d.
C22:4n6	0,63 ± 0,05	1,07 ± 0,11	0,87 ± 0,14	2,14 ± 0,58	1,47 ± 0,30
C22:5n6	0,74 ± 0,09	1,01 ± 0,13	0,79 ± 0,13	1,76 ± 0,48	1,27 ± 0,24
Σ PUFA_{n6}	15,20 ± 0,46	19,30 ± 1,23	17,73 ± 0,77	20,66 ± 1,92	19,04 ± 1,51
C18:3n3	4,90 ± 0,58	6,14 ± 1,63	3,83 ± 0,36	3,23 ± 0,36	3,98 ± 0,54
C18:4n3	0,32	n.d.	0,30 ± 0,03	n.d.	n.d.
C20:3n3	0,43 ± 0,03	0,76 ± 0,16	0,40 ± 0,07	0,57 ± 0,08	0,61 ± 0,13
C20:4n3	0,31 ± 0,02	0,47 ± 0,11	0,35 ± 0,06	0,36 ± 0,04	0,35 ± 0,04
C20:5n3	0,66 ± 0,04	0,88 ± 0,11	0,97 ± 0,11	0,79 ± 10	0,85 ± 0,26
C22:5n3	0,70 ± 0,03	1,15 ± 0,19	0,83 ± 0,07	1,78 ± 0,43	1,32 ± 0,24
C22:6n3	1,86 ± 0,19	2,41 ± 0,41	1,35 ± 0,24	3,05 ± 0,80	2,42 ± 0,57
Σ PUFA_{n3}	9,18 ± 0,47	11,80 ± 2,33	8,02 ± 0,44	9,78 ± 1,38	9,53 ± 1,54
C16:2	0,87 ± 0,04	0,94 ± 0,29	1,25 ± 0,09	1,06 ± 0,16	0,96 ± 0,14

Tabela 23: Perfil dos ácidos graxos do tecido adiposo cavitário em machos de *Arapaima gigas* do grupo 1 (Poucos espermatozóides no lúmen) e grupo 2 (Muitos espermatozóides no lúmen) (Média ± Erro Padrão).

Ácido Graxo	Grupo 1	Grupo 2
C14:0	1,42 ± 0,31	2,08 ± 0,30
C15:0	0,83 ± 0,15	1,01 ± 0,10
plasm16:0	n.d.	0,51 ± 0,07
C16:0	17,56 ± 1,59	17,41 ± 1,68
C17:0	1,52 ± 0,11	1,65 ± 0,12
plasm18:0	n.d.	0,58
C18:0	11,29 ± 0,62	12,02 ± 0,97
C20:0	0,72 ± 0,06	0,79 ± 0,08
C21:0	0,32 ± 0,04	0,34 ± 0,03
C22:0	0,51 ± 0,08	0,52 ± 0,09
C23:0	0,32 ± 0,04	0,44 ± 0,06
C24:0	0,40 ± 0,08	0,61 ± 0,11

Σ saturado	34,09 ± 2,28	37,97 ± 2,46
C14:1	0,63 ± 0,11	0,84 ± 0,09
C15:1	0,28 ± 0,02	0,36 ± 0,02
C16:1	4,22 ± 0,67	5,90 ± 0,98
C17:1	0,83 ± 0,11	0,83 ± 0,09
C18:1n11	20,49 ± 0,72	20,38 ± 1,09
C18:1n9	3,41 ± 0,24	3,51 ± 0,20
C20:1n11	1,29 ± 0,32	1,47 ± 0,18
C20:1n9	1,38 ± 0,17	1,42 ± 0,20
C22:1n9	0,25 ± 0,01	0,26 ± 0,01
Σ mono	32,80 ± 0,57	34,97 ± 1,82
C18:2n6c	10,15 ± 0,53	8,74 ± 0,35
C18:3n6	0,36 ± 0,03	0,33 ± 0,02
C18:4n6	0,35 ± 0,02	0,36 ± 0,02
C20:2n6	1,27 ± 0,16	1,09 ± 0,08
C20:3n6	1,20 ± 0,15	1,07 ± 0,08
C20:4n6	4,12 ± 0,45	3,94 ± 0,21
C22:2n6	0,23	0,27 ± 0,02
C22:4n6	1,33 ± 0,23	1,52 ± 0,25
C22:5n6	1,28 ± 0,20	1,43 ± 0,22
Σ PUFA_{n6}	20,30 ± 1,23	18,75 ± 0,92
C18:3n3	5,49 ± 0,52	3,67 ± 0,32
C18:4n3	0,27 ± 0,01	0,27 ± 0,01
C20:3n3	0,75 ± 0,11	0,50 ± 0,06
C20:4n3	0,48 ± 0,06	0,35 ± 0,03
C20:5n3	1,04 ± 0,14	0,87 ± 0,07
C22:5n3	1,43 ± 0,26	1,45 ± 0,23
C22:6n3	2,90 ± 0,45	2,59 ± 0,39
Σ PUFA_{n3}	12,30 ± 1,21	9,67 ± 0,75
C16:2	0,83 ± 0,07	1,30 ± 0,28

