Aline Dal'Olio Gomes

Aspectos metabólicos e endócrinos do ciclo reprodutivo de cecílias dermatófagas *Siphonops annulatus* (Amphibia, Gymnophiona, Caeciliidae) mantidas em cativeiro

São Paulo

2010

Aline Dal'Olio Gomes

Aspectos metabólicos e endócrinos do ciclo reprodutivo de cecílias dermatófagas *Siphonops annulatus* (Amphibia, Gymnophiona, Caeciliidae) mantidas em cativeiro

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

Orientadora: Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira

São Paulo

2010

Ficha Catalográfica

Gomes, Aline Dal'Olio

Aspectos metabólicos e endócrinos do ciclo reprodutivo de cecílias dermatófagas *Siphonops annulatus* (Amphibia, Gymnophiona, Caeciliidae) mantidas em cativeiro. **120p**.

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

1. *Siphonops annulatus*; 2. Dermatofagia; 3. Ciclo reprodutivo; 4. Substratos energéticos; 5. Ácidos graxos; 6. Esteróides gonadais. I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia.

Comissão Julgadora

Prof. (a) Dr. (a)

Prof. (a) Dr. (a)

Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira

Orientadora

Dedico este trabalho:

aos meus pais Sandra e Cido, à minha irmã Edilene e ao meu querido Kadu, por todo apoio e amor ao longo desta jornada.

...com muito carinho!

Agradecimentos

"A resposta certa, não importa nada: o essencial é que as perguntas estejam certas."

Mário Quintana

Primeiramente à minha orientadora Dra. Renata Guimarães Moreira por despertar em mim a paixão pela Ciência e por me fazer acreditar que no final tudo dá certo, mesmo que não seja como planejamos. Obrigada pela orientação e pelos ensinamentos, além da confiança que depositou em mim todos esses anos. A realização desse trabalho deve-se muito a sua dedicação e toda sabedoria conquistada até aqui. Além disso, agradeço pela amizade, preocupação e pela presença constante em todos os momentos. Deixo expresso aqui toda a minha admiração e respeito pela profissional e pessoa que é. Muito obrigada!

Ao prof. Dr. Carlos Navas, responsável por nos inserir no mundo magnífico dos Anfíbios e por nos fazer acreditar que o N nunca seria um problema.

Aos profs. Dr.Carlos Jared e Dra. Marta Antoniazzi, do Instituto Butantan, por confiarem a mim as interessantes e desconhecidas Siphonops annulatus. Agradeço por toda ajuda nas coletas, por todas as discussões, além do aprendizado sobre a fantástica vida das Gymnophiona. Meus agradecimentos também aos seus alunos e, em especial à Simone, responsável por cuidar tão bem das cecílias em cativeiro.

Aos mateiros da CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira) por ajudarem nas coletas de Siphonops annulatus em campo e tornar a permanência na Mata Atlântica ainda mais agradável e interessante: Zé Abad e Luizinho.

A todos os integrantes do LAMEROA: Amanda Narcizo, Bianca Kida, Bruno Cavalheiro, Carlos Eduardo Garcia (Jaboti), Carlos Eduardo Tolussi (Kadu), Carolina Pozzebom, Cristiéle Ribeiro, Jandyr Rodrigues Filho, Larissa Suzuki, Juliane Suzuki, Paulo Mello, Renato Honji, Tiago Gabriel e Vanessa Vieira, por estarem sempre presente me auxiliando no laboratório; dando dicas, sugestões e ótimas críticas; além de broncas e risadas; viagens, festas, ou simplesmente uma boa conversa. Vocês todos tiveram grande importância na minha caminhada, nada seria igual sem vocês.

Aos técnicos, funcionários, professores e amigos do Departamento de Fisiologia da USP pela colaboração e auxílio sempre que necessário, seja resolvendo problemas burocráticos; dividindo conhecimentos; participando de comissões, monitorias, disciplinas e Curso de Inverno; ou apenas nos distraindo durante o café.

À Dra. Nora Ceballos, da Universidade de Buenos Aires, por ceder seu laboratório para a realização das análises dos esteróides gonadais. Agradeço por toda paciência e atenção que dedicou a mim naqueles dias. Meus sinceros agradecimentos também as suas alunas: Alina, Clara, Eleonora e Florência. Saludos!

À Dra. Fabiana Lo Nostro, da Universidade de Buenos Aires, por toda preocupação e atenção, além de ajudar na identificação de estruturas histológicas. Muchas gracías!

À FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) pela bolsa concedida (Processo 07/57107-0) durante o período desta pesquisa.

Aos meus professores e queridos amigos da Universidade de Mogi das Cruzes, onde tudo começou, e especialmente àqueles que ainda fazem parte da minha vida, mesmo que distantes: Bandido (vulgo Daniel), Cristine, Débora, Gabriel, Marcus e Thiago.

À mais movimentada República CrisLiBertaFá, composta por pessoas queridas, com quem pude contar todo esse tempo de vida Paulistana, aguentaram meu estresse, me apoiaram e riram comigo.

Aos amigos de longa data, especialmente a Carolzinha, e tantas pessoas querida que nestes anos me assistiram, apoiaram e incentivaram.

Ao meu querido Kadu, pelo apoio e incentivo em todas as etapas do trabalho, pelo seu amor, carinho, amizade e companheirismo. Obrigada por ser tão presente em minha vida e estar sempre ao meu lado.

Aos meus pais e minha irmã que sempre apoiaram e incentivaram os meus estudos. Obrigada por acreditarem no meu trabalho e me ensinarem a base da vida para que eu não desistisse dos meus objetivos: amor, confiança e determinação. À toda a minha família (avós, avô, meu sobrinho querido, tios, tias, primos, primas e meu cunhado preferido) por tornarem alegres os meus momentos em família e por acreditarem em mim. Agradeço também a D. Adelina quem me adotou como filha e torceu muito comigo.

Enfim, minha sincera gratidão a todas as pessoas que, com amizade e seriedade, colaboraram para a realização desse trabalho.

Muito obrigada!

Índice

Lista de Abreviações.....i

Lista de Tabela.....iv

Lista de Figuras.....v

Resumo.....xi

Abstract.....xiii

1- Introdução.....1

1.1 - Biologia reprodutiva de Gymnophiona.....04

1.2 – A espécie modelo – *Siphonops annulatus*.....06

2- Objetivos.....07

2.1- Objetivo geral.....07

2.2- Objetivos específicos.....07

3- Material e Métodos.....08

3.1- Manutenção dos animais.....08

3.2- Obtenção das amostras.....08

3.3- Análises histológicas.....09

3.4- Análises metabólicas.....09

3.4.1- Extração de lipídios totais.....09

3.4.2- Quantificação dos lipídios totais.....09

3.4.3- Separação das classes lipídicas.....10

3.4.4- Metilação e composição dos ácidos graxos.....10

3.4.5- Extração de proteínas totais.....11

3.4.6- Quantificação de proteínas totais.....11

3.5- Análises de esteróides gonadais.....11

3.5.1- Estradiol.....12

3.5.2- Progesterona e Testosterona.....12

3.6 – Análises estatísticas.....13

4 – Resultados.....18

4.1- Parâmetros ponderais e morfométricos.....18

4.2- Desenvolvimento gonadal.....19

4.2.1- Anatomia do sistema reprodutor feminino.....19

4.2.2- Oogênese.....19

4.2.3- Anatomia do sistema reprodutor masculino.....20

4.2.4- Espermatogênese.....21

4.3- Substratos energéticos.....22

4.3.1- Lipídios totais.....22

4.3.2- Proteínas totais.....24

4.3.3- Ácidos graxos.....25

4.3.3.1- Ácidos graxos totais do tecido adiposo.....26

4.3.3.2- Fosfolipídios.....27

4.3.3.3- Ácidos graxos totais plasmáticos.....29

4.4- Esteróides gonadais.....30

5 – Discussão.....69

5.1 – Sazonalidade.....69

5.2 – Parâmetros morfológicos.....70

5.2.1 – Anatomia do sistema reprodutor feminino e oogênese..... 72

5.2.2 – Anatomia do sistema reprodutor masculino e espermatogênese..... 76

5.3 – Parâmetros metabólicos.....80

5.3.1 – Padrão de deposição e mobilização dos lipídios.....80

5.3.2 - Padrão de deposição e mobilização das proteínas.....85

5.3.3 – Perfil de ácidos graxos teciduais e plasmáticos.....86

5.3.4 – Diferenças entre os sexos no padrão de deposição dos substratos.....94

5.4 – Esteróides gonadais em fêmeas e machos.....96

6- Considerações finais.....101

7 – Referências bibliográficas.....104

Lista de Abreviações

AA – Ácido araquidônico

AG – Ácido Graxo

AI – Área Intersticial

Am – Célula Amebóide

C – Cabeça

Ca - Cauda

CF – Camada Folicular

Cg – Cápsula Gonadal

CG – Célula Germinativa

CL – Corpo Lúteo

Ct – Citoplasma

CM – Célula Mióide

CS – Célula de Sertoli

Co – Corpo Gorduroso

DC – Ducto Coletor

DE – Ducto Espermático

DHA – Ácido docosahexanóico

DHT - Dihidroxitestosterona

DL – Ducto Longitudinal

DT – Ducto Transversal

ED – Epitélio do Ducto

EPM – Erro Padrão da Média

EPA – Ácido eicosapentanóico

E_2 - Estradiol

E_2-^{3}H – Estradiol Radioativo

Fl – Flagelo

FL – Fosfolipídio

FSH – Hormônio Folículo Estimulante

GC – Cromatógrafo Gasoso

Gn – Camada Granulosa

Gr – Grânulo de Vitelo

GnRH – Hormônio liberador de Gonadotropina

HCl – Ácido Clorídrico

He – Hemácia

^{3}H – Trítio

IGS – Índice Gonadossomático

IHS – Índice Hepatossomático

In – Intestino

KOH – Hidróxido de Potássio

LB – Lóbulo

LH – Hormônio Luteinizante

LO – Lobo

M – Porção Mediana

Ma – Matriz lipídica

Mb – Membrana Basal

MUFA – Ácido Graxo Monoinsaturado

Noo – Ninho de Oogônias

Nu – Núcleo

n3 – Ômega 3

n6 – Ômega 6

Od – Oviduto

Oo - Oócito

OoI – Oócito I

OoII – Oócito II

OoIII - Oócito III

Ov – Ovário

PCA – Ácido Perclórico

PG – Célula Pré-granulosa

PUFA – Ácido Graxo Polinsaturado

RIA – Radioimunoensaio

RI – Rim

SFA – Ácido Graxo Saturado

Sg – Capilar Sanguíneo

SC – Espermatócito

SCp – Espermatócito Primário

SCs – Espermatócito Secundário

SMr – Espermátide Arredondada

SM – Espermátide Alongada

SP – Espermatogônia Primária

SS – Espermatogônia Secundária

SZ - Espermatozóide

T – Testosterona

TAG - Triacilgliceróis

TE - Testículo

Tc – Camada Teca

TG – Tecido Gonadal

VTG - Vitelogenina

ZP – Zona Pelúcida

3β-HSD - 3β Hidroxiesteróides Desidrogenase

Lista de Tabelas

Tabela 1: Perfil de ácidos graxos da dieta oferecida a *Siphonos annulatus* em cativeiro.

Tabela 2: Parâmetros ponderais e morfométricos de fêmeas e machos de *Siphonops annulatus* coletados ao longo do ciclo anual (Média ± EPM).

Tabela 3: Nomenclatura dos ácidos graxos encontrados nas amostras de *Siphonops annulatus* de acordo com as regras da IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*)

Tabela 4: Perfil de ácidos graxos totais (%) do tecido adiposo em fêmeas e machos de *Siphonops annulatus* ao longo do ciclo anual (Média ± EPM).

Tabela 5: Perfil de ácidos graxos (%) da fração polar hepática em fêmeas e machos de *Siphonops annulatus* ao longo do ciclo anual (Média ± EPM).

Tabela 6: Perfil de ácidos graxos (%) da fração polar muscular de fêmeas e machos de *Siphonops annulatus* ao longo do ciclo anual (Média ± EPM).

Tabela 7: Perfil de ácidos graxos (%) da fração polar gonadal de fêmeas e machos de *Siphonops annulatus* ao longo do ciclo anual (Média ± EPM).

Tabela 8: Perfil de ácidos graxos (%) da fração polar dérmica de fêmeas e machos de S*iphonops annulatus* ao longo do ciclo anual (Média ± EPM).

Tabela 9: Perfil de ácidos graxos (%) da fração polar do encéfalo em fêmeas e machos de *Siphonops annulatus* ao longo do ciclo anual (Média ± EPM).

Tabela 10: Perfil de ácidos graxos totais (%) plasmáticos de fêmeas e machos de *Siphonops annulatus* ao longo do ciclo anual (Média ± EPM)

Lista de Figuras

Figura 1: Espécie, local de origem, manutenção dos animais e procedimento experimental. **A)** *Siphonops annulatus.* **B)** Plantação de cacau na Mata Atlântica, Ilhéus-BA. **C)** Caixa de plástico com volume de 100 litros, contendo substrato como solo, folhagem e cascas de coco utilizada para manutenção de *S. annulatus* em cativeiro. **D)** Biometria de *S. annulatus.* **E)** Obtenção de dados ponderais de *S. annulatus*. F) Coleta de amostras teciduais de *S. annulatus*.

Figura 2: Cromatograma de uma amostra padrão (SUPELCO, 37 *components*) utilizado como comparação para identificar os ácidos graxos das amostras teciduais e plasmáticas de *S. annulatus.*

Figura 3: Análise macroscópica dos ovários de *S. annulatus.* **A)** Anatomia do sistema reprodutor feminino de *S. annulatus.* **B)** Corpos gordurosos aderidos aos oócitos. **Legenda:** Corpos gordurosos, Co; Intestino, In; Oviduto, Od; Oócitos, Oo; Ov, ovário.

Figura 4: Comparação entre os diferentes estádios gonadais encontrados nas fêmeas de *S. annulatus* ao longo do ciclo anual, mostrando o aumento progressivo do oócitos (A-C). Seta indica os ovários.

Figura 5: Oogênese inicial em *S. annulatus.* **A)** Ovário de *S. annulatus* mostrando ninhos de oogônias e oócitos do tipo I envolvidos por uma simples camada de células foliculares, a camada granulosa. Tecido gonadal conecta os oócitos. **B)** Ninhos de oogônias e células pré-granulosas presentes no tecido gonadal. **C-D)** Oócito I evidenciando a simples camada de células granulosas que formam a camada folicular. **Legenda:** Camada folicular, CF; Células pré-granulosas, PG; Citoplasma, Ct; Ninho de oogônias, Noo; Núcleo, Nu; Oócito I, OoI; Tecido gonadal, TG.

Figura 6: Vitelogênese inicial em *S. annulatus.* **A)** Oócito II de *S. annulatus* mostrando a camada folicular mais espessa sendo constituída por uma simples camada de células granulosas e uma camada mais espessa de células teca. Citoplasma granular devido à deposição inicial de vitelo. **B-C)** Comparação entre o oócito I e II evidenciando a

diferença das camadas foliculares. **Legenda:** Camada granulosa, Gn; Camada teca, Tc; Citoplasma, Ct; Ninho de oogônias, Noo; Núcleo, Nu; Oócito I, OoI; Oócito II, OoII.

Figura 7: Vitelogênese avançada em *S. annulatus.* **A)** Oócito III (vitelogênico) de *S. annulatus* envolvido por uma simples camada de células granulosas e uma espessa camada teca. Citoplasma contendo grande quantidade de grânulos de vitelo. **B-D)** Oócito envolvido por uma zona pelúcida, uma simples camada de células granulosas e uma espessa camada teca contendo cistos de células (seta vermelha). **Legenda:** Camada folicular, CF; Camada granulosa, Gn; Camada teca, Tc; Grânulos de vitelo, Gr; Núcleo, Nu; Oócito III, OoIII; Zona pelúcida, ZP.

Figura 8: Folículo atrésico de *S. annulatus.* A-B) Folículo atrésico apresentando as células da granulosa com hipertorfia, hiperplasia e vacuolizadas, ocupando o oócito inteiro. A camada teca apresentou-se reduzida nesta fase. Legenda: Células granulosas, Gn; Células Teca, Tc.

Figura 9: Análise macroscópica dos testículos de *S. annulatus.* **A)** Testículos alongados aderidos aos corpos gordurosos. **B)** Testículo dividido em lobos e lóbulos. **C)** Ductos longitudinais conectando os lobos testiculares e ductos transversais conectando os testículos aos rins. **Legenda:** Corpos gordurosos, Co; Ducto longitudinal, DL; Ducto transversal, DT; Lobos, LO; Lóbulos, LB; Rim, RI; Testículo, TE.

Figura 10: Comparação entre os diferentes estádios gonadais de machos de *S. annulatus* ao longo do ciclo anual, mostrando o aumento progressivo dos testículos com maior vascularização (A-C). Seta indica os testículos.

Figura 11: Quiescência sexual em machos de *S. annulatus.* **A)** Visão geral do lobo testicular de um macho em quiescência sexual mostrando a área intersticial aumentada e presença de espermatogônias e espermatócitos na periferia dos lóbulos imersos em uma matriz lipídica. **B)** Cistos germinativos mostrando espermatogônias primárias e secundárias e espermatócitos primários e secundários. **C)** Espermatogônias primárias isoladas na periferia do lóbulo com núcleo grande, arredondado e basófilo, e espermatogônias secundárias organizadas em cistos na periferia dos lóbulos. **D)** Espermatócitos primários organizados em 2 fileiras de células na periferia do lóbulo e,

espermatócitos secundários contendo núcleos menores e basófilos com início de uma disposição circular das células mais para o meio dos lóbulos. **Legenda:** Área intersticial, AI; Capilar sanguíneo; Sg, Cápsula gonadal, Cg; Células germinativas, CG; Ducto coletor, DC; Lóbulo, LB; Matriz lipídica, Ma; Espermatogônia primária, SP; Espermatogônia secundária SS; Espermatócito primário, SCp; Espermatócito secundário, SCs.