Tabela 24: Esteróides sexuais plasmáticos em fêmeas de *Arapaima gigas* nos diferentes estádios do ciclo reprodutivo. (Média ± Erro Padrão).

FÊMEAS	17β-Estradiol	Testosterona	11ceto-T	17α-OHP
	(pg/ml)	(pg/ml)	(pg/ml)	(pg/ml)
Imaturo	153,59 ± 4,75 ^{ab}	548,45 ± 107,75	6,38 ± 0,67	432,50 ± 59,11 ^a
Repouso	139,14 ± 44,33 ^b	457,80 ± 81,20	9,16 ± 4,14	140,83 ± 30,70 ^c
Madureza	223,77 ± 37,72 ^a	1126,4 ± 263,08 ^a	18,60 ± 5,69	286,00 ± 11,81 ^b
Maduro	85,82 ± 13,07 ^{bc}	539,50 ± 108,54	71,54 ± 23,36 ^a	65,75 ± 7,36 ^c
Regressão	31,03 ± 5,39 ^c	194,23 ± 52,14 ^b	24,40 ± 5,94	46,68 ± 15,40 ^d

^{ab} Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas entre os estádios de maturação

Tabela 25: Esteróides sexuais plasmáticos em machos de *Arapaima gigas* nos grupos 1 e 2. (Média ± Erro Padrão).

MACHOS	17β-Estradiol	Testosterona	11ceto-T	17α-OHP
	(pg/ml)	(pg/ml)	(pg/ml)	(pg/ml)
Grupo 1	34,92 ± 8,26 ^a	1495,37 ± 202,8	164,73 ± 36,47	301,38 ± 75,23
Grupo 2	8,99 ± 2,17	926,05 ± 197,30	145,06 ± 35,35	339,94 ± 53,68

^{ab} Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas entre os estádios de maturação

Tabela 26: Esteróides sexuais do líquido encefálico em fêmeas e machos de *Arapaima gigas*. (Média $\pm$ Erro Padrão).

FÊMEAS	17β-Estradiol	Testosterona	17α-OHP
	(pg/ml)	(pg/ml)	(pg/ml)
Imaturo	199,09 $\pm$ 18,74 ^a	142,95 $\pm$ 59,55	281,83 $\pm$ 62,96
Repouso	30,51 $\pm$ 22,26	48,80	199,75 $\pm$ 27,75
Maturação	122,23 $\pm$ 28,04	236,45 $\pm$ 68,38	303,67 $\pm$ 62,15
Maduro	11,86 $\pm$ 3,01	69,50 $\pm$ 20,21	153,50 $\pm$ 44,31
Regressão	6,19 $\pm$ 1,07 ^b	413,10 $\pm$ 151,73	170,30 $\pm$ 14,47
MACHOS	17β-Estradiol	Testosterona	17α-OHP
	(pg/ml)	(pg/ml)	(pg/ml)
Grupo 1	15,78 $\pm$ 4,95	216,79 $\pm$ 78,33	282,86 $\pm$ 47,26
Grupo 2	63,08 $\pm$ 18,18	406,45 $\pm$ 83,56	257,21 $\pm$ 41,52

^{ab} Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas entre os estádios de maturação

FIGURAS

1a

2.03 m

Figura 1: a) *Arapaima gigas* coletado em seu ambiente natural. Ilha Mexiana – PA; b) Ilha Mexiana, localizada no Arquipélago de Marajó no estado do Pará.

Figura 2: **a)** Ponto de coleta; Canal Taboca – Ilha Mexiana/PA; **b)** Ponto de coleta; Canal João Ferreira – Ilha Mexiana; **c)** Coleta de *A. gigas* com rede de arrasto no canal João Ferreira; **d)** Local onde os peixes eram conduzidos para coleta do material.

Figura 3: **a)** Localização do ovário de *A. gigas* dentro da cavidade celomática. Somente o ovário esquerdo desenvolvido; **b)** Ovário de *A. gigas* imaturo; **c)** Ovário de *A. gigas* em repouso; **d)** Ovário de *A. gigas* em maturação; **e)** Ovário de *A. gigas* maduro; **f)** Ovário de *A. gigas* em regressão.

Figura 4: **a)** Seta indicando ninho de oogônias; **b)** Oócitos perinucleolares em vários estádios de desenvolvimento (setas); **c)** Oócito cortical-alveolar (seta); **d)** Oócito vitelogênico (seta). **Fig. b,c,d:** Barra = 100 μ m; **a:** Barra = 10 μ m.

Figura 5: **a)** Camadas foliculares (setas); **b)** Oócito cortical alveolar com núcleo periférico (seta); **c)** Oócitos atrésicos (setas); **d)** Folículo pós-ovulatório (seta).
Figs b, c, d: Barra = 100 μm ; **a:** Barra = 10 μm .

Figura 6: **a)** Testículo de *A. gigas* (seta) envolto por tecido adiposo (asterisco); **b)** Túbulo seminífero contendo células da linhagem germinativa (seta); **c)** Lúmen do testículo dos animais do grupo 1 contendo poucos espermatozóides (setas) **d)** Lúmen do testículo dos animais do grupo 2 contendo muitos espermatozóides (seta). **Figs. c, d:** Barra = 100 μm ; **b:** Barra = 30 μm .

Figura 7: **a)** Média mensal da temperatura da água (°C) da região do Marajó do ano de 2008. **b)** Média mensal da precipitação pluviométrica da região do Marajó do ano de 2008.

Figura 8: **a)** Índice Gonadosomático (%) em fêmeas de *A. gigas* ao longo do ciclo reprodutivo; **b)** Índice Gonadosomático (%) em machos de *A. gigas* nos grupos 1 e 2.

Figura 9: **a)** Razão 11ceto-T/17 β -estradiol em fêmeas de *A. gigas*. Abaixo de 2,5 (linha vermelha) os animais são fêmeas; **b)** Razão 11ceto-T/17 β -estradiol em machos de *A. gigas*. Os animais que não entraram na razão (em círculo) estavam abaixo de 2,5 (linha vermelha).

ANEXO

1 – Protocolo de Análises dos Esteróides Gonadais (17 α -hidroxiprogesterona, 17 β -estradiol, testosterona e 11ceto-testosterona).

1.1 – Protocolo de Análise para 17 β -estradiol.

Para análise do hormônio estradiol, utilizou-se para quantificar esse hormônio no plasma dos animais, o “kit” comercial para Estradiol EIA (INTERKIT), através de Elisamunoensaio, este “kit” contém:

- ⇒ 6 padrões para Estradiol;
- ⇒ 2 controles para Estradiol;
- ⇒ Anticorpo anti-estradiol de coelho;
- ⇒ Conjugado de Biotina Estradiol;
- ⇒ Solução Cromógena de Tetrametilbenzidina (TMB);
- ⇒ Solução de interrupção (STOP);
- ⇒ Placa contendo 12 tiras com 8 poços cada, totalizando 96 poços.

As amostras foram descongeladas até atingir temperatura ambiente e homogeneizadas para o início do procedimento da análise.

O suporte com as tiras foi marcado para posterior identificação das amostras, colocando nas primeiras cavidades, 25 μ l dos 6 padrões fornecidos pelo kit (0; 10; 30; 100; 300 e 1000 pg/ml). Em seguida, 25 μ l do controle 1 e 2 e das amostras foram colocados nos poços seguintes. Essa análise foi feita em duplicata para os padrões, para os controles e para as amostras.