Figura 12: Espermatogênese ativa em machos de *S. annulatus.* **A)** Lobo testicular em espermatogênese ativa mostrando a área intersticial reduzida contendo os ductos coletores e diferentes tipos celulares. Os lóbulos consistem de cistos germinativos em diferentes fases de diferenciação (espermatogônias secundárias, espermatócitos, espermátides arredondas e alongadas) imersos em uma matriz lipídica. **B)** Lobo testicular em espermatogênse ativa mais avançada mostrando cistos germinativos com espermatogônias, espermatócitos, espermátides arredondadas e alongadas e espermatozóides nos ductos espermáticos que formam os ductos coletores na área intersticial. **Legenda:** Área intersticial, AI; Ducto coletor, DC; Ducto espermático, DE; Hemácias, He; Matriz lipídica, Ma; Espermatogônias secundárias, SS; Espermatócitos, SC; Espermátide arredondada, SMr; Espermátide alongada, SM.

Figura 13: Estrutura geral da espermatogênese em machos de *S. annulatus.* **A)** Ductos coletores e capilares sanguíneos contendo hemácias na área intersticial. Lóbulos testiculares envolvidos por uma membrana basal e células mióides aderidas à membrana. **B)** Célula de Sertoli na periferia do lóbulo envolvendo espermatogônias secundárias. **C)** Espermátides arredondadas dispostas em uma única fileira formando um círculo. **D)** Espermátide alongada contendo flagelo. **Legenda:** Área intersticial, AI; Célula mióide, CM; Célula de Sertoli, CS; Ducto coletor, DC; Flagelo, Fl; Hemácias, He; Matriz lipídica, Ma; Membrana basal, Mb; Espermatogônia secundária, SS; Espermátide arredondada, SMr; Espermátide alongada, SM.

Figura 14: Ducto espermático e coletor no testículo de *S. annulatus.* **A e B)** Ducto espermático contendo espermatozóides e células amebóides. Epitélio do ducto formando o ducto coletor na área intersticial. **C)** Espermatozóides compostos por uma cabeça, uma porção mediana e cauda. **Legenda:** Área intersticial, AI; Célula amebóide,

Am; Cabeça, C; Cauda, Ca; Ducto coletor, DC; Ducto espermático, DE; Epitélio do ducto, ED; M, Porção mediana; SZ, Espermatozóides.

Figura 15: Regressão nos testículos de machos de *S. annulatus.* **A)** Lobos testiculares em fase de regressão inicial caracterizada pela diminuição do diâmetro dos lóbulos e presença de cistos contendo estágios iniciais da espermatogênese, além de espermátides e espermatozóides remanescentes. **B)** Lobos testiculares em um estágio de regressão mais avançado, mostrando o tecido gonadal desestruturado, cistos vazios e rompidos e alguns espermatozóides remanescentes. **C)** Grande área intersticial e lóbulos contendo alguns cistos com espermátides arredondadas e alongadas, cistos rompidos e espermatozóides remanescentes no ducto espermático. **D)** Lóbulo com cistos rompidos e espermatozóides remanescentes no ducto espermático. **Legenda:** Área intersticial, AI; Matriz lipídica, Ma; Espermátide arredondada, SMr; Espermátide alongada, SM; Espermatozóide, SZ. Setas pretas apontam os cistos rompidos.

Figura 16: Lipídios totais em fêmeas de *S. annulatus* ao longo do ciclo anual. **A)** Lipídios totais teciduais (fígado, músculo, ovários e pele). **B)** Lipídios plasmáticos. [ab]Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas para fêmeas ao longo do ciclo anual.

Figura 17: Lipídios totais em machos de *S. annulatus* ao longo do ciclo anual. **A)** Lipídios totais teciduais (fígado, músculo, testículos e pele). **B)** Lipídios plasmáticos. [ab]Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas para fêmeas ao longo do ciclo anual.

Figura 18: Correlação de Pearson. **A)** Correlação entre IGS e lipídios ovarianos para fêmeas de *S. annulatus.* **B)** Correlação entre IHS e lipídios hepáticos para fêmeas de *S. annulatus.* **C)** Correlação entre IGS e lipídios testiculares para machos de *S. annulatus.* **D)** Correlação entre IHS e lipídios hepáticos para machos de *S. annulatus.*

Figura 19: Proteínas totais em fêmeas de *S. annulatus* ao longo do ciclo anual. **A)** Proteínas totais teciduais (fígado, músculo, ovários e pele). **B)** Proteínas plasmáticas. [ab]Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas para fêmeas ao longo do ciclo anual.

Figura 20: Proteínas totais em machos de *S. annulatus* ao longo do ciclo anual. **A)** Proteínas totais teciduais (fígado, músculo, testículos e pele). **B)** Proteínas plasmáticas. [ab]Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas para machos ao longo do ciclo anual.

Figura 21: Correlação de Pearson. **A)** Correlação entre IGS e proteínas ovarianas para fêmeas de *S. annulatus.* **B)** Correlação entre IHS e proteínas hepáticas para fêmeas de *S. annulatus.* **C)** Correlação entre IGS e proteínas testiculares para machos de *S. annulatus.* **D)** Correlação entre IHS e proteínas hepáticas para machos de *S. annulatus.*

Figura 22: Esteróides gonadais em fêmeas e machos de *S. annulatus* ao longo do ciclo anual. **A)** Estradiol. **B)** Testosterona. **C)** Progesterona. [ab] Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas para fêmeas e machos ao longo do ciclo anual. *Símbolos diferentes significam diferenças estatisticamente significativas entre os sexos.

Figura 23: Correlação de Pearson. **A)** Correlação entre as concentrações plasmáticas de testosterona e estradiol para fêmeas de *S. annulatus.* **B)** Correlação entre as concentrações plasmáticas de testosterona e estradiol para machos de *S. annulatus.*

Figura 24: Relação E2/T encontrada em machos e fêmeas ao longo do ciclo anual.

Figura 25: Representação esquemática do metabolismo de lipídios e proteínas teciduais e plasmáticos em fêmeas e machos de *S. annulatus* ao longo do ciclo reprodutivo. * dentro do quadro indica diferença estatística significativa para fêmeas (lado esquerdo) e para os machos (lado direito) ao longo do ciclo anual. ** fora do quadro indica diferença estatística significativa entre os sexos. NS indica que não houve diferença estatística significativa.

Figura 26: Representação esquemática do perfil de ácidos graxos dos fosfolipídios teciduais e plasmáticos em fêmeas e machos de *S. annulatus* ao longo do ciclo reprodutivo. * dentro do quadro indica diferença estatística significativa para fêmeas (lado esquerdo) e para os machos (lado direito) ao longo do ciclo anual. ** fora do

quadro indica diferença estatística significativa entre os sexos. NS indica que não houve diferença estatística significativa.

Figura 27: Esquema do ciclo reprodutivo de *Siphonops annulatus* mostrando as principais alterações dos substratos ocorridas em cada estação.

Resumo

De uma forma geral, animais ovíparos suprem sua prole somente com vitelo, composto principalmente por lipídios e proteínas. Em espécies de cecílias ovíparas e dermatófagas, as fêmeas mobilizam esses substratos energéticos para os ovários durante a vitelogênese e também utilizam esses mesmos compostos para a produção de uma pele mais espessa e nutritiva que servirá de alimento aos filhotes durante o cuidado parental. Em detrimento da grande importância do vitelo para o desenvolvimento de embriões e larvas, como apresentado, é curioso compreender como espécies ovíparas alocam parte da sua energia na produção de uma pele mais espessa, além de investirem na produção do vitelo. Desta forma, sendo as cecílias pouco conhecidas, é de grande importância entender os processos metabólicos e endócrinos envolvidos no armazenamento e na mobilização dos substratos energéticos ao longo do processo reprodutivo de machos e fêmeas, a fim de entender como ocorre o preparo das gônadas e da pele para a reprodução. Análises histológicas dos ovários e testículos foram realizadas, assim como a determinação de lipídios (e ácidos graxos dos fosfolipídios) e proteínas totais no fígado, músculo, gônadas, pele e plasma de machos e fêmeas de *S. annulatus* ao longo do ciclo anual. Além disso, a concentração plasmática dos esteróides gonadais (estradiol, testosterona e progesterona) foi também quantificada em ambos os sexos. De forma geral, oócitos em diferentes estágios de desenvolvimento foram encontrados nos ovários. A espermatogênese de *Siphonops annulatus* apresentou um padrão cístico como visto para os outros anamniotas, sendo o testículo formado por lobos que variam em número e tamanho. Com relação aos substratos energéticos, observamos que existe uma clara tendência em maior acúmulo de lipídios e proteínas nas gônadas das fêmeas que foram coletadas durante o inverno, caracterizadas por um desenvolvimento oocitário mais avançado, com a presença de oócitos vitelogênicos, sendo o mesmo observado para os machos. Em relação aos ácidos graxos, foi encontrado um padrão normalmente observado para os demais vertebrados, com a fração polar dos tecidos composta principalmente por ácidos graxos polinsaturados n6 em ambos os sexos. Destaca-se nas fêmeas uma grande mobilização de ácidos graxos dos tecidos de reserva para os ovários, principalmente os ácidos graxos polinsaturados, que são de grande importância para a vitelogênese e embriogênese. Alterações dos substratos no tecido dérmico da fêmea também foram observadas na primavera e no verão, sugerindo a importância deste tecido na dermatofagia. As análises hormonais demonstraram poucas variações ao longo do ano para ambos os sexos, devido à grande

variação individual. Contudo, os valores de estradiol, testosterona e progesterona tendem a ser maiores para as fêmeas no inverno e para os machos durante a primavera. Os dados sugerem que o processo reprodutivo em *S. annulatus* mantida em cativeiro envolveu um processo de reostase programada, pois mesmo não havendo condições ambientais ideais, as fêmeas e os machos apresentam uma "memória metabólica" capaz de prepará-los para a reprodução. No entanto, o ambiente proporcionado pelo cativeiro suprimiu a ocorrência das fases finais do ciclo reprodutivo, como ovulação e cópula, resgatando o clássico conceito de reostase reativa.

Abstract

Usually, oviparous animals keep their offspring only with yolk that is composed mostly of lipids and proteins. In oviparous and dermatophagic caecilians species, the females mobilize these energetic substrates to the ovaries during the vitellogenesis and also use these compounds to produce a ticker and nutritive skin that will be used as food for the offspring during parental care. In detriment of the great importance of the yolk to development of the embryos and larvae, as presented, it is curious to figure out how oviparous species allocate part of its energy to produce a thicker skin, beyond from investing in the production of yolk. Considering that caecilians are poorly known, it is important to understand the endocrine and metabolic processes involved in the storage and mobilization of energetic substrates during the reproductive process of males and females, in order to comprehend how the gonads and skin become ready for reproduction. Histological analysis of ovaries and testes were performed, as well as, total lipids (and fatty acids from phospholipids) and protein in liver, muscle, gonads, skin and plasma of males and females of *S. annulatus* during the annual cycle. Additionally, the plasma concentrations of gonadal steroids (estradiol, testosterone and progesterone) were quantified in both sexes. In general, oocytes at different stages of development were found in the ovaries. The spermatogenesis of *Siphonops annulatus* presented a cystic pattern as seen for other anamniotas, and the testes were formed by lobes which vary in number and size. Considering the energetic substrates, there is a clear tendency to a greater accumulation of lipids and protein in the ovaries in females collected in the winter, that were characterized by a more advanced stage of oocyte development, with the presence of vitellogenic oocytes. The same was observed for the males. Regarding to fatty acids, it was found a pattern commonly observed for others vertebrates, with the polar fraction of the tissues composed mainly by n6 polyunsaturated fatty acids in both sexes. It is important to highlight in females a great mobilization of fatty acids from the storages tissues to the ovaries, mainly the polyunsaturated fatty acids, which are of great importance for vitellogenesis and embryogenesis. Alterations in the energetic substrates of the dermal tissue of the female were also observed in spring and summer, suggesting the importance of this tissue in dermatophagy. The hormonal assays showed little variation throughout the year for both sexes, due to the large individual variation. However, the concentrations of estradiol, testosterone and progesterone have a clear tendency of being higher for females in the winter, and for males during the spring. The data suggests that the reproduction in *S.*

annulatus maintained in captivity involved a programmed rheostasis process, because, even without the ideal environmental conditions, males and females presented a "metabolic memory", that was enough to prepare the animals for reproduction. However, the environment provided by the captivity suppressed the occurrence of the final phases of the reproductive cycle, as ovulation and copulation, rescuing the classical concept of reactive rheostasis.

1. Introdução

A reprodução é a característica mais conspícua da biologia dos anfíbios, considerando principalmente que muitas espécies são vistas apenas durante o período reprodutivo (WELLS, 2007). Os anfíbios foram os pioneiros na colonização do ambiente terrestre, assim os três grupos de anfíbios modernos mostram uma tendência à terrestrialização da reprodução (DUELLMAN & TRUEB, 1994). Deste modo, a maioria dos anfíbios apresenta um padrão de história de vida com ovos e larvas aquáticas que se metamorfoseiam em adultos terrestres (WELLS, 2007). Adicionalmente, os anfíbios se destacam pela grande diversidade de modos reprodutivos e cuidados parentais, o que pode ser observado nas três ordens que compõem a classe Amphibia: Anura (sapos, rãs e pererecas), que apresentam oviparidade com desenvolvimento direto e indireto; Caudata (salamandras) com oviparidade e desenvolvimento direto e indireto e, Gymnophiona (cecílias) que possuem tanto oviparidade quanto viviparidade (HICKMAN *et al.*, 2004 e POUGH *et al.*, 2003).

Em geral, os padrões reprodutivos estão correlacionados as condições prevalentes do ambiente. Em hábitats equatoriais com um clima constantemente quente e úmido, os anfíbios podem se reproduzir o ano todo. Em regiões com estações marcadas de seca e chuva, por exemplo, no sul da Índia, a estação reprodutiva da maioria dos anfíbios coincide com as monções de chuva, mas a desova pode ocorrer fora desse período. Basicamente, os anfíbios tropicais são capazes de se reproduzir o ano todo, contudo a alteração anual nas condições ambientais estabelece os ciclos reprodutivos. A variação sazonal da precipitação parece ser o principal fator que induz a periodicidade da atividade reprodutiva. O grau de estabelecimento dessa periodicidade varia entre as espécies, bem como entre as populações, mas a tendência da sazonalidade reprodutiva parece ser uma característica básica para a função gonadal em anfíbios (JORGENSEN, 1992).

Deste modo, o sucesso da reprodução na maioria dos anfíbios requer uma coordenação de diferentes processos internos juntamente às alterações dos eventos externos. Obviamente, machos e fêmeas devem estar fisiologica e comportamentalmente preparados para a cópula ao mesmo tempo. Assim, uma rede complexa de mecanismos neurais e hormonais integra as condições ambientais aos processos internos (POUGH *et al*., 1998). Como descrito para outros vertebrados, esses fatores externos atuam como sinalizadores na indução e liberação de hormônios reprodutivos que agem na resposta dos órgãos alvos. Como já foi visto a temperatura, o

fotoperíodo e a chuva parecem atuar como principais estímulos para o comportamento reprodutivo de anfíbios de zona temperada e tropical (POUGH *et al*., 1998). Esses sinais ambientais estimulam o hipotálamo a sintetizar e liberar o hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH), que por sua vez estimula as células gonadotrópicas da hipófise a sintetizar e liberar o hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH). Nas fêmeas o FSH é responsável pela produção do 17β-estradiol (E_2) na camada folicular do oócito, que age no fígado estimulando a síntese da vitelogenina (VTG). Adicionalmente, o LH estimula a produção de progesterona na camada folicular do oócito, sendo este o hormônio efetivo da maturação final e ovulação na maioria dos vertebrados (NORRIS, 2007).

Nos machos, o controle da reprodução é semelhante ao descrito para fêmeas. O FSH e o LH estimulam a produção dos andrógenos, testosterona (T) e 11-ceto-testosterona, pelas células de Leydig nos testículos (NORRIS, 2007), que promovem a espermatogênese. Em resposta a ação do LH ocorre a produção de progestágenos nas gônadas, que tem relação com a motilidade dos espermatozóides. Em anfíbios e répteis, o hormônio 5-dihidroxitestosterona (DHT) representa também um dos principais andrógenos envolvidos na reprodução (CANOSA *et al*., 2003; LIND *et al*., 2010).

Estudos mais recentes com anuros e cecílias têm demonstrado a presença e a distribuição neuroanatômica de diferentes formas de GnRHs (RASTOGI *et al*., 1998; MIRANDA, *et al*., 1998; EBERSOLE & BOYD, 2000). Os dados para muitas espécies de anfíbios indicam que, como em outros vertebrados, o GnRH estimula a síntese e secreção de gonadotropinas (LICHT & PORTER, 1987; STAMPER & LICHT, 1993). Em geral, a atividade esteroidogênica dos anfíbios parece não diferir dos outros vertebrados, sendo que as vias enzimáticas envolvidas na síntese de estrógenos, progestágenos e andrógenos exibem muita similaridade com aquelas reportadas para mamíferos (KWON & AHN, 1994; MEDINA *et al*., 2004; ZOHAR *et al*., 2010; LIND *et al*., 2010).

Um dos processos mais importantes envolvidos na reprodução é a vitelogênese, que consiste na síntese de vitelogenina, uma glicolipofosfoproteína produzida nos hepatócitos em resposta à cascata endócrina já apresentada. No plasma, a VTG é transportada e é especificamente incorporada ao oócito por endocitose. No oócito, a molécula é clivada em proteínas de vitelo, sendo que na maioria dos vertebrados, incluindo os anfíbios, estas proteínas são a lipovitelina e a fosvitina (WILEY &

WALLACE, 1981; DAVIS *et al.*, 2007). Deste modo, os lipídios e as proteínas, provenientes dos órgãos de reserva, compõem a maior parte da VTG. Os lipídios representam a fonte de energia predominante durante a embriogênese, provendo também um componente estrutural principal para o desenvolvimento do embrião, especialmente na forma de fosfolipídios (FL) (THOMPSON & SPEAKE, 2006).