Foi adicionado 100 μ l da solução de Conjugado de Biotina em cada poço das amostras e reagentes (padrões e controle).

Foi adicionado 50 μ l de antisoro em cada poço, agitando a placa levemente por 5 segundos. Posteriormente, a placa foi colocada no agitador, onde ficou por 90 minutos na velocidade de 170rpm. Depois de agitado, desprezou-se o conteúdo da placa, lavando cada poço com 300 μ l de água destilada. A lavagem foi realizada 5 vezes em cada poço.

Foi adicionado 100µl de Solução Cromógena TMB (solução de coloração da reação) em todos os poços e colocada no agitador novamente por 10 minutos. A placa foi coberta com papel alumínio antes de ser colocada no agitador, para que a luz e o oxigênio não interferissem na reação.

Após todo esse procedimento, foi adicionado 100µl de solução STOP (solução de interrupção da reação, de composição ácida) em cada poço, esperando-se por aproximadamente 15 segundos para a leitura final e conseqüentemente para obtenção dos resultados.

As amostras, os controles e os padrões foram lidos em uma leitora de microplaca de Elisa (Tecan – *Sunrise*) a um comprimento de onda de 450nm.

1.2 – Protocolo de Análise para Testosterona.

Para análise do hormônio testosterona, utilizou-se para quantificar esse hormônio no plasma dos animais, o “kit” comercial para Testosterona (INTERKIT), através de Elisamunoensaio, este “kit” contém:

- ⇒ 6 padrões para Testosterona;
- ⇒ 2 controles para Testosterona;
- ⇒ Conjugado de Biotina Testosterona;
- ⇒ Reagente anti-testosterona de coelho;
- ⇒ Solução Cromógena de Tetrametilbenzidina (TMB);
- ⇒ Solução de interrupção (STOP);
- ⇒ Placa contendo 12 tiras com 8 poços cada, totalizando 96 poços.

O procedimento do ensaio foi o mesmo realizado no item 1.1 (Protocolo de análise de Estradiol). Os valores dos padrões do kit para testosterona são de 0; 0.1; 0.5; 2; 6 e 18 ng/ml. As amostras, os controles e os padrões foram lidos também em uma leitora de microplaca de Elisa (Tecan – *Sunrise*) a um comprimento de onda de 450nm.

1.3 – Protocolo de Análise para 17α-hidroxiprogesterona.

Para análise do hormônio 17α -hidroxiprogesterona, utilizou-se para quantificar esse hormônio no plasma dos animais, o “kit” comercial para 17α -hidroxiprogesterona (INTERKIT), através de Elisamunoensaio, este “kit” contém:

- ⇒ 6 padrões para 17α -hidroxiprogesterona;
- ⇒ Calibrador zero;
- ⇒ Conjugado Enzimático Peroxidase 17α -hidroxiprogesterona;
- ⇒ Solução de lavagem;
- ⇒ Solução Cromógena de Tetrametilbenzidina (TMB);
- ⇒ Solução de interrupção (STOP);
- ⇒ Placa contendo 12 tiras com 8 poços cada, nas quais são colocadas as amostras, totalizando 96 poços.

As amostras foram descongeladas até atingir temperatura ambiente e homogeneizadas para o início do procedimento da análise.

O suporte com as tiras foi marcado para posterior identificação das amostras, colocando nas primeiras cavidades, 25 μ l dos 6 padrões fornecidos pelo kit (0.15; 0.5; 1.5; 3; 7.5 e 20 ng/ml). Em seguida, 25 μ l do controle 1 e 2 e das amostras foram colocados nos poços seguintes. Essa análise foi feita em duplicata para os padrões, para os controles e para as amostras.

Foi adicionado 200 μ l da solução de Conjugado Enzimático em cada poço das amostras e reagentes (padrões e controle). Posteriormente, a placa foi colocada no agitador, onde ficou por 60 minutos na velocidade de 170rpm. Depois de agitado, desprezou-se o conteúdo da placa, lavando cada poço com 300 μ l de solução de lavagem. A lavagem foi realizada 5 vezes em cada poço.