A maioria desses fosfolipídios presentes no vitelo é rica em ácidos graxos polinsaturados (PUFAs) que suportam o crescimento tecidual dos embriões, enquanto os lipídios neutros, triacilgliceróis (TAG), são utilizados como reserva energética para o desenvolvimento embrionário (YARON & SIVAN, 2006). Os principais PUFAs, componentes dos fosfolipídios de membranas, envolvidos no desenvolvimento dos embriões são: o ácido araquidônico (20:4n6, AA) e o ácido docosahexanóico (22:6n3, DHA). Nos embriões de aves são encontrados valores altos de AA nos lipídios do fígado e coração (SPEAKE *et al.*, 2002). O DHA está presente em grandes quantidades em larvas de peixes e nos embriões das aves durante os primeiros estágios de crescimento, sendo importante também nos tecidos neurais e na retina, agindo como uma barreira biofísica apropriada ao desenvolvimento dos neurônios e fotorreceptores (OLSEN, 1999; SPEAKE *et al.*, 2002). O perfil de PUFAs do vitelo pode ser afetado pela composição da VTG que está intimamente associada à dieta materna, e também é dependente de fatores metabólicos, os quais diferem entre as espécies (SPEAKE *et al.*, 2002).

Em geral, 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 substratos um eficiente armazenador energético, sendo o mais significante em muitos animais. Os padrões de armazenamento de lipídios e sua utilização podem refletir a história de vida de um grupo de animais, sendo o tecido adiposo o local de deposição primária deste substrato. O armazenamento de lipídios no fígado e músculo é secundário e provavelmente é influenciado pelo padrão de história de vida do animal (SHERIDAN, 1994).

Os lipídios são sintetizados e depositados em diferentes tecidos e podem ser também transportados para os diferentes órgãos pelas lipoproteínas. Os lipídios transportados no sangue resultam de três fontes: dieta, o qual é agregado na mucosa intestinal e transportado no sangue como quilomícron; os lipídios endógenos, que são processados no fígado e transportados no sangue principalmente como uma lipoproteína de densidade muito baixa; e os lipídios mobilizados dos locais de depósito,

principalmente como ácidos graxos livres (SHERIDAN, 1994). O armazenamento dos lipídios é feito pela ação de uma lipase lipoprotéica, que hidroliza os lipídios transportados em ácidos graxos e glicerol. Estes se difundem para as células de reserva, onde ocorre o armazenamento na forma de triacilgliceróis que são ressintetizados por lipases localizadas no retículo endoplasmático (SHERIDAN, 1988). Deste modo, durante a vitelogênese nos vertebrados, os lipídios armazenados são mobilizados dos diferentes órgãos de reserva para o fígado, sob a ação do estradiol, onde são agrupados a proteínas e outros compostos formando a VTG que servirá de fonte energética e estrutural para o desenvolvimento dos embriões.

1.1 Biologia reprodutiva de Gymnophiona

A biologia e a diversidade reprodutiva das cecílias tropicais é menos conhecida do que a de salamandras e anuros. A ordem Gymnophiona inclui 174 espécies divididas em 3 famílias (Caeciliidae, Ichthyophiidae e Rhinatrematidae) (FROST, 2009), que compreendem animais com distribuição estritamente tropical no Sudeste da Ásia, América Central e do Sul e África (JARED *et al*., 1999). Esses anfíbios são primordialmente fossoriais, com algumas espécies secundariamente adaptadas ao ambiente aquático. As cecílias são ápodes, sem qualquer vestígio da presença de membros, apresentando uma cauda reduzida e, em alguns casos ausente, e um único mecanismo de fechamento duplo de mandíbula. Devido ao hábito fossório da maioria das espécies, as Gymnophiona apresentam um sistema visual reduzido, um par de tentáculos sensoriais protráteis e um crânio altamente sólido (GOWER e WILKINSON, 2009). Apesar deste grupo ser conhecido por apresentar diversos hábitats ecológicos, morfologia, fisiologia e comportamento, a diversidade reprodutiva é pouco estudada.

Em geral, o sistema reprodutivo das cecílias é bem peculiar, os testículos e ovários possuem uma aparência segmentada, como é visto também em outros órgãos, os rins, corpos gordurosos e fígado. Os machos permanecem com os ductos *Mullerian* que se tornam glândulas funcionais relacionadas à reprodução. O órgão intromitente está presente em machos e permite a fertilização interna e o sistema genital das fêmeas é adaptado à oviparidade e viviparidade (EXBRAYAT & ESTABEL, 2006). Com relação ao controle endócrino da reprodução, alguns trabalhos demonstraram a relação entre o ciclo sexual de machos e fêmeas e as variações endócrinas nas células de Leydig dos testículos, nos folículos ovarianos e no corpo lúteo das fêmeas de espécies vivíparas, além da correlação entre as gônadas e outras glândulas endócrinas como a hipófise

(EXBRAYAT, 2006). Segundo Exbrayat & Estabel (2006) novos estudos sobre a biologia reprodutiva de Gymnophiona têm sido publicados nos últimos anos, mas de modo geral está ordem ainda é pouco conhecida. Geralmente, os trabalhos envolvem alguns indivíduos de poucas espécies e os estudos mais detalhados, que incluem monografias, são raros.

Entretanto, é bem estabelecido para as cecílias a presença da oviparidade, com uma larva aquática ou desenvolvimento direto, além da viviparidade (KUPFER *et al.* 2006a). Sabe-se então, que algumas cecílias depositam os ovos, contudo a viviparidade é amplamente distribuída na ordem. Nas espécies vivíparas, o crescimento inicial dos fetos é sustentado pelo vitelo contido no ovo no momento da fecundação, mas esse vitelo esgota-se muito antes que o desenvolvimento embrionário se complete. Assim, a energia que necessitam para terminar seu crescimento deve ser fornecida pela mãe (POUGH *et al.*, 2003). O feto obtém essa energia raspando o material rico em lipídio das paredes do oviduto, utilizando para isso dentes embrionários especializados (KUPFER *et al.*, 2006b). Em contraste, as cecílias ovíparas suprem sua prole só com vitelo, sendo que os ovos colocados devem conter todos os nutrientes requeridos para sustentar o desenvolvimento completo do embrião até a eclosão (POUGH *et al.*, 2003).

Adicionalmente, na década de 90, dentes na prole de cecílias ovíparas foram descritos. Estes jovens equipados com uma dentição especializada raspam e se alimentam da camada de pele (dermatofagia) transformada de sua mãe, que provê um suplemento rico em nutrientes para o desenvolvimento de sua ninhada (KUPFER *et al.*, 2006b). Em estudos realizados por Kupfer *et al.* (2006b) com *Boulengerula taitanus*, uma cecília ovípara com desenvolvimento direto e dermatofagia, foi observado que durante um mês de cuidado parental os jovens aumentaram seu comprimento total substancialmente, com média individual estimada em 1 mm/dia. Nenhum outro tipo de alimentação foi observado, comprovando que somente a ingestão da pele fornece nutrientes suficientes para o crescimento da prole. Além disso, a análise histológica da pele dessas cecílias mães demonstrou um acúmulo de lipídios nas camadas mais externas da epiderme, ou seja, as que são consumidas pela prole. Esta evidência sugere que o perfil de ácidos graxos desta pele possa ser de uma importância crucial na sobrevivência e crescimento dos filhotes. Segundo Jared (comunicação pessoal), quando os filhotes são separados de suas mães eles morrem, o que indica que o cuidado parental está associado à dermatofagia para esta espécie.

Em detrimento da grande importância do vitelo para o desenvolvimento de embriões e larvas, como apresentado, é curioso como espécies ovíparas alocam parte da sua energia na produção de uma pele mais espessa, que servirá de alimento para os filhotes recém nascidos, além de investirem na produção de um vitelo que possui uma rica fonte de nutrientes necessária ao desenvolvimento embrionário.

Com base nessas informações, consideramos de grande importância conhecer os processos metabólicos e endócrinos envolvidos no armazenamento e na mobilização dos substratos ao longo do processo reprodutivo de fêmeas e machos, a fim de entender como ocorre o preparo das gônadas e da pele para a reprodução e consequentemente, o cuidado parental das cecílias.

1.2 A espécie modelo – *Siphonops annulatus*

Siphonops annulatus é uma espécie da família Caeciliidae, exclusivamente fossorial (JUNQUEIRA *et al*., 1999) que vive em solo rico em húmus a uma profundidade de 20 cm. Esta espécie é amplamente distribuída na América do Sul, sendo encontrada no Brasil, principalmente em plantações de cacau no sul da Bahia, onde o ambiente é úmido e rico em matéria orgânica (JARED *et al*., 1999). São animais carnívoros, alimentando-se principalmente de grilos, cupins, lesmas e minhocas (POUGH *et al*., 2003). A pele destas cecílias secreta um muco com efeito antibacterial e antifúngico que parece servir para despistar predadores (SAWAYA, 1940).

Com relação à biologia reprodutiva, *S. annulatus* é uma espécie ovípara, na qual os embriões apresentam uma metamorfose muito rápida após a eclosão, adotando o ambiente terrestre sem passar por nenhuma fase aquática. Os ovos dessa espécie são transparentes e os embriões podem ser visto ao longo do seu desenvolvimento (JARED *et al*., 1999). As fêmeas apresentam cuidado parental associado à dermatofagia.

Os trabalhos realizados com *S. annulatus* abordam temas gerais dentro da biologia básica, principalmente no que se refere à descrição anatômica e histológica do aparelho genital de fêmeas e machos, mas não focam os aspectos metabólicos e endócrinos que são importantes para o entendimento dos processos reprodutivos da espécie.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

O objetivo do presente trabalho foi investigar o padrão de armazenamento, mobilização e utilização dos substratos energéticos e a influência das alterações hormonais envolvidas com a reprodução de *Siphonops annulatus* ao longo do ciclo anual.

2.2 Específicos

- Descrever, histologicamente, as alterações do tecido ovariano e testicular de *Siphonops annulatus* ao longo do ciclo anual*;*

- Analisar a deposição e a mobilização dos substratos energéticos (proteínas e lipídios) nos diferentes tecidos, bem como as alterações no perfil de ácidos graxos que compõem esses tecidos;

- Analisar a concentração dos esteróides gonadais envolvidos no processo de reprodução de *S. annulatus* ao longo do ciclo anual;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Manutenção dos animais

Para a condução do presente trabalho foram utilizadas cecílias da espécie *Siphonops annulatus* (Amphibian: Gymnophiona) (Fig. 1A) mantidas em cativeiro por aproximadamente cinco anos. Esses animais foram coletados em uma plantação de cacau na região da Mata Atlântica no município de Ilhéus-BA (Fig. 1B) e foram transportados para o biotério no Instituto Butantan, onde foram mantidos em caixas plásticas com um volume de 100 litros, tendo como substrato solo e folhagem (Fig. 1C). As cecílias eram alimentadas uma vez por semana com porções de carne (músculo de boi ou frango, coração de boi) além de ração de carne, frango e peixe. A composição de ácidos graxos da dieta é apresentada na tabela 1. As condições no cativeiro, como temperatura, fotoperíodo e umidade, foram mantidas constantes (23°C; Claro:Escuro natural, 90% de umidade) ao longo do ano.

3.2 Obtenção das amostras

Foram realizadas 6 coletas de machos (n=20) e fêmeas (n=21) de *S. annulatus*, que foram agrupados entre as 4 estações do ano (Verão, Outono, Inverno e Primavera), com uma média de 4 indivíduos de cada sexo por coleta. Os animais foram anestesiados com 0,5 mL de buetal sódico (tionembutal) e os dados morfométricos e ponderais foram registrados (Figs. 1D-E, Tab. 2). Posteriormente foi feita a decapitação dos indivíduos e as amostras de sangue foram coletadas pressionando o corpo do animal. Em seguida, essas amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos e o plasma separado em alíquotas, que foram congeladas imediatamente e preservadas a -80^{0}C até o processamento.

Após a coleta do sangue, os animais foram sacrificados e foram retiradas amostras do fígado, corpos gordurosos, músculo, gônadas, pele e encéfalo (Fig. 1F). Ambos os índices, gonadossomático (IGS) – expresso como a porcentagem da massa corpórea representada pelas gônadas [IGS=(massa das gônadas/massa corpórea total)x100] – e hepatossomático (IHS) – expresso como a porcentagem da massa corpórea representada pelo fígado [IHS=(massa do fígado/massa corpórea total)x100] foram registrados (Tab. 2). Posteriormente, as amostras teciduais foram também mantidas em freezer –80°C até o processamento. Para as análises histológicas, amostras

do terço médio das gônadas foram coletadas e fixadas em Bouin acético por 24 horas e em seguida transferidas para álcool a 70%.

3.3 Análises histológicas

Para as análises microscópicas, as amostras fixadas (ovários e testículos) foram processadas de acordo com a técnica rotineira de histologia (BEHMER *et al.*, 1976), que consiste na desidratação em álcool, diafanização em xilol e inclusão em *paraplast*. As amostras emblocadas foram cortadas em micrótomo (Leica RM 2255), obtendo-se cortes com 5µm de espessura, que foram corados com Hematoxilina-Eosina, sendo analisadas em microscopia de luz (Leica DM 1000) com um sistema de captura de imagens (Leica Application Suite Professional).

3.4 Análises metabólicas

3.4.1 Extração dos lipídios totais

As amostras dos tecidos foram retiradas do freezer e os lipídios totais foram extraídos de acordo com o método de Folch *et al.* (1957). As amostras foram pesadas e diluídas em uma solução contendo clorofórmio, metanol e água em uma proporção de 2:1:0.5 e, posteriormente homogeneizadas. O homogeneizado foi centrifugado a 1000 rpm por 5 minutos e foi retirada a fase líquida inferior, contendo os lipídios, através da técnica de dupla pipeta. O procedimento foi repetido mais duas vezes adicionando-se clorofórmio para remoção dos lipídios remanescentes. Posteriormente, o solvente foi evaporado utilizando-se nitrogênio e o extrato lipídico foi armazenado em freezer -20^{0}C para as posteriores análises.

3.4.2 Quantificação dos lipídios totais

A concentração dos lipídios totais plasmáticos e teciduais foi analisada pelo método colorimétrico de Frings *et al.* (1972), utilizando-se como padrão óleo de fígado de bacalhau (*Cod liver oil fatty acid methyl esters*, SIGMA). A solução padrão e as amostras foram ressuspendidas em clorofórmio e uma alíquota foi pipetada em tubos de ensaio. Os tubos foram mantidos em uma estufa a 70^{0}C por 15 minutos para evaporação do solvente. Ao extrato lipídico seco foi adicionado ácido sulfúrico concentrado e colocado em banho-maria a 100^{0}C por 10 minutos. Após o resfriamento, adicionou-se sulfofosfovanilina e os tubos foram mantidos em banho-maria a 35^{0}C por 15 minutos.

Posteriormente, as amostras foram lidas em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 540 nm. A concentração de lipídios totais foi calculada utilizando-se uma curva de óleo de fígado de bacalhau (*cod liver oil methyl esters*, Sigma Diagnostics). Os resultados foram expressos em mg/g para as amostras teciduais e mg/dL para as amostras plasmáticas.

3.4.3 Separação das classes lipídicas

O extrato lipídico dos tecidos (fígado, músculo, gônadas, pele e encéfalo) foi separado em lipídios neutros (triacilgliceróis) e polares (fosfolipídios) utilizando uma coluna de sílica ativada (YANG, 1995). Primeiramente, a sílica foi seca em uma estufa a 110^0C por 1 hora e então, colocada em pipetas Pasteur esterilizadas com lã de vidro na extremidade inferior. Para a remoção dos resíduos orgânicos presentes na sílica, clorofórmio e metanol foram pipetados no topo da coluna descartando-se o volume coletado na base. Posteriormente, foi pipetada a amostra diluída em clorofórmio seguida de 3mL da mistura de clorofórmio, metanol e ácido fórmico (99:1:0.5) para eluir os lipídios neutros, e 6 mL de metanol para eluir os lipídios polares. As frações correspondentes foram coletadas, evaporadas em nitrogênio e o extrato armazenado em freezer -20^0C para as posteriores análises.

3.4.4 Metilação e composição dos ácidos graxos

Cada fração polar lipídica foi metilada com cloreto de acetila (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, Fig. 2) e os resultados foram expressos em porcentagem (%).

Para a análise dos ácidos graxos foi utilizada uma programação no cromatógrafo com as características descritas a seguir. A leitura foi iniciada a uma temperatura de 170°C mantida por 1 minuto e em seguida por uma rampa de 2.5°C/minuto, até atingir a temperatura final de 220°C, que foi mantida por 5 minutos. O injetor e o detector foram mantidos a 250°C. Foi utilizada uma coluna CP Wax 52 CB, com espessura de 0.25 mm, diâmetro interno de 0.25um e 30 m de comprimento, tendo o hidrogênio como o gás de arraste.

3.4.5 Extração de proteínas totais

As amostras dos tecidos foram retiradas do freezer e as proteínas totais foram extraídas após precipitação e solubilização segundo Milligan & Girard (1993). As amostras foram pesadas e homogeneizadas com 5 volumes da solução de PCA (ácido perclórico). Após a homogeneização e centrifugação a 11.100 rpm em centrífuga eppendorf por 5 minutos, o precipitado foi ressuspenso em 4 volumes de PCA e o procedimento de centrifugação foi repetido mais 3 vezes. Em seguida, foram adicionados 14 volumes de KOH (hidróxido de potássio) e o precipitado foi mantido por 24 horas em agitação constante em temperatura ambiente.

3.4.6 Quantificação das proteínas totais

A concentração de proteínas totais dos tecidos foi analisada pelo método colorimétrico de Lowry *et al.* (1951). O solubilizado restante foi diluído 50 e 100 vezes (dependendo do tecido) com água destilada para dosagem protéica. O volume diluído foi pipetado em tubos eppendorfs e adicionado 1000 µL da mistura reativa (hidróxido de sódio + carbonato de sódio + tartarato de sódio e potássio + sulfato de cobre). Posteriormente, adicionou-se 100 µL de reagente Folin-Ciocalteu (1:1) e após 30 minutos as amostras foram lidas em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 660 nm. A concentração de proteínas totais foi calculada utilizando-se uma curva de albumina sérica bovina (*Bovine serum albumin*, Sigma Diagnostics) e os resultados foram expressos em mg/g para as amostras teciduais e mg/mL para as amostras plasmáticas.

3.5 Análises de esteróides gonadais plasmáticos

As concentrações plasmáticas dos esteróides gonadais, 17β-estradiol, progesterona e testosterona, foram quantificadas por radioimunoensaio de fase sólida, utilizando-se hormônios marcados com trítio (^{3}H). O princípio do radioimunoensaio baseia-se em uma reação imunológica *in vitro* entre um antígeno e um anticorpo. Com a adição do hormônio marcado (radioativo) este irá competir pelo mesmo anticorpo, em igualdade de condições, com o hormônio natural presente no plasma do animal. Desta forma, quanto menor a concentração de hormônio presente no plasma, maior quantidade do complexo anticorpo-hormônio radioativo será formada, com maiores valores de radioatividade. E ao contrário disso, havendo grandes concentrações de hormônio no

plasma, pouco complexo anticorpo-hormônio radioativo será formado e a radioatividade será baixa. Os resultados foram expressos em ng/mL.

A quantificação plasmática dos esteróides gonadais foi realizada em colaboração com a Profa. Dra. Nora Ceballos, na Universidade de Buenos Aires (Argentina).

3.5.1 Estradiol

A dosagem de estradiol nos distintos meios de incubação se realizou em duplicata com um volume final de 500µL de tampão para radioimunoensaio de estradiol (RIA E_2) em pH 7.4. Para a quantificação deste hormônio foi utilizada uma curva de calibração que se obteve incubando concentrações crescentes do hormônio frio de E_2 (6.25 a 800 pg/mL) em tampão RIA com uma quantidade fixa de E_2-^{3}H (4.54 nCi, NEN, Boston, MA) e do anticorpo (NEN, Boston, MA). A radioatividade total foi obtida incubando-se o marcador radioativo (E_2-^{3}H) na ausência do anticorpo e do carbono-dextrano. A união inespecífica foi determinada através da incubação do radioisótopo na ausência do anticorpo. A ligação máxima foi calculada na presença de E_2-^{3}H e anticorpo; com ausência de massa radioinerte.

A reação antígeno-anticorpo ocorreu a 4ºC entre 18-20 horas e posteriormente os tubos foram centrifugados. Os *pellets* de carbono-dextrano continham os esteróides livres e no sobrenadante se encontrava o complexo anticorpo-esteróide. A radioatividade presente foi medida em uma alíquota de 400 µL do sobrenadante usando líquido de cintilação e o contador para radiação gama (Wallac 1409 DAS, Wallac Co., Turku, Finland). Para a medição do estradiol foi utilizado um anticorpo policlonal (Universidade de Colorado, Colorado, USA).

3.5.2 Progesterona e Testosterona

A quantificação destes hormônios foi feita de maneira semelhante ao que foi descrito para o estradiol. A curva de calibração apresentou uma variação nas concentrações entre 60 e 3840 pg/mL. Foram utilizados 4.5 nCi do marcador radioativo (1,2,6,7-^{3}H(N)-T, NEN, Boston, MA) que possuía uma atividade específica de 80.4 µCi/mmol. O esteróide radioinerte e o radioativo foram diluídos em tampão para RIA T. A diluição final do anticorpo foi de 1:150.000. Neste caso, os limites de sensibilidade do ensaio foram entre 12.5 e 768 pg. Para a medição da testosterona se utilizou um anticorpo policlonal (Universidade de Colorado, Colorado, USA).

3.6 Análises estatísticas

A composição dos substratos energéticos e o perfil dos esteróides gonadais em fêmeas e machos foram comparados ao longo do ciclo anual. Testes de normalidade e homogeneidade de variância foram aplicados e quando cumpriram os requerimentos de uma análise paramétrica, os resultados foram comparados utilizando-se teste de Análise de Variância (one-way ANOVA) seguido do teste de Student-Newmann-Keuls (SNK) ($P<0.05$). As análises foram realizadas utilizando o programa estatístico Sigma-Stat 3.1.

Para a obtenção dos gráficos de correlação, os dados foram plotados no programa Excel e as retas de correlação, assim como os coeficientes de correlação (R^2) foram obtidos com base na inclinação da reta. As correlações de Pearson foram consideradas significativas quando $R^2<0.3$.

Figura 1: Espécie, local de origem, manutenção dos animais e procedimento experimental. **A)** *Siphonops annulatus.* **B)** Plantação de cacau na Mata Atlântica, Ilhéus-BA. **C)** Caixa de plástico com volume de 100 litros, contendo substrato como solo, folhagem e cascas de coco utilizada para manutenção de *S. annulatus* em cativeiro. **D)** Biometria de *S. annulatus.* **E)** Obtenção de dados ponderais de *S. annulatus*. **F)** Coleta de amostras teciduais de *S. annulatus*.

Tabela 1: Perfil de ácidos graxos da dieta oferecida a *S. annulatus* em cativeiro.

Ácidos graxos (%)	Coração de Boi	Filé de frango	Ração de galinha	Ração de carne	Ração de peixe
C14:0	0.6	0.6	0.7	0.4	1.4
C15:0	0.3	NE	0.1	NE	0.2
C16:0	13.0	20.5	21.7	18.1	21.6
C17:0	1.1	0.1	0.2	0.2	0.3
C18:0	25.8	8.4	9.4	9.9	7.5
C20:0	0.1	NE	0.1	0.2	0.2
SFA	**40.3**	**29.7**	**32.3**	**28.9**	**31.2**
C14:1c	0.4	NE	0.1	NE	0.1
C16:1	1.2	4.1	5.5	3.8	6.6
C17:1	0.6	NE	0.1	0.1	0.1
C18:1n9	24.6	32.4	37.1	36.8	31.8
C18:1n11	3.8	2.3	2.0	2.0	2.0
C20:1n9	NE	0.3	0.4	0.4	0.3
MUFA	**31.2**	**30.2**	**45.4**	**43.1**	**41.1**
C18:2n6	15.9	21.9	17.2	22.5	18.5
C18:3n6	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
C20:2n6	0.2	0.6	0.4	0.2	0.3
C20:3n6	0.5	0.7	0.4	0.3	0.3
C20:4n6	5.7	3.3	2.2	2.3	2.3
C22:4n6	NE	0.9	0.3	0.4	0.2
C22:5n6	NE	0.2	0.1	NE	0.2
PUFA n6	**22.5**	**28.0**	**20.8**	**26.0**	**22.0**
C18 n6	**16.1**	**22.1**	**17.3**	**22.7**	**18.7**
C20-22 n6	**6.4**	**5.9**	**3.5**	**3.3**	**3.3**
C18:3n3	2.1	1.3	0.8	1.2	1.0
C18:4n3	0.3	NE	NE	NE	0.2
C20:5n3	0.7	0.2	0.1	0.1	1.6
C22:5n3	0.7	0.6	0.2	0.2	0.3
C22:6n3	NE	0.4	0.2	0.1	2.3
PUFA n3	**3.9**	**2.5**	**1.4**	**1.8**	**5.5**
C18 n3	**2.4**	**1.3**	**0.8**	**1.2**	**1.3**
C20-22 n3	**1.4**	**1.2**	**0.5**	**0.5**	**4.2**
n3/n6	**0.1**	**0.09**	**0.07**	**0.07**	**0.2**
PUFA t	**26.4**	**30.5**	**22.2**	**27.8**	**27.6**

Valores abaixo de 0.1 não foram considerados. ∑SFA, ∑MUFA, ∑PUFA, ∑PUFAn6, ∑C18n6, ∑C20-22n6, ∑PUFAn3, ∑C18n3, ∑C20-22n3 e ∑PUFAt, são as somatórias dos ácidos graxos saturados, monoinsaturados, polinsaturados n6, cadeias curtas de polinsaturados n6, cadeias longas de polinsaturados n6, polinsaturados n3, cadeias curtas de polinsaturados n3, cadeias longas de polinsaturados n3 e polinsaturados totais. NE – não encontrado.

.

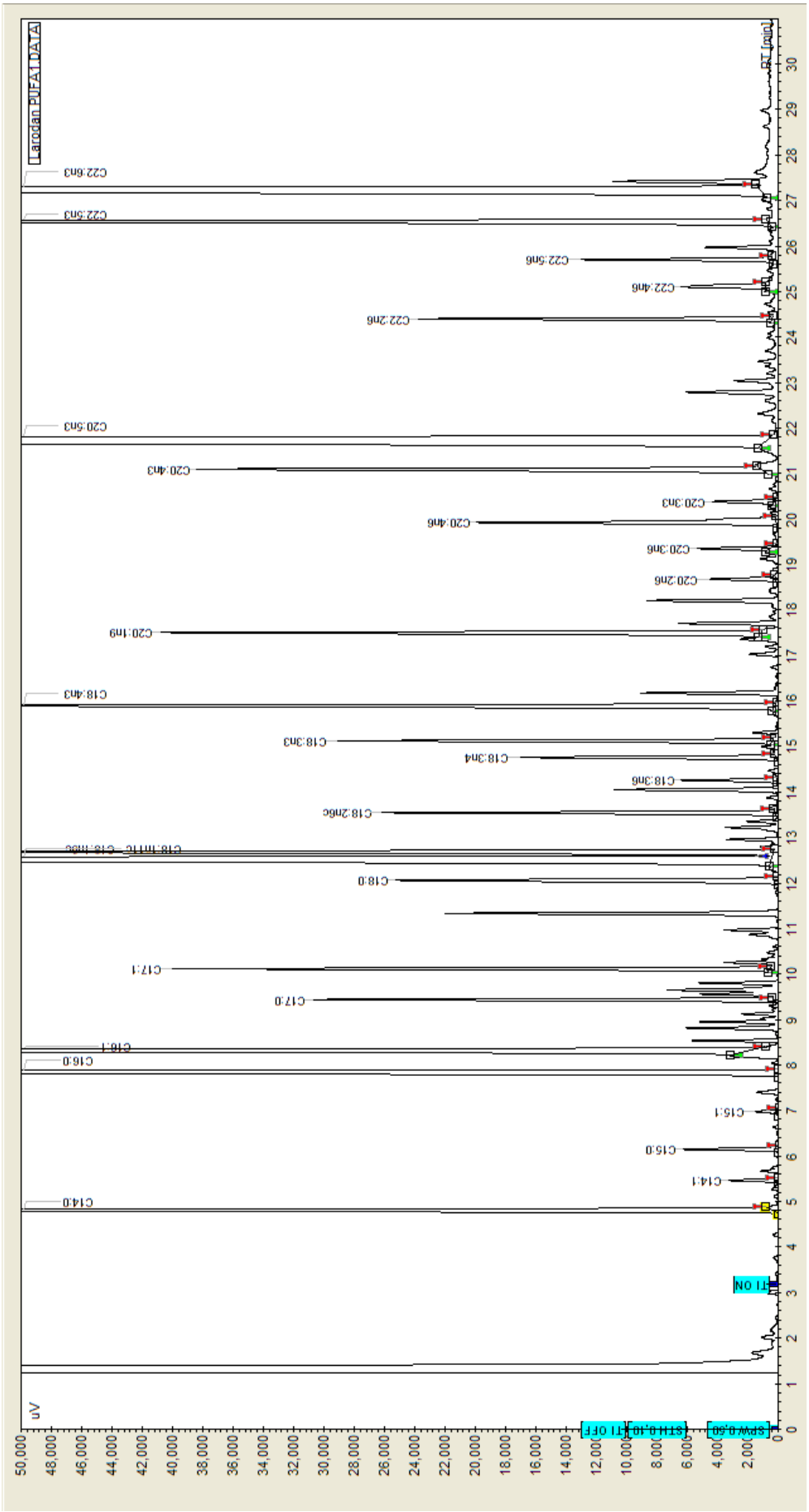


Figura 2: Cromatograma de uma amostra padrão (SUPELCO, 37 *components*) utilizado como comparação para identificar os ácidos graxos das amostras teciduais e plasmáticas de *Siphonops annulatus*.

4. RESULTADOS

Para todas as análises realizadas, os animais foram agrupados segundo a estação do ano na qual foram coletados: verão, outono, inverno e primavera. De acordo com os dados da literatura, as espécies de clima tropical, que seguem um regime sazonal reproduzem-se, preferencialmente, no verão. Contudo, *Siphonops annulatus*, a espécie eleita para o presente trabalho, apresenta o período reprodutivo iniciando em julho, que coincide com a estação chuvosa na Bahia, importante para a reprodução desses animais. As fêmeas e os machos das cecílias *S. annulatus* utilizadas no presente trabalho se apresentaram reprodutivamente ativos, com as gônadas desenvolvidas, no inverno, enquanto no verão identificamos apenas animais em regressão e/ou quiescentes, corroborando as observações em campo. Todas essas análises e considerações são apresentadas e discutidas abaixo.

4.1 Há alteração dos parâmetros ponderais e morfométricos em fêmeas e machos ao longo do ciclo anual?

4.1.1 Variação anual

Os dados ponderais (massa) e morfométricos (comprimento) de fêmeas e machos de *S. annulatus* coletados ao longo do ciclo anual estão apresentados na tabela 2. Podemos observar que não houve diferença estatística para os valores de massa corpórea e comprimento em fêmeas e machos ao longo do ano. Contudo, o valor do índice gonadossomático (IGS) foi maior para ambos os sexos durante o inverno em relação às outras estações estudadas (P=0.023 para fêmeas e P=0.001 para machos, tab. 2). Além disso, fêmeas e machos apresentaram também valores mais elevados do índice hepatossomático (IHS) durante o inverno, mas em comparação apenas à primavera (P=0.018 e P=0.012, respectivamente, tab. 2).

Adicionalmente, foi avaliado se as alterações dos valores de IGS e IHS para fêmeas e machos ao longo do ano apresentavam alguma correlação significativa, o que não foi observado em nenhum dos casos (R^2=0.014 para fêmeas e R^2=0.011 para machos).

4.1.2 Diferenças entre os sexos

Observando a tabela 2, podemos notar que durante o inverno as fêmeas tendem a apresentar maior massa corpórea e maior valor de IGS do que os machos. Entretanto, a

grande variação individual encontrada nos animais, principalmente entre as fêmeas, refletiu em um alto valor de erro padrão, resultando na ausência de diferença estatística para todas as variáveis comparadas entre os sexos (Tab. 2).

4.2 Como se dá o desenvolvimento gonadal em machos e fêmeas ao longo do ciclo anual?

4.2.1 Anatomia do sistema reprodutor feminino

O sistema reprodutor das fêmeas de *S. annulatus* é composto por um par de ovários alongados, um par de ovidutos (Fig. 3A) e uma cloaca. Corpos gordurosos estão intimamente associados às gônadas (Fig. 3B), sendo órgãos também segmentados e pareados (Fig. 4). De forma geral, os ovários estão dispostos lateralmente ao intestino, onde pequenos oócitos brancos estão arranjados verticalmente formando um colar de contas paralelo ao corpo (Fig. 3A).

Foi possível identificar diferenças macroscópicas nos ovários relacionadas ao estádio de maturação gonadal. As fêmeas com um grau menos avançado de maturação gonadal apresentaram um número de oócitos muito maior, mas de menor diâmetro (Figs. 4A e B). Ao contrário disso, fêmeas com um grau mais avançado de maturação, coletadas durante o inverno, apresentaram os ovários com um número de oócitos menor e com maior diâmetro (Fig. 4C).

4.2.2 Oogênese

Os ovários de *S. annulatus* eram compostos por células germinativas e estruturas foliculares em diferentes fases de maturação (Figs. 5-8). As oogônias, pequenas células arredondadas que possuem um núcleo grande, foram observadas em ninhos de células germinativas presentes no tecido gonadal que conecta os oócitos (Figs. 5A e B). Esses ninhos estavam distribuídos regularmente nos ovários e juntamente com as células germinativas foram vistas também as células pré-granulosas (Fig. 5C). Os oócitos I ou pré-vitelogênicos (Figs. 5A, C e D) apresentaram o citoplasma basófilo, com um núcleo grande e estavam envolvidos por uma simples camada de células foliculares, sendo possível identificar principalmente as células da granulosa. O oócito II era maior e o citoplasma se tornou fortemente basófilo (Fig. 6A) devido provavelmente à presença de grânulos de lipídios. Neste caso, esta fase pode ser considerada como vitelogênese inicial. Podemos observar também a presença de uma camada mais espessa de células

foliculares, sendo facilmente distinguida as camadas granulosa e teca (Figs. 6A-C). Adicionalmente, oócitos em um estágio mais avançado foram encontrados (Figs. 7A-D), e nestas células germinativas podemos notar uma intensa acidofilia do citoplasma devido à grande deposição de vitelo e um núcleo central e irregular. A camada folicular é constituída pela simples camada de células granulosa e uma espessa camada teca (Figs. 7B e C), que parece ser dividida em interna e externa (não apresentado). Abaixo da camada granulosa encontra-se a zona pelúcida (Figs. 7B-D). Neste caso, os oócitos podem ser considerados como III ou vitelogênicos. Um conjunto de células da teca com núcleo grande e irregular foi observado ao redor de toda a camada dos oócitos vitelogênicos, formando um cisto (Figs. 7B-D).

Além disso, folículos atrésicos e corpo lúteo foram também observados. Os folículos atrésicos (Figs. 8A-B) apresentaram as células da granulosa com hipertorfia, hiperplasia e vacuolizadas, ocupando o oócito inteiro. A camada teca apresentou-se reduzida nesta fase (Figs. 8A-B). Na figura 5A podemos observar uma estrutura elíptica semelhante ao corpo lúteo, contendo uma substância em seu interior.

4.2.3 Anatomia do sistema reprodutor masculino

Os machos de *S. annulatus* possuem um par de testículos pareados e alongados (Fig. 9A). Cada testículo era constituído por muitos lobos amarelados, sendo cada lobo composto por estruturas menores arredondadas, os lóbulos (Fig. 9B). No presente trabalho o número de lobos variou de 4 a 10 entre os indivíduos. Podemos encontrar ainda variações no tamanho dessas estruturas, sendo que o lobo anterior ou posterior foi maior, dependendo do indivíduo. Esses lobos estavam ligados entre si por um fino ducto longitudinal e ductos transversais conectavam os testículos aos rins (Fig. 9C). Assim como visto para as fêmeas, corpos gordurosos estão presentes ao longo de todo o testículo, aderidos ao mesentério gonadal (Fig. 9C).

Foi possível identificar também diferenças macroscópicas nos testículos relacionadas ao estádio de maturação gonadal. Os animais coletados no inverno apresentaram testículos amarelos, bastante vascularizados e com lobos bem desenvolvidos (Fig. 10C). Contudo, os machos coletados em outras estações apresentaram testículos esbranquiçados, menores e pouco vascularizados (Figs. 10A-B).