Foi adicionado 200 μ l de Solução Cromógena TMB (solução de coloração da reação) em todos os poços e colocada no agitador novamente por 30 minutos. A placa foi coberta com papel alumínio antes de ser colocada no agitador, para que a luz e o oxigênio não interferissem na reação.

Após todo esse procedimento, foi adicionado 100 μ l de solução STOP (solução de interrupção da reação, de composição ácida) em cada poço,

esperando-se por aproximadamente 15 segundos para a leitura final e conseqüentemente para obtenção dos resultados.

As amostras, os controles e os padrões foram lidos em uma leitora de microplaca de Elisa (Tecan – *Sunrise*) a um comprimento de onda de 450nm.

1.4 – Protocolo de Análise para 11ceto-Testosterona.

Para análise do hormônio 11ceto-Testosterona, utilizou-se “kit” comercial para 11ceto-Testosterona (EIA 582751 – *Cayman Chemical Company, INC*), através de Elisamunoensaio. Este “kit” contém:

- ⇒ 01 padrão para 11ceto-Testosterona (10ng/ml);
- ⇒ 01 AChE Tracer para 11ceto-Testosterona;
- ⇒ 01 Antisoro para 11ceto-Testosterona;
- ⇒ 01 Buffer Concentrado de 11ceto-Testosterona;
- ⇒ 01 Corante Tracer Dye;
- ⇒ 01 corante antisoro Dye;
- ⇒ 01 Reagente Ellman's;
- ⇒ 01 Corante Tween 20;
- ⇒ Solução de lavagem;
- ⇒ Placa contendo 12 tiras com 8 poços cada, nas quais são colocadas as amostras, totalizando 96 poços.

1.4.1. Preparação dos Reagentes

Buffer Concentrado de 11ceto-Testosterona

Adicionar 10ml de Buffer em 90ml de água deionizada. Estocar a 4°C por até dois meses.

Solução de Lavagem

Diluir 5ml da solução de lavagem em um volume total de 2L de água deionizada adicionando 1ml de Tween 20. O Tween 20 é um material viscoso e o volume desejado deve ser coletado com uma seringa.

Reagente Ellman's

Reconstituir o frasco do reagente Ellman's em 20ml de água deionizada. A preparação deste reagente deverá ser feita somente na hora do ensaio, no momento de adicionar esse reagente na placa de Elisa.

Diluição do Padrão

Preparar uma solução mãe com 100ul do padrão de 11ceto-Testosterona com 900ul de água deionizada. A solução mãe pode ser estocada a 4°C e estará estável por duas semanas. Numere oito tubos de ensaio.

No tubo 01, coloque 900ul de Buffer adicionando 100ul da solução padrão mãe, totalizando assim um volume de 1ml. No tubo 2, coloque 500ul de Buffer e transfira 500ul do tubo 01 para o tubo 02. No tubo 03, coloque 500ul de Buffer e transfira 500ul do tubo 02 para o tubo 03. Repita essa operação até o tubo 08. Ao final, as concentrações dos tubos serão: 100pg/ml (tubo 01); 50 pg/ml (tubo 02); 25 pg/ml (tubo 03); 12,5 pg/ml (tubo 04); 6,25 pg/ml (tubo 05); 3,13 pg/ml (tubo 06); 1,56 pg/ml (tubo 07) e 0,78 pg/ml (tubo 08) de 11ceto-Testosterona.

Ache Tracer de 11ceto-Testosterona

Reconstituir o AchE tracer em 6ml de Buffer e adicionar 60ul do corante Tracer Dye para facilitar a visualização das tiras.

Antisoro de 11ceto-Testosterona

Reconstituir o antisoro para 11ceto-Testosterona em 6ml de Buffer e adicionar 60ul de corante Antisoro Dye para facilitar a visualização das tiras.

1.4.2. Procedimento

As amostras foram descongeladas até atingir temperatura ambiente e homogeneizadas para o início do procedimento da análise.

O suporte com as tiras foi marcado para posterior identificação das amostras, colocando nas primeiras cavidades, 50ul dos 08 padrões previamente preparado (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,13; 1,56; 0,78 pg/ml) e 50ul

de amostra no restante das cavidades. Essa análise foi feita em duplicata para os padrões e para as amostras.