4.2.4 Espermatogênese

As análises histológicas mostraram que os lóbulos testiculares eram circulares em seu contorno (Fig. 11A), estando individualmente envolvidos por uma membrana basal e uma estrutura de fibras e células, além de uma matriz de lipídios, as quais suportavam as células germinativas e células de Sertoli nos lóbulos (Figs. 11A-D, 12A-B e 13B). A camada mais interna aderida à membrana basal consistia em células mióides achatadas (Fig. 13A). As células de Sertoli e as células germinativas estavam contidas dentro da membrana basal e se encontravam em vários estágios de desenvolvimento, sendo que as células de Sertoli localizavam-se mais na periferia do lóbulo (Figs.13B).

Como podemos observar, a espermatogênese em *S. annulatus* é cística (Figs. 11A-D e 12A-B). O ducto espermático se abre no interior do lóbulo e a junção desses ductos forma o ducto coletor na área intersticial (Figs. 14A e B). O tecido intersticial ocupa a área triangular entre os lóbulos e áreas similares na periferia e consiste de células de Leydig, capilares sanguíneos e fibroblastos (não identificados) (Fig. 13A). Os ductos coletores também estão presentes na área intersticial, como já mencionado (Figs. 13A, 14A e B).

Para *S. annulatus* no presente trabalho, foi possível identificar 7 estágios de diferenciação das células germinativas: espermatogônias primária e secundária, espermatócitos primário e secundário, espermátides arredondadas e alongadas e espermatozóides. As células localizadas isoladamente na periferia do lóbulo eram as espermatogônias primárias, que apresentavam núcleo grande e arredondado com coloração basofílica (Figs. 11B e C). As espermatogônias secundárias já formavam ninhos, estando envolvidas por células de Sertoli, possuíam também núcleo basófilo com pequena quantidade de citoplasma (Figs. 11B e C). Números variáveis de espermatócitos primários também ocorreram na periferia formando 2 fileiras de células compactas que eram menores do que as espermatogônias (Figs. 11B e D). Ninhos contendo espermatócitos secundários ocorreram mais para o meio do lóbulo, os núcleos eram bem menores do que os núcleos dos espermatócitos primários e as células tendiam a uma organização em círculo (Figs. 11B e D). Diferentes morfologias de espermátides foram encontradas nos lóbulos: espermátides arredondadas dispostas em uma única fileira formando um círculo e, as espermátides alongadas que apresentavam flagelo (Figs. 13C e D). Por último, podemos observar os espermatozóides nos ductos espermáticos juntamente com as células amebóides (Fig. 14A). Os espermatozóides são

células filiformes compostas por uma cabeça (acrossomo), uma porção mediana e cauda (Fig. 14C). A diferenciação das células germinativas ocorreu da periferia, onde estão as espermatogônias primárias, para o centro do lóbulo (Figs. 12A e B).

No presente trabalho, foi possível identificar 3 estádios de desenvolvimento gonadal para os machos de *S. annulatus*: quiescência sexual, espermatogênese ativa e regressão. A quiescência sexual foi caracterizada pela presença de lóbulos menores contendo muitas espermatogônias e espermatócitos na periferia e área intersticial aumentada (Figs. 11A-D). Os testículos em fase de espermatogênese ativa apresentaram lóbulos maiores, contendo cistos em todos os estágios de diferenciação, principalmente espermátides arredondadas e alongadas e espermatozóides presentes nos ductos espermáticos (Figs. 12A-B). O estádio de regressão testicular pode ser dividido em duas fases: regressão inicial que continha lóbulos com poucos cistos de células germinativas em estágios iniciais da espermatogênese, além de espermátides e espermatozóides remanescentes (Fig. 15A); e a regressão avançada foi caracterizada pela desestruturação do tecido germinativo, presença de cistos rompidos e vazios e alguns espermatozóides ainda remanescentes nos ductos (Figs. 15B-D).

4.3 Como o metabolismo dos substratos energéticos se altera em fêmeas e machos ao longo do ciclo anual?

Os dados de lipídios e proteínas totais e o perfil de ácidos graxos dos tecidos de reserva de fêmeas e machos de *S. annulatus* foram analisados ao longo do ciclo reprodutivo anual. Podemos observar que para a maioria dessas análises os resultados apresentaram também erros padrões com alto valor, o que refletiu na ausência de diferença estatística significativa em alguns casos. Como já mencionado, estes resultados ocorreram devido a grande variação entre os indivíduos e ao pequeno tamanho amostral obtido nas coletas. Além disso, os animais apresentaram pequenas diferenças no estádio de desenvolvimento gonadal no mesmo período de coleta, como já demonstrado para os dados morfológicos mostrados anteriormente.

4.3.1 Lipídios totais

4.3.1.1 Variação anual

Os resultados para as análises de lipídios totais teciduais e plasmáticos de fêmeas e machos de *S. annulatus* ao longo do ciclo anual estão apresentados nas figuras

16A e B, e 17A e B, respectivamente. Para as fêmeas, podemos observar alterações nos tecidos de reserva ao longo do ano, sendo que em todos os casos as maiores concentrações de lipídios totais foram encontradas durante o inverno (Figs. 16A-B), período no qual as fêmeas apresentaram um desenvolvimento gonadal mais avançado, como já mostrado anteriormente para as análises macroscópicas e histológicas dos ovários.

Assim, observou-se no fígado uma diminuição dos lipídios totais no outono, mas com uma retomada aos valores iniciais já no inverno, valores estes que se mantiveram até a primavera (P=0.003). No músculo ocorreu também uma diminuição dos lipídios no outono em relação ao verão (Fig. 16A, P=0.005), e uma clara tendência de aumento desses valores no inverno, mas sem diferença estatística significativa, provavelmente devido ao alto erro padrão encontrado. Apenas uma diferença foi encontrada nos ovários, nos quais os lipídios totais apresentaram concentrações mais elevadas nas fêmeas coletadas no inverno comparadas as fêmeas no outono (Fig. 16A, P=0.045). Para o tecido dérmico, encontramos as maiores concentrações lipídicas também no inverno em relação a todas as outras épocas do ano estudadas (Fig. 16A, P=0.001). As análises de lipídios totais plasmáticos corroboraram essas informações, pois também observamos uma maior concentração de lipídios totais circulantes durante o inverno, principalmente em comparação ao outono (Fig. 16B, P=0.046).

O mesmo perfil de deposição lipídica é observado para os machos de *S. annulatus* (Figs. 17A-B). No fígado ocorreu uma redução dos lipídios totais no outono com um subsequente aumento no inverno (Fig. 17A, P=0.008). Os lipídios musculares apresentaram também um valor maior nos machos coletados no inverno, mas apenas em comparação a estação de outono (Fig.17A, P=0.014). Para os testículos, podemos notar um elevado aumento dos lipídios totais durante o inverno, seguido por uma brusca depleção na primavera (Fig. 17A, P=0.004). Assim como para as fêmeas, as maiores concentrações de lipídios totais plasmáticos foram encontradas nos machos durante o inverno, em comparação as outras estações (Fig 17B, P=0.001). Contudo, no tecido dérmico nenhuma alteração estatisticamente significativa foi vista para os machos de *S. annulatus* ao longo do ano.

Além disso, analisamos se as alterações nos lipídios totais hepáticos e gonadais ao longo do ano para ambos os sexos apresentavam uma correlação direta com as variações obtidas para o IGS e o IHS. Como resultado, podemos observar na figura 18A uma correlação positiva entre os valores de IGS e os lipídios ovarianos para as fêmeas

(R^2=0.31713), contudo nenhuma correlação foi encontrada para os valores de IHS e lipídios hepáticos em fêmeas (Fig. 18B, R^2=0.0136). Deste modo, o elevado valor de IGS encontrado para as fêmeas durante o inverno (Tab. 2) pode ser positivamente correlacionado ao aumento de lipídios totais nos ovários neste mesmo período (Fig.18A). Por outro lado, nenhuma correlação foi encontrada entre os lipídios gonadais e hepáticos e os respectivos índices analisados para os machos (R^2=0.0552 e R^2=0.0592, respectivamente, Figs. 18C-D).

4.3.1.2 Diferenças sexuais

Como já apresentado machos e fêmeas possuem um padrão semelhante de deposição lipídica nos tecidos. Contudo, ressaltamos a tendência em um maior acúmulo de lipídios ovarianos do que testiculares, principalmente durante o inverno (Figs. 16A e 17A), e novamente, devido ao alto erro padrão não foi encontrada nenhuma diferença estatística significativa entre esses dados. Além disso, é importante mencionar as alterações encontradas no tecido dérmico das fêmeas ao longo do ano, o que não foi visto para os machos (Figs.16A e 17A).

4.3.2 Proteínas totais

4.3.2.1 Variação anual

Os resultados para as análises de proteínas totais teciduais e plasmáticas de fêmeas e machos de *S. annulatus* ao longo do ciclo anual estão apresentadas nas figuras 19A e B, e 20A e B, respectivamente. Para as fêmeas observou-se no fígado uma diminuição das proteínas totais durante as estações de outono e inverno em relação ao verão (Fig. 19A, P=0.001). O mesmo padrão de deposição protéica foi encontrado para as proteínas musculares (Fig. 19A, P=0.001). Contudo, nos ovários ocorreu um intenso aumento das proteínas totais no inverno, seguida de uma brusca depleção na primavera (Fig.19A, P<0.001). O tecido dérmico, por sua vez, apresentou os maiores valores protéicos, principalmente no outono e inverno, com uma redução também na primavera, semelhante ao que descrevemos para as gônadas (Fig. 19A, P=0.002). Mais uma vez no plasma foi encontrada a maior concentração de proteínas totais durante a estação de inverno (Fig. 19B, P=0.013).

Assim como visto para os lipídios totais, os machos de *S. annulatus* apresentaram um padrão de deposição das proteínas semelhante ao das fêmeas (Figs.

20A-B). Observou-se então, uma diminuição das proteínas totais hepáticas durante o outono que se manteve no inverno e primavera (Fig. 20A, P=0.002). O mesmo padrão de deposição protéica foi encontrado no músculo e nas gônadas (Fig. 20A, P=0.001 e P<0.001). O tecido dérmico, por sua vez, apresentou uma brusca diminuição das proteínas totais na primavera (Fig. 20A, P=0.001). Adicionalmente, o plasma apresentou os maiores valores de proteínas plasmáticas no inverno em relação a todas as outras estações analisadas (Fig. 20B, P<0.001).

Interessantemente, podemos observar que o tecido dérmico de ambos os sexos apresentou uma grande concentração de proteínas totais, sendo maior, inclusive, do que nos outros tecidos estudados em determinadas épocas do ano (Figs. 19A e 20A).

Para as análises de proteínas totais foi calculada também a correlação de Pearson entre os índices IGS e IHS e a concentração das proteínas totais nas gônadas e no fígado em ambos os sexos ao longo do ano. Contudo, não foi possível encontrar nenhuma correlação entre esses parâmetros, indicando que as alterações observadas nos valores de IGS e IHS não se correlacionam às variações encontradas na concentração de proteínas gonadais e hepáticas, respectivamente.

4.3.2.2 Diferenças sexuais

Mais uma vez podemos notar que ambos os sexos apresentaram um padrão semelhante na deposição de substratos e, assim como visto para os lipídios totais, as fêmeas tendem a apresentar as maiores concentrações protéicas nos ovários em comparação aos testículos, principalmente durante o inverno (Figs. 19A e 20A). Contudo, como também já relatado, não houve diferença estatística para estes dados devido ao alto erro padrão obtido.

4.3.3 Ácidos graxos

A tabela 3 mostra a relação de todos os ácidos graxos (AG) encontrados no plasma e nos tecidos analisados de fêmeas e machos de *S. annulatus* ao longo do ciclo anual. Nesta tabela apresentamos a nomenclatura de cada ácido graxo e sua classificação de acordo com o número de carbonos, grau de insaturação da molécula e posição da primeira insaturação, seguindo as regras da IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*). Adicionalmente, a composição de ácidos graxos da amostra padrão, constituída por uma mistura de ácidos graxos saturados (SFA), monoinsaurados (MUFA) e polinsaturados (PUFA) (SUPELCO, USA), está

representada em um cromatograma na figura 2. Cada pico representa um ácido graxo e a identificação é feita por comparação do tempo de retenção dos picos das amostras com o tempo de retenção dos picos do padrão. Deste modo, os AGs identificados no presente trabalho foram baseados nos presentes no padrão SUPELCO, contudo podemos notar que alguns AGs encontrados nos tecidos analisados não estão presentes no padrão, neste caso, estes picos foram identificados de acordo com os resultados apresentados por CHRISTIE (1989), utilizando a mesma coluna já descrita.

De modo geral, apresentamos no presente trabalho os resultados do perfil de ácidos graxos dos fosfolipídios (FL) de membrana das fêmeas e machos de *S. annulatus* ao longo do ciclo anual. Além disso, foi caracterizada também a composição de ácidos graxos dos lipídios totais do tecido adiposo e do plasma. Podemos notar que alguns AGs são muito comuns em todas as amostras analisadas em ambos os sexos, como C16:0, C18:0, C18:1n9, C18:2n6 e C20:4n6 (Tabs. 4-10).

4.3.3.1 Ácidos graxos totais do tecido adiposo

Os resultados do perfil de ácidos graxos do tecido adiposo em fêmeas e machos de *S. annulatus* estão apresentados na tabela 4. Como esperado, no tecido adiposo de ambos os sexos encontramos maiores porcentagens de ácidos graxos saturados e monoinsaturados do que polinsaturados (Tab. 4), sendo que os principais foram C16:0, C18:0 e C18:1, como já mencionado. Sendo assim, as fêmeas apresentaram altas porcentagens dos MUFAs em todas as estações estudadas (55-63%), porém não houve diferença estatística ao longo do ano. Contudo, observamos nas fêmeas uma intensa depleção de PUFAs t durante o inverno (P=0.019). Dentre esses, os PUFAs n6 são os que apresentaram as maiores alterações (P=0.004), refletindo em menores porcentagens de C18 e C20-22 n6. Neste caso, o ácido graxo C18:2n6c foi o principal responsável pela diferença observada, no entanto reduções no C20:4n6 e C22:4n6 também foram observadas (Tab. 4).

Já para os machos, as porcentagens de SFAs no tecido adiposo apresentaram-se elevadas nas estações de verão e outono, porém diminuíram no inverno (Tab. 4, P=0.007). Isto ocorreu devido as pequenas alterações encontradas para o ácido graxo C16:0, além da ausência dos AGs C20:0, C22:0 e C23:0 no tecido adiposo dos animais coletados durante o inverno. Como visto para as fêmeas, os machos apresentaram também elevados valores de MUFAs, sendo que neste caso os animais coletados no inverno apresentaram as maiores porcentagens, devido à elevação nas porcentagens de

C18:1n9 (Tab. 4, P=0.010). Para os PUFAs, podemos observar uma grande depleção destes AGs nos animais durante o inverno (P=0.007). Esse resultado foi decorrente da diminuição dos PUFAs n3, principalmente C20:5n3 e C22:6n3 (P=0.021) e mais pronunciadamente dos PUFAs n6 de cadeia curta (C18:2n6c) (P=0.009, tab. 4), semelhante ao que foi encontrado para as fêmeas.

De modo geral, os animais do presente estudo mostraram maiores valores de PUFAs da série n6 do que n3 no tecido adiposo, dado este comprovado através da razão n3/n6, que apresentou valores menores que 1 (0.2-0.3, tab. 4). Adicionalmente, dentre esses PUFAs, podemos observar maiores proporções de PUFAs das série n6 de cadeia curta do que PUFAs de cadeia longa, assim a razão C20-22/C18 n6 foi também menor do que 1 (0.4-0.8) para fêmeas e machos ao longo de todo o ciclo anual (Tab. 4). No caso dos PUFAs n3 a razão C20-22/C18 n3 foi ligeiramente maior do que 1 (1.1-3.2, tab. 4).

4.3.3.2 Fosfipídios

Os resultados do perfil de ácidos graxos dos FLs do fígado, músculo, gônadas, pele e encéfalo em fêmeas e machos de *S. annulatus* estão apresentados nas tabelas 5-9. Ao contrário do que foi visto para os AGs totais do tecido adiposo, nos FL encontramos uma maior porcentagem de ácidos graxos polinsaturados do que saturados e monoinsaturados (Tab. 5-9), principalmente os PUFAs da série n6 como C20:4n6, na maioria dos tecidos estudados.

Com relação aos fosfolipídios hepáticos, podemos observar na tabela 5 que ocorreu um aumento de SFAs para as fêmeas coletadas no outono, seguido de uma redução durante o inverno (P=0.004). O mesmo pode ser observado para os machos (Tab. 5, P=0.001). Em ambos os casos, essa diferença ocorreu por conta da variação encontrada para o C18:0 ao longo do ano (Tab. 5). Nenhuma diferença foi encontrada para os MUFAs e PUFAs t nas fêmeas de *S. annulatus* ao longo do ciclo anual. Contudo variações ocorreram nas proporções dos componentes de PUFAs, sendo que os PUFAS n6 de cadeia curta (P=0.011), C18:2n6, apresentaram altas porcentagens durante o verão com subsequente diminuição no outono mantida nas outras estações. Contrariamente a isso, os PUFAs n3 foram maiores para as fêmeas coletadas no inverno e na primavera, principalmente os ácidos graxos C22:5n3 e C22:6n3 (Tab. 5, P=0.022). Nos machos, observamos uma depleção dos PUFAs t no outono (P=0.001), devido aos menores valores para os PUFAs n6 e n3 de cadeia longa (P=0.021 e P=0.009), como C20:4n6 e

C20:5n3, C22:5n3 e C22:6n3, respectivamente. Contudo, na primavera esses valores aumentam novamente (Tab. 5).