Foi adicionado 50µl de AchE Tracer e 50ul de antisoro em todas as cavidades e incubado por 2 horas a temperatura ambiente. Após a incubação, a placa foi lavada, desprezando-se o conteúdo da placa, e adicionando 300µl de solução de lavagem em cada cavidade. A lavagem foi realizada 5 vezes em cada poço.

Após a lavagem, foi adicionado 200ul da solução Ellman's em todas as cavidades. Essa solução deve ser preparada neste momento.

A placa foi coberta com papel alumínio e incubado por 60~90 minutos. Ler em leitora de microplaca de Elisa a um comprimento de onda de 450nm.

2 - Análises de substratos metabólicos (lipídios totais e proteínas totais)

2.1 - Lipídios Totais

Foram determinados através do método de Frings *et al.* (1972) os lipídios totais do plasma, que são dosados diretamente, não necessitando de prévia extração, como ocorre com outros tecidos. Para os tecidos que necessitam de prévia extração, foi utilizado o método de Folch *et al* (1957) adaptada por Parrish (1999) para amostras de organismos aquáticos. Para fígado, músculo branco e gônadas, 100mg de tecido foram pesados em balança de precisão, com sensibilidade para 0,0001g. Já para músculo vermelho, foram pesados 50 mg de tecido na mesma balança.

Em seguida foi adicionado 2 ml de solução de clorofórmio:metanol (2:1) e 0,5 ml de água, e as amostras foram homogeneizadas em microprocessador Sentry TM modelo Tempest I.Q.², a 25.000 rpm, por 45 segundos. Após a homogeneização, as amostras foram transferidas para tubos de ensaio com tampa de teflon, e os frascos utilizados na extração foram lavados com mais 1 ml de clorofórmio, para evitar perda de lipídios que ficariam retidos nas paredes do frasco. Os tubos com tampa de teflon contendo as amostras homogeneizadas foram centrifugados a 3.000 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, a camada orgânica (inferior) foi removida através da técnica das 2 pipetas. Esta técnica consiste em colocar uma pipeta Pasteur longa dentro de

outra curta. Com esta pipeta curta, a camada inferior é retirada e transferida para outro frasco. A pipeta curta foi lavada com clorofórmio, e o processo foi repetido por 3 vezes, para extração total dos lipídios teciduais. Os extratos finais foram transferidos para frascos menores, e as amostras foram evaporadas em estufa por 12 horas a 55°C. Após a evaporação, as amostras foram re-suspendidas em 1 ml de clorofórmio e agitadas em Vórtex por 30 segundos, para re-suspensão completa e posterior dosagem.

Para a determinação dos lipídios totais foram pipetados 20ul de plasma ou do extrato já re-suspendido obtido do método de Folch, e no caso das amostras de músculo branco, foi pipetado 100ul, que foram acrescentados a um tubo de ensaio e adicionados de 200 ul de ácido sulfúrico concentrado. Os tubos foram levados a um banho fervente por 10 minutos e em seguida, adicionado 5 ml do reagente de fosfovanilina (vanilina + ácido fosfórico + H₂O destilada). Os tubos foram novamente levados para banho, agora a 37°C, por 15 minutos e em seguida foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro, a 540nm. A quantidade de lipídios totais foi calculada contra uma curva padrão de óleo de fígado de bacalhau (Cod liver oil fatty acid methyl esters, SIGMA).

2.2 - Proteínas totais

A concentração de proteínas totais no plasma foi determinada pelo método de Lowry *et al.*, (1951). O teor protéico dos tecidos foi determinado pela mesma metodologia, após precipitação e solubilização das proteínas totais segundo metodologia de Milligan & Girard (1993). Na determinação de proteínas totais, o plasma foi inicialmente diluído (fator de diluição a ser determinado em experimentos piloto) com água destilada. Em tubos de ensaio foi adicionada mistura reativa (tartarato de sódio e potássio + sulfato de cobre + carbonato de sódio em hidróxido de sódio). Após 10 minutos, foi adicionado o reativo de Folin-Ciocalteu diluído (1:1) e após 30 minutos a absorbância foi lida em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 660nm, contra uma curva padrão de albumina sérica bovina (serum bovine albumine, Sigma).