Nos FLs do músculo observamos apenas uma diferença para as fêmeas, as cecílias coletadas no outono obtiveram maiores valores de cadeias longas de PUFAs n6 em relação ao verão, mais uma vez o ácido graxo C20:4n6 contribuiu para essa diferença (Tab. 6, P=0.024). Mesmo sem encontrar diferenças na somatória dos PUFAs C18 n6, as fêmeas apresentaram uma diminuição do AG C18:2n6 durante o inverno em relação ao verão (P=0.042). Ao contrário disso, nos machos foi possível verificar maiores alterações na fração polar do músculo, como mostra a tabela 6. Durante a primavera podemos observar os menores valores de SFAs em comparação ao verão e inverno (P=0.007). Esta alteração se deu devido às reduções na porcentagem de C16:0 e C18:0. Para os MUFAs, os machos coletados no inverno apresentaram maiores porcentagens desses AGs, mas apenas em comparação aos animais coletados no outono, devido às variações no C18:1n9 (Tab. 6, P=0.011). Contudo, neste mesmo período observou-se menores valores de PUFAs t (P=0.004), bem como PUFAs n6 (P=0.013) de cadeia curta e longa (C18:2n6c, C20:3n6 e C20:4n6) e n3 de cadeia longa (P=0.020) (C20:5n3 e C22:6n3), como mostra a tabela 6.

Não foram encontradas diferenças na somatória das classes de AGs dos FLs do ovário, contudo entre os PUFAs, as cecílias apresentaram porcentagens maiores de PUFAs n3 na primavera em relação ao outono (P=0.017), devido as alterações dos valores encontrados para os ácidos graxos C20:5n3 e C22:6n3, como mostra a tabela 7. Já os machos de *S. annulatus* durante o inverno e a primavera apresentaram porcentagens menores de SFAs nos fosfolipídios testiculares em relação ao outono, devido às reduções de C18:0 (P=0.006), contudo em consequência disso encontramos maiores valores para o PUFAs t, principalmente os AG de cadeia longa da série n3, nos animais coletados na primavera em relação ao verão e outono. Isso ocorreu devido às alterações no C22:5n3 e C22:6n3 (Tab. 7, P=0.003). Mesmo não havendo diferenças para os PUFAs n6 no testículo dos machos de cecílias, podemos observar maiores porcentagens do ácido graxo C22:4n6 durante o inverno e primavera em relação ao outono (Tab. 7), valores estes muito maiores até do que os encontrados para C22:6n3.

Para os fosfolipídios da pele, as fêmeas coletadas no outono e inverno apresentaram as maiores porcentagens de SFA e MUFAs, com uma subsequente diminuição destes valores na primavera, como mostra a tabela 8 (P=0.006 e P=0.020). De forma oposta, durante o inverno os valores de PUFAs t apresentaram uma redução

no tecido dérmico das cecílias com um aumento subsequente na primavera (Tab. 8). Neste caso, os PUFAs n3 foram os principais AGs responsáveis por essas alterações, mais especificamente o C20:5n3 e C22:6n3. Assim como para as fêmeas, os machos durante o inverno apresentaram também altas porcentagens de SFA na pele seguida de uma diminuição na primavera (Tab. 8). Tanto em machos como em fêmeas, as alterações nos SFA ocorreram devido às alterações observadas no C16:0 e C18:0. Consequentemente, os maiores valores de PUFAs n3 foram encontrados para os machos durante a primavera, principalmente devido as porcentagens mais elevadas de PUFAs n3 de cadeia longa, como C20:5n3 e C22:6n3 (Tab. 8).

Nenhuma diferença foi encontrada para os fosfolipídios do encéfalo nas fêmeas de *S. annulatus* ao longo do ciclo anual. Para os machos, os animais coletados no verão apresentaram porcentagens maiores de C18n6, como C18:2n6c, do que os animais coletados durante o outono. O inverso foi observado para os ácidos graxos C18n3, principalmente C18:4n3, como mostra a tabela 9. Adicionalmente, podemos notar que os FLs do encéfalo apresentaram proporções altas de C20:4n6, como visto nos outros tecidos, mas diferentemente destes encontramos também valores elevados do ácido graxo C22:6n3 em ambos os sexos (Tab. 9).

De modo geral, os animais do presente estudo apresentaram maiores valores de PUFAs da série n6 do que n3 nos FLs de todos os tecidos analisados, dado este comprovado através da razão n3/n6, que apresentou valores menores que 1 (0.1-0.6, tabs. 5-9), como visto para o tecido adiposo (Tab. 4). Além disso, dentre esses PUFAs, podemos observar maiores proporções de PUFAs das série n6 e n3 de cadeia longa do que PUFAs de cadeia curta, assim a razão C20-22/C18 n6 e n3 foi maior do que 1 para fêmeas e machos ao longo de todo o ciclo anual (3.3-42.0, 5.2-98.0, respectivamente; Tabs. 5-9).

4.3.3.3 Ácidos graxos totais plasmáticos

O perfil de ácidos graxos no plasma das fêmeas não apresentou diferenças ao longo do ciclo para as grandes classes, como SFAs, MUFAs e PUFAs. Contudo, para os PUFAs da série n6 as cecílias coletadas no verão apresentaram altas porcentagens de C18n6, que decaíram no outono mantendo-se até a primavera (Tab. 10, P=0.006). Isto ocorreu devido as alterações do ácido graxo C18:2n6c (Tab. 10). Contrapondo-se a isso, valores menores de C20-22 n6, como C20:4n6, C22:2n6 e 22:4n6, foram encontrados para as fêmeas durante o verão seguido de um aumento no outono (Tab. 10, P=0.019).

Além disso, observamos maiores porcentagens de C18n3 para as cecílias durante o outono em relação à primavera, como mostra a tabela 10 (P=0.002).

Ao contrário das fêmeas, os machos apresentaram grandes alterações nas proporções de AGs no plasma ao longo do ciclo anual. Os PUFAs t encontrados no plasma mostraram maiores valores para os machos durante o outono, com uma diminuição na primavera (Tab. 10, P=0.017). Essas diferenças ocorreram devido as maiores porcentagens de PUFAs n6 de cadeia longa (P=0.002), como C20:3n6, C20:4n6 e C22:2n6. Além disso, os animais durante o verão mostraram altos valores de C18 n6 em comparação aos machos coletados no inverno e primavera (P=0.006), devido principalmente ao ácido graxo C18:2n6c (Tab. 10).

Curiosamente, encontramos elevados valores do ácido graxo C24:1 no plasma de todos os animais, o que contribuiu para porcentagens maiores dos MUFAs nos machos coletados na primavera em relação ao outono e verão (P=0.008). Esta interessante observação em relação ao C24:1 pode ser vista também para as fêmeas, como mostra a tabela 10.

4.4 Quais são as alterações hormonais em fêmeas e machos durante o ciclo reprodutivo?

4.4.1 Variação anual

Os resultados obtidos para as análises de estradiol, testosterona e progesterona plasmáticas de fêmeas e machos de *S. annulatus* ao longo do ano estão apresentados nas figuras 22A-C, respectivamente. Podemos observar que não houve nenhuma diferença estatística significativa para as concentrações de estradiol, testosterona e progesterona nas fêmeas de *S. annulatus* ao longo do ano (Figs. 22A-C), o que é claramente justificado pelo elevado valor do erro padrão encontrado. Contudo, é importante observar que as concentrações plasmáticas do estradiol tendem a aumentar no outono e inverno (Fig. 22A), o que correlaciona-se ao período no qual os oócitos foram encontrados em desenvolvimento avançado.

Ao contrário disso, diferenças na concentração de progesterona plasmática foram encontradas para os machos de *S. annulatus*, os quais apresentaram os maiores valores deste hormônio durante a primavera em comparação ao verão e inverno (P=0.031, Fig. 22C). Diferenças estatísticas não foram encontradas nas concentrações de testosterona e estradiol ao longo do ciclo anual dos machos (Figs. 22A e B).

Entretanto, na figura 22A, podemos notar que as concentrações de estradiol tendem a ser baixas durante o verão, mantendo-se altas nas estações subsequentes. Além disso, as concentrações de testosterona apresentaram também uma tendência a variações, sendo mais elevados na primavera.

Não foi possível traçar nenhuma correlação entre as alterações encontradas para as concentrações de estradiol e testosterona em fêmeas e machos ao longo das estações estudadas (R^2=0.042 e R^2=0.005, respectivamente) (Figs. 23A e B)

4.4.2 Diferenças sexuais

Diferenças foram encontradas para as análises hormonais entre os sexos, sendo que de modo geral, os machos apresentaram maiores concentrações de testosterona do que as fêmeas, principalmente durante as estações de verão e primavera (P=0.003 e P=0.017, respectivamente, tab. 22B). Enquanto isso, encontramos as maiores concentrações de progesterona nas fêmeas durante o verão e o outono (P=0.046, tab. 22C). Mesmo não havendo diferença estatística entre os sexos para as concentrações de estradiol, a relação E_2/T se apresentou muito maior para as fêmeas (14.2-61.2) do que para os machos (2.9-11.0) ao longo do ciclo anual (Fig. 24). Deste modo, podemos notar que a concentração deste hormônio parece ser maior nas fêmeas de *S. annulatus* do que nos machos.

Tabela 2: Parâmetros ponderais e morfométricos de fêmeas e machos de *Siphonops annulatus* coletados ao longo do ciclo anual (Média±EPM).

Estação	Massa corpórea (g)		Comprimento (cm)		IGS (%)		IHS (%)	
	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos
Verão	75.6±6.80	75.2±5.46	38.0±1.43	38.0±1.58	0.1±0.03[b]	0.2±0.03[b]	4.0±0.10	3.8±0.20
Outono	62.8±6.22	50.6±5.29	38.7±1.44	35.6±1.86	0.1±0.03[b]	0.2±0.02[b]	3.9±0.24	3.6±0.15
Inverno	64.0±17.07	43.4±1.73	36.8±3.24	32.4±1.14	1.1±0.72[a]	0.6±0.05[a]	4.3±0.56[a]	4.4±0.42[a]
Primavera	55.5±5.02	71.2±8.78	37.5±1.61	37.1±1.43	0.1±0.01[b]	0.4±0.03[b]	3.5±0.14[b]	3.3±0.10[b]

IGS – índice gonadossomático; IHS – índice hepatossomático.

[ab] Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas para fêmeas e machos ao longo do ciclo anual.

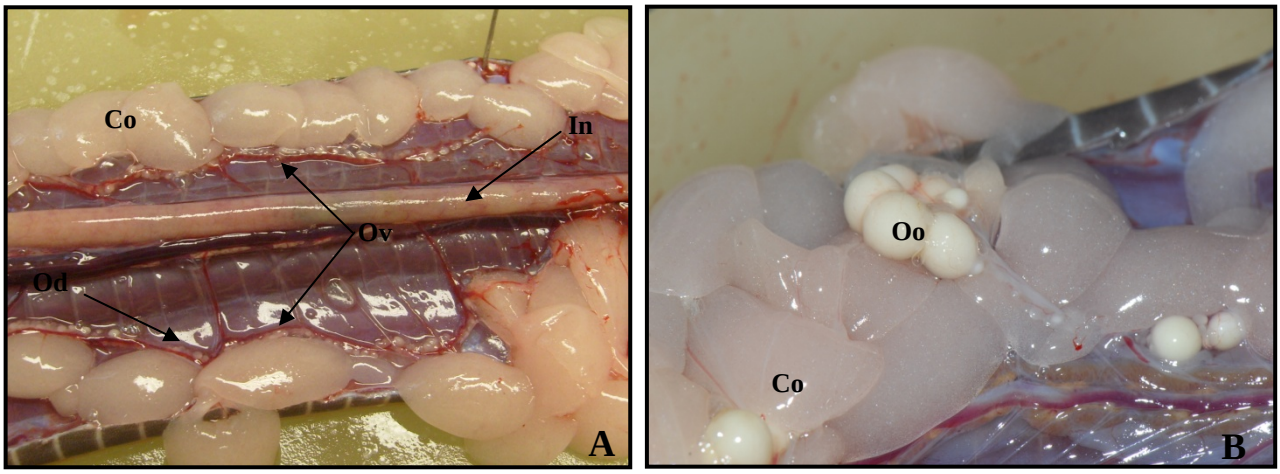


Figura 3: Análise macroscópica dos ovários de *S. annulatus.* **A)** Anatomia do sistema reprodutor feminino de *S. annulatus.* **B)** Corpos gordurosos aderidos aos oócitos. **Legenda:** Corpos gordurosos, Co; Intestino, In; Oviduto, Od; Oócitos, Oo; Ov, ovário.

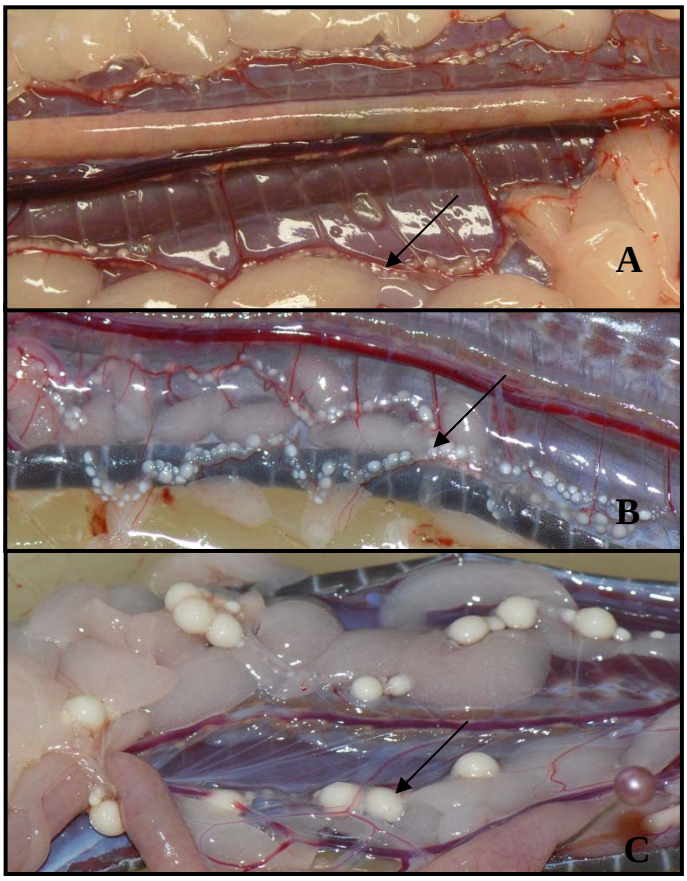


Figura 4: Comparação entre os diferentes estádios gonadais encontrados nas fêmeas de *S. annulatus* ao longo do ciclo anual, mostrando o aumento progressivo do oócitos **(A-C)**. Seta indica os ovários.

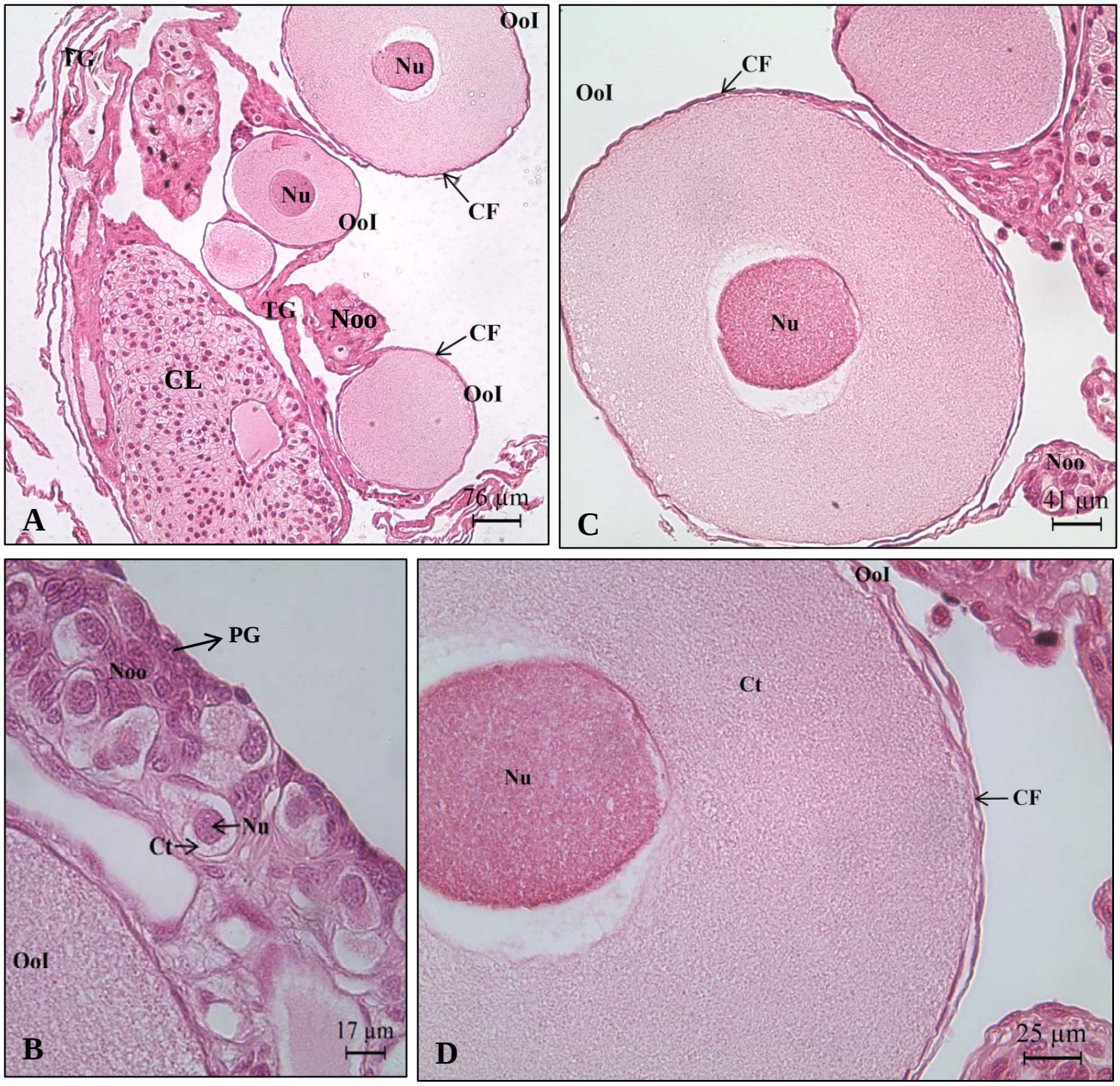


Figura 5: Oogênese inicial em *S. annulatus.* **A)** Ovário de *S. annulatus* mostrando ninhos de oogônias e oócitos do tipo I envolvidos por uma simples camada de células foliculares, camada granulosa. Tecido gonadal conecta os oócitos. Presença de corpo lúteo. **B)** Ninhos de oogônias e células pré-granulosas presentes no tecido gonadal. **C-D)** Oócito I evidenciando a simples camada de células granulosas que formam a camada folicular. **Legenda:** Camada folicular, CF; Corpo lúteo, CL; Células pré-granulosas, PG; Citoplasma, Ct; Ninho de oogônias, Noo; Núcleo, Nu; Oócito I, OoI; Tecido gonadal, TG.

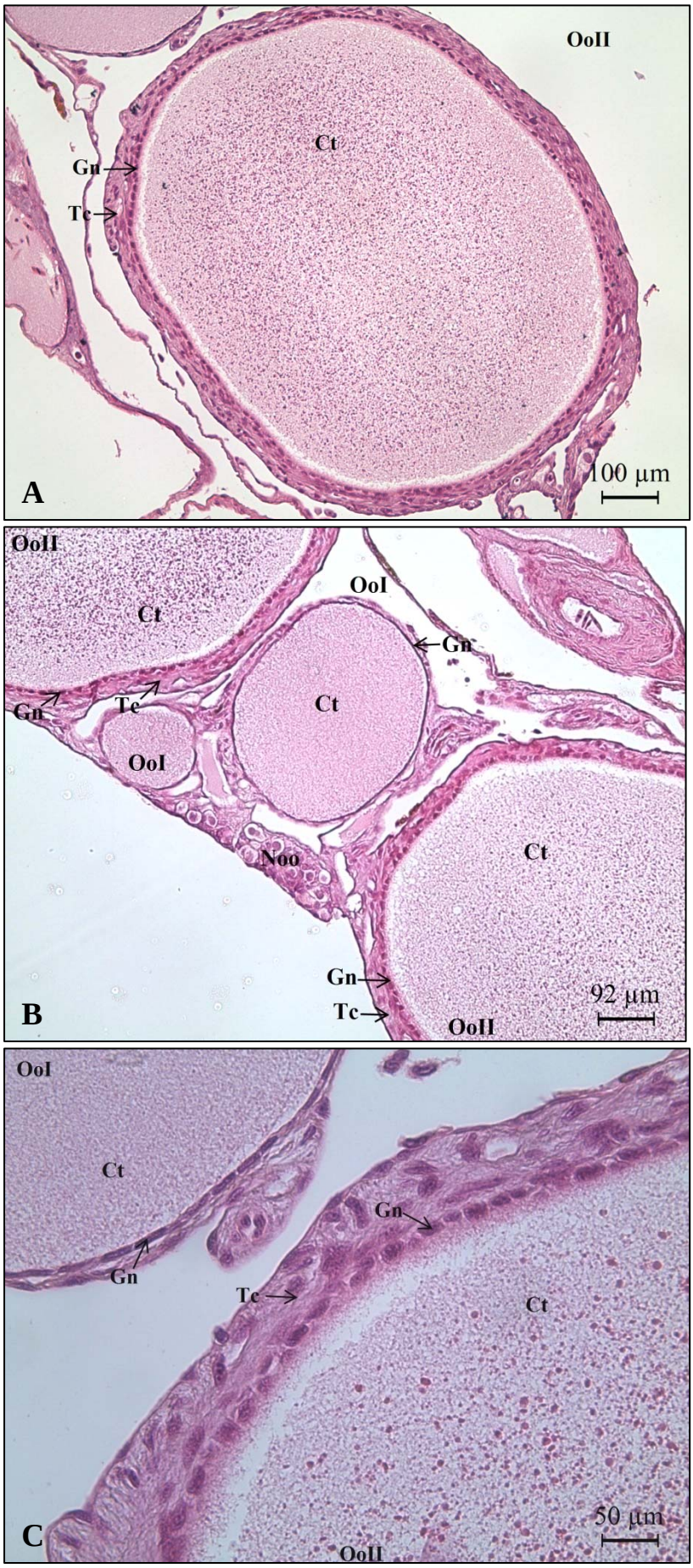


Figura 6: Vitelogênese inicial em *S. annulatus.* **A)** Oócito II de *S. annulatus* mostrando a camada folicular mais espessa sendo constituída por uma simples camada de células granulosas e uma camada mais espessa de células teca. Citoplasma granular devido a deposição inicial de vitelo. **B-C)** Comparação entre ó oócito I e II evidenciando a diferença das camadas foliculares **Legenda:** Camada granulosa, Gn; Camada teca, Tc; Citoplasma, Ct; Ninho de oogônias, Noo; Oócito I, OoI; Oócito II, OoII.

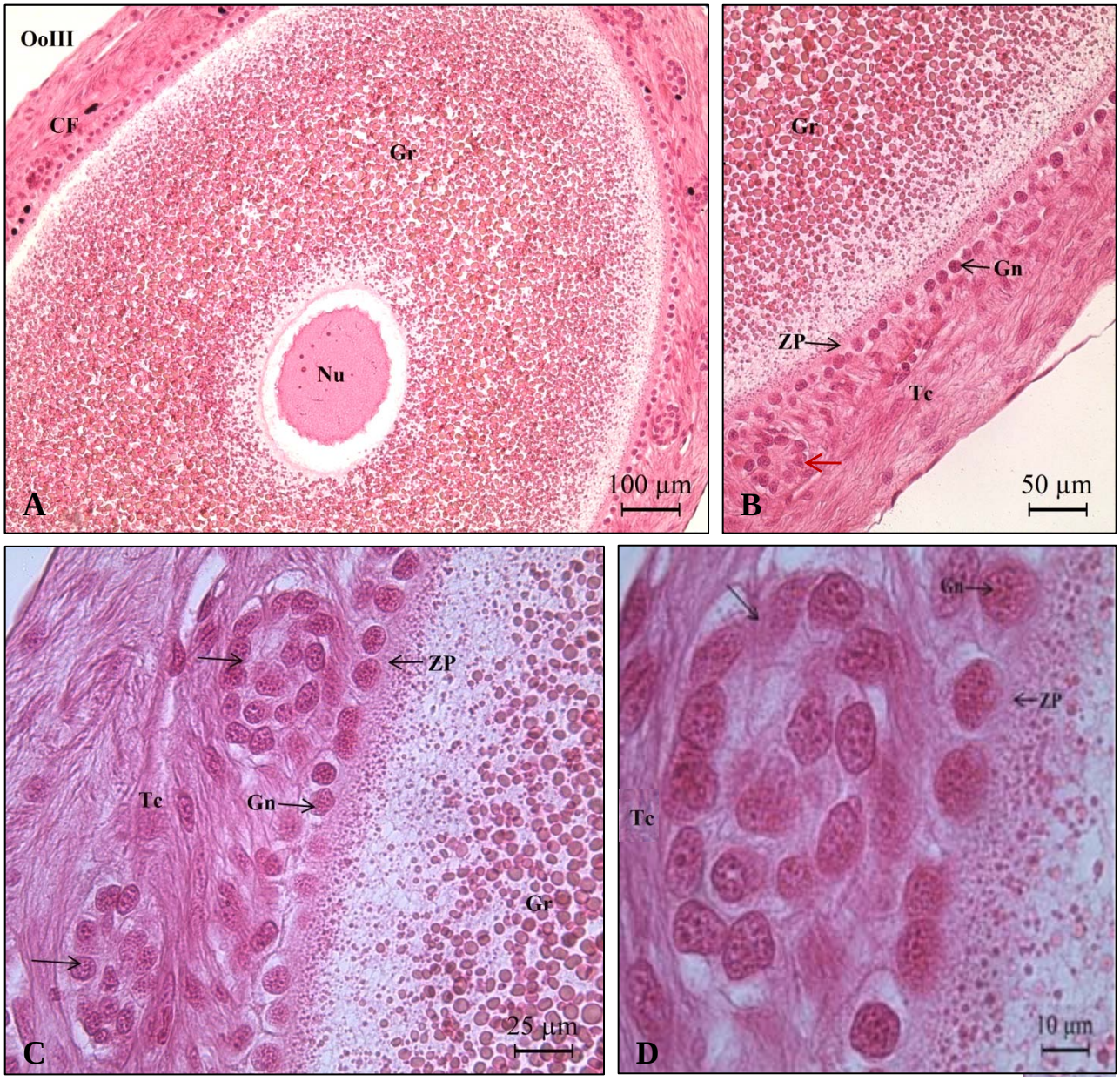


Figura 7: Vitelogênese avançada em *S. annulatus.* **A)** Oócito III (vitelogênico) de *S. annulatus* envolvido por uma simples camada de células granulosa e uma espessa camada teca. Citoplasma contendo grande quantidade de grânulos de vitelo. **B-D)** Oócito envolvido por uma zona pelúcida, uma simples camada de células granulosa e uma espessa camada teca contendo cistos de células da teca (seta vermelha e preta). **Legenda:** Camada folicular, CF; Camada granulosa, Gn; Camada teca, Tc; Grânulos de vitelo, Gr; Núcleo, Nu; Oócito III, OoIII; Zona pelúcida, ZP.

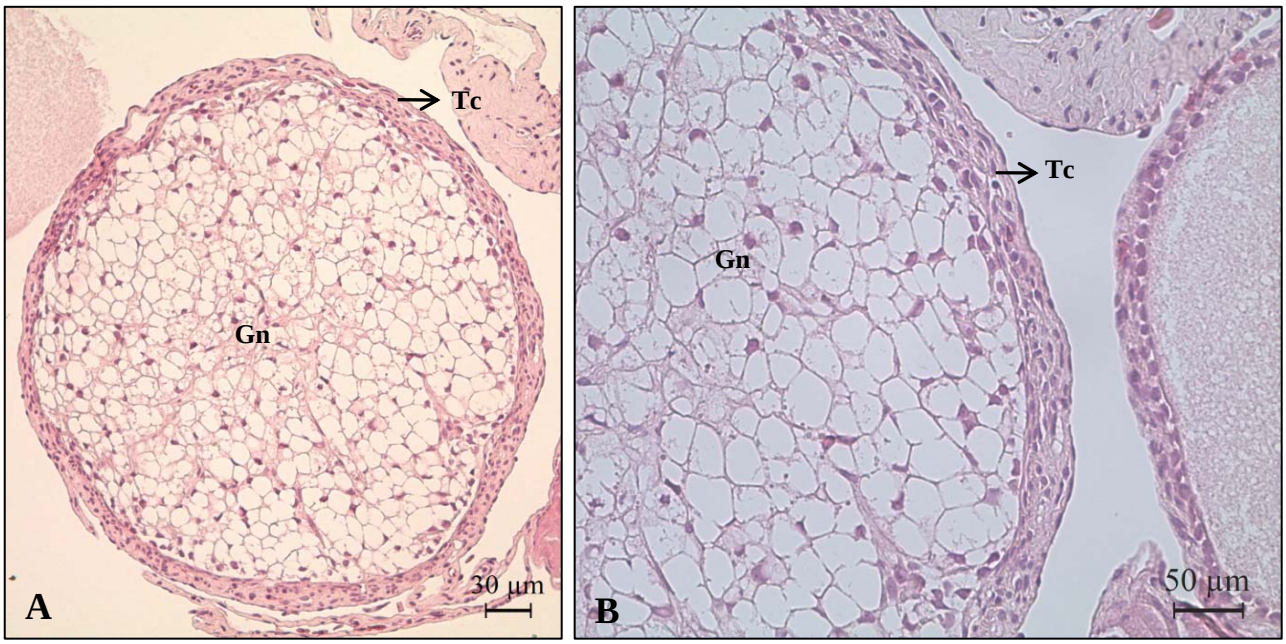


Figura 8: Folículo atrésico de *S. annulatus.* **A-B)** Folículo atrésico apresentando as células granulosa com hipertrofia, hiperplasia e vacuolizadas, ocupando o oócito inteiro. A camada teca apresentou-se reduzida nesta fase. **Legenda:** Células granulosas, Gn; Células Teca, Tc.

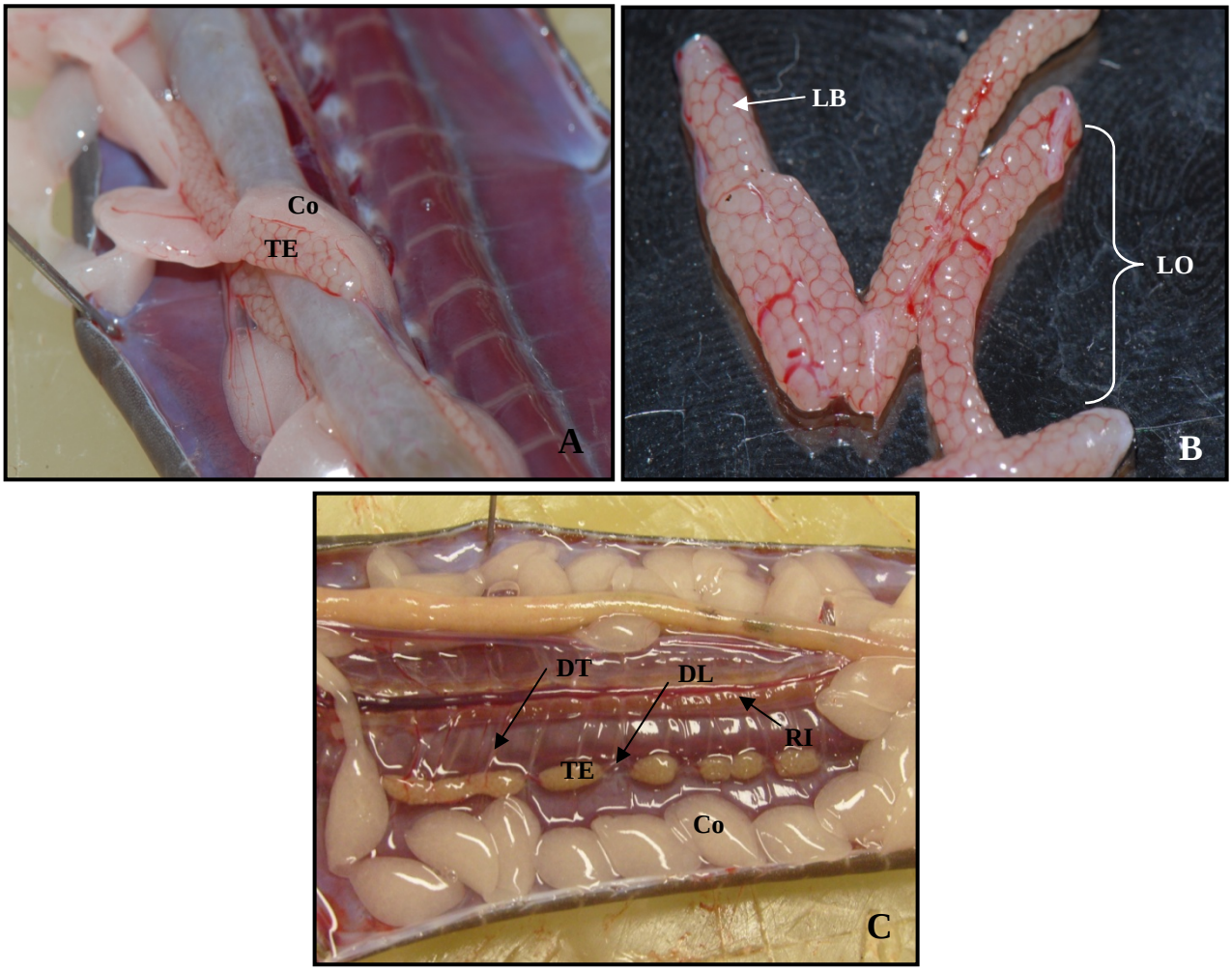


Figura 9: Análise macroscópica dos testículos de *S. annulatus.* **A)** Testículos alongados aderidos aos corpos gordurosos. **B)** Testículo divido em lobos e lóbulos. **C)** Ductos longitudinais conectando os lobos testiculares e ductos transversais conectando os testículos aos rins. **Legenda:** Corpos gordurosos, Co; Ducto longitudinal, DL; Ducto transversal, DT; Lobos, LO; Lóbulos, LB; Rim, RI; Testículo, TE.

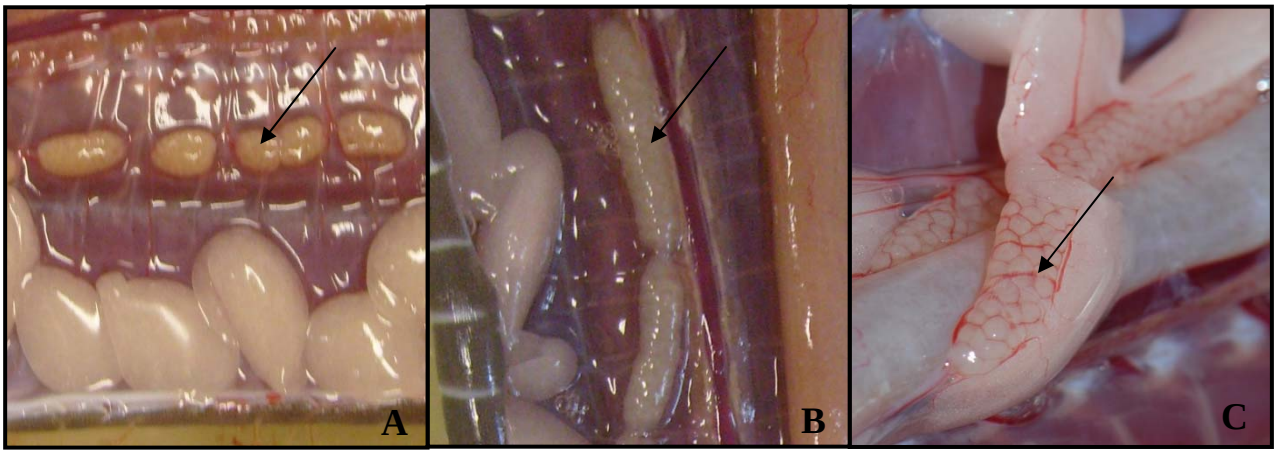


Figura 10: Comparação entre os diferentes estádios gonadais de machos de *S. annulatus* ao longo do ciclo anual, mostrando o aumento progressivo dos testículos com maior vascularização **(A,** verão; **B,** outono; **C,** inverno**)**. Seta indica os testículos.

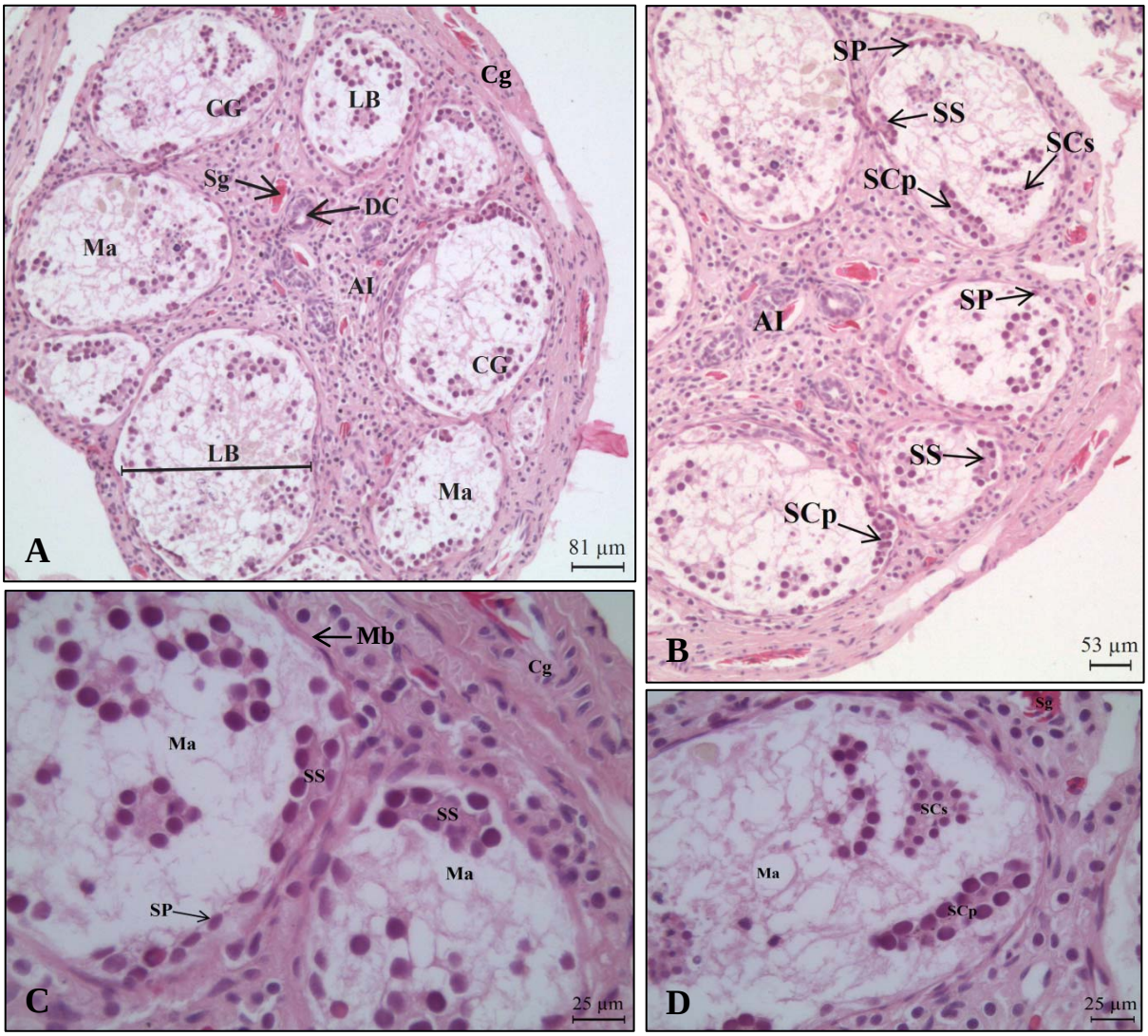


Figura 11: Quiescência sexual em machos de *S. annulatus.* **A)** Visão geral do lobo testicular de um macho em quiescência sexual mostrando a área intersticial aumentada e a presença de espermatogônias e espermatócitos na periferia dos lóbulos imersos em uma matriz lipídica. **B)** Cistos germinativos mostrando espermatogônias primárias e secundárias e espermatócitos primários e secundários. **C)** Espermatogônias primárias isoladas na periferia do lóbulo com núcleo grande arredondado e basófilo, e espermatogônias secundárias organizadas em cistos na periferia dos lóbulos. **D)** Espermatócitos primários organizados em 2 fileiras de células na periferia do lóbulo e, espermatócitos secundários contendo núcleos menores e basófilos com início de uma disposição circular das células no interior dos lóbulos. **Legenda:** Área intersticial, AI; Capilar sanguíneo, Sg; Cápsula gonadal, Cg; Células germinativas, CG; Ducto coletor, DC; Lóbulo, LB; Matriz lipídica, Ma; Membrana basal, Mb; Espermatogônia primária, SP; Espermatogônia secundária SS; Espermatócito primário, SCp; Espermatócito secundário, SCs.

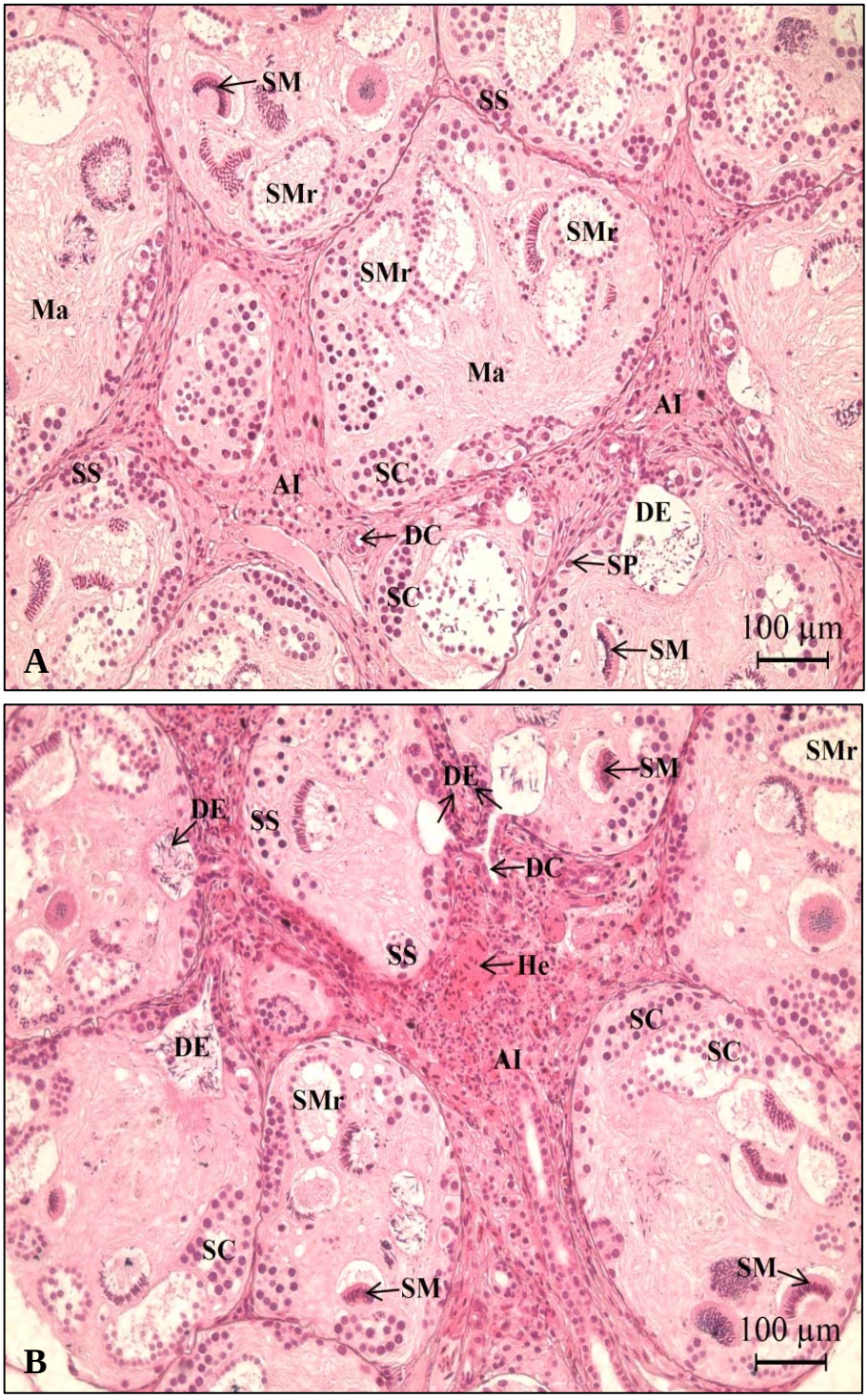


Figura 12: Espermatogênese ativa em machos de *S. annulatus.* **A)** Lobo testicular em espermatogênese ativa mostrando a área intersticial reduzida contendo os ductos coletores e diferentes tipos celulares. Os lóbulos consistem de cistos germinativos em diferentes fases de diferenciação (espermatogônias secundárias, espermatócitos, espermátides arredondas e alongadas) imersos em uma matriz lipídica. **B)** Lobo testicular em espermatogênese ativa mais avançada mostrando cistos germinativos com espermatogônias, espermatócitos, espermátides arredondadas e alongadas e espermatozóides nos ductos espermáticos, que formam os ductos coletores na área intersticial. **Legenda:** Área intersticial, AI; Ducto coletor, DC; Ducto espermático, DE; Hemácias, He; Matriz lipídica, Ma; Espermatogônias secundárias, SS; Espermatócitos, SC; Espermátide arredondada, SMr; Espermátide alongada, SM.

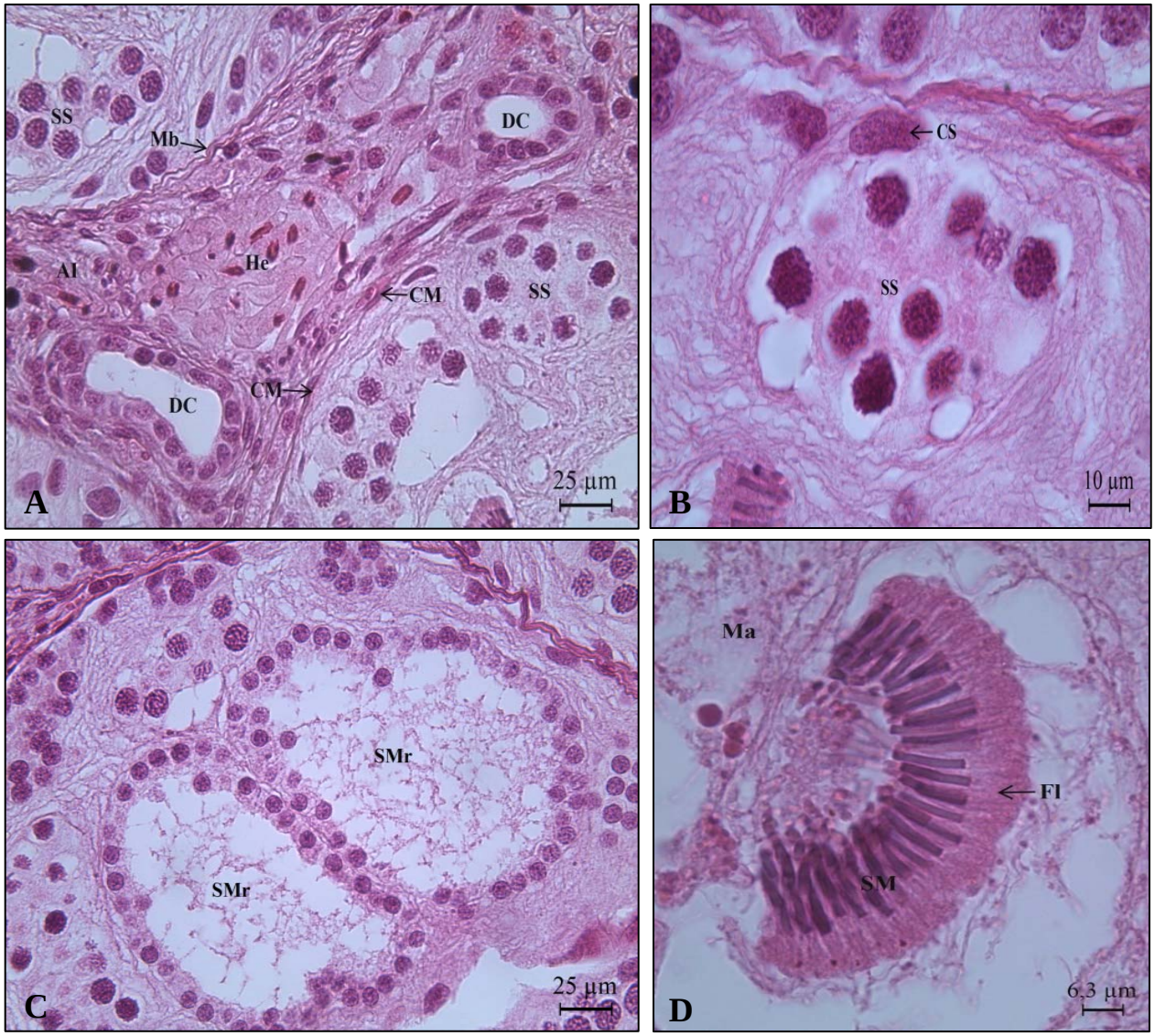


Figura 13: Estrutura geral da espermatogênese em machos de *S. annulatus.* **A)** Ductos coletores e capilares sanguíneos contendo hemácias na área intersticial. Lóbulos testiculares envolvidos por uma membrana basal e células mióides aderidas a membrana. **B)** Célula de Sertoli na periferia do lóbulo envolvendo espermatogônias secundárias. **C)** Espermátides arredondadas dispostas em um única fileira formando um círculo. **D)** Espermátide alongada contendo flagelo. **Legenda:** Área intersticial, AI; Célula mióide, CM; Célula de Sertoli, CS; Ducto coletor, DC; Flagelo, Fl; Hemácias, He; Matriz lipídica, Ma; Membrana basal, Mb; Espermatogônia secundária, SS; Espermátide arredondada, SMr; Espermátide alongada, SM.

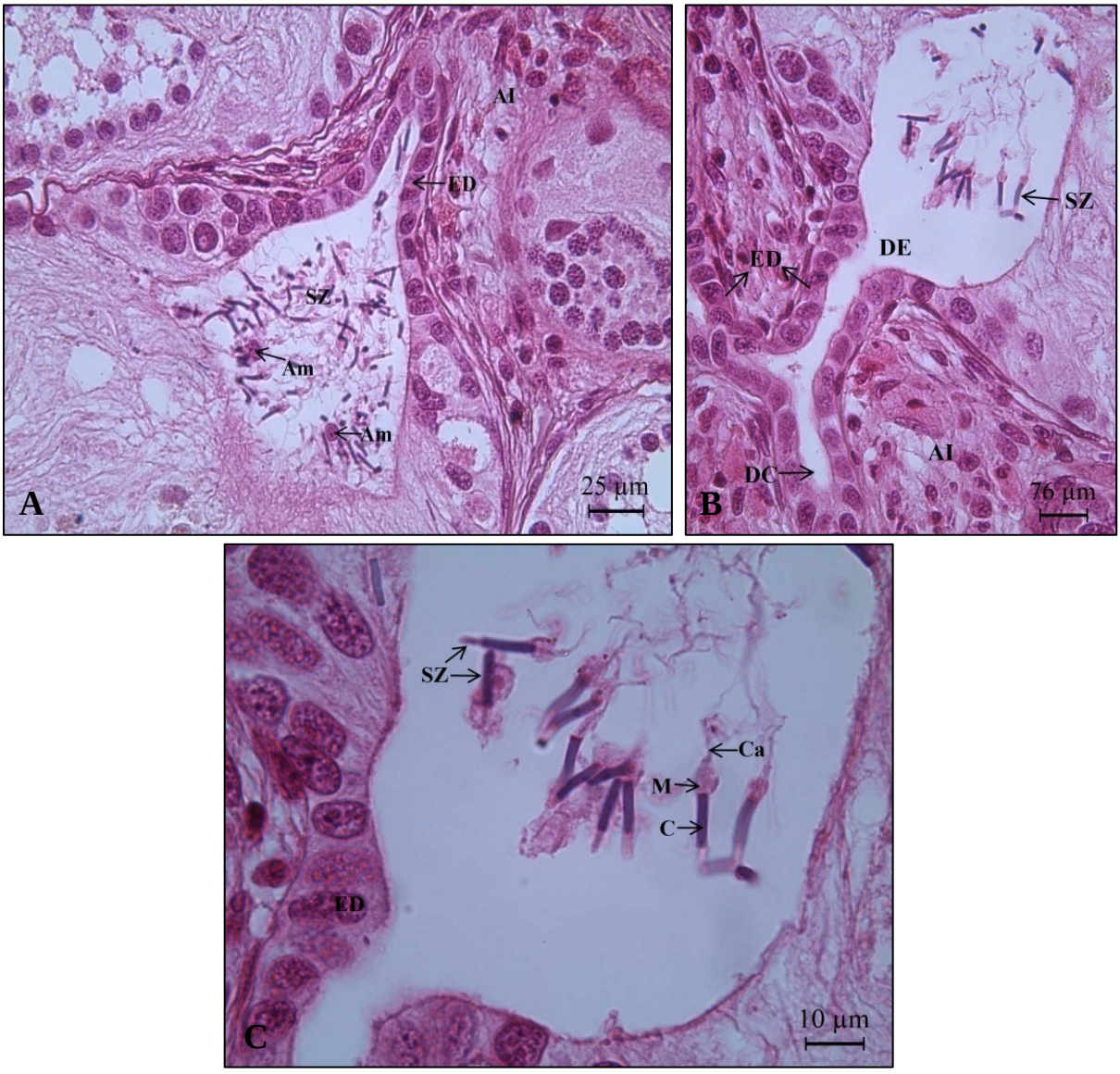


Figura 14: Ducto espermático e ducto coletor no testículo de *S. annulatus.* **A e B)** Ducto espermático contendo espermatozóides e células amebóides. Epitélio do ducto formando o ducto coletor na área intersticial. **C)** Espermatozóides compostos por uma cabeça, uma porção mediana e cauda. **Legenda:** Área intersticial, AI; Célula amebóide, Am; Cabeça, C; Cauda, Ca; Ducto coletor, DC; Ducto espermático, DE; Epitélio do ducto, ED; M, porção mediana; SZ, espermatozóides.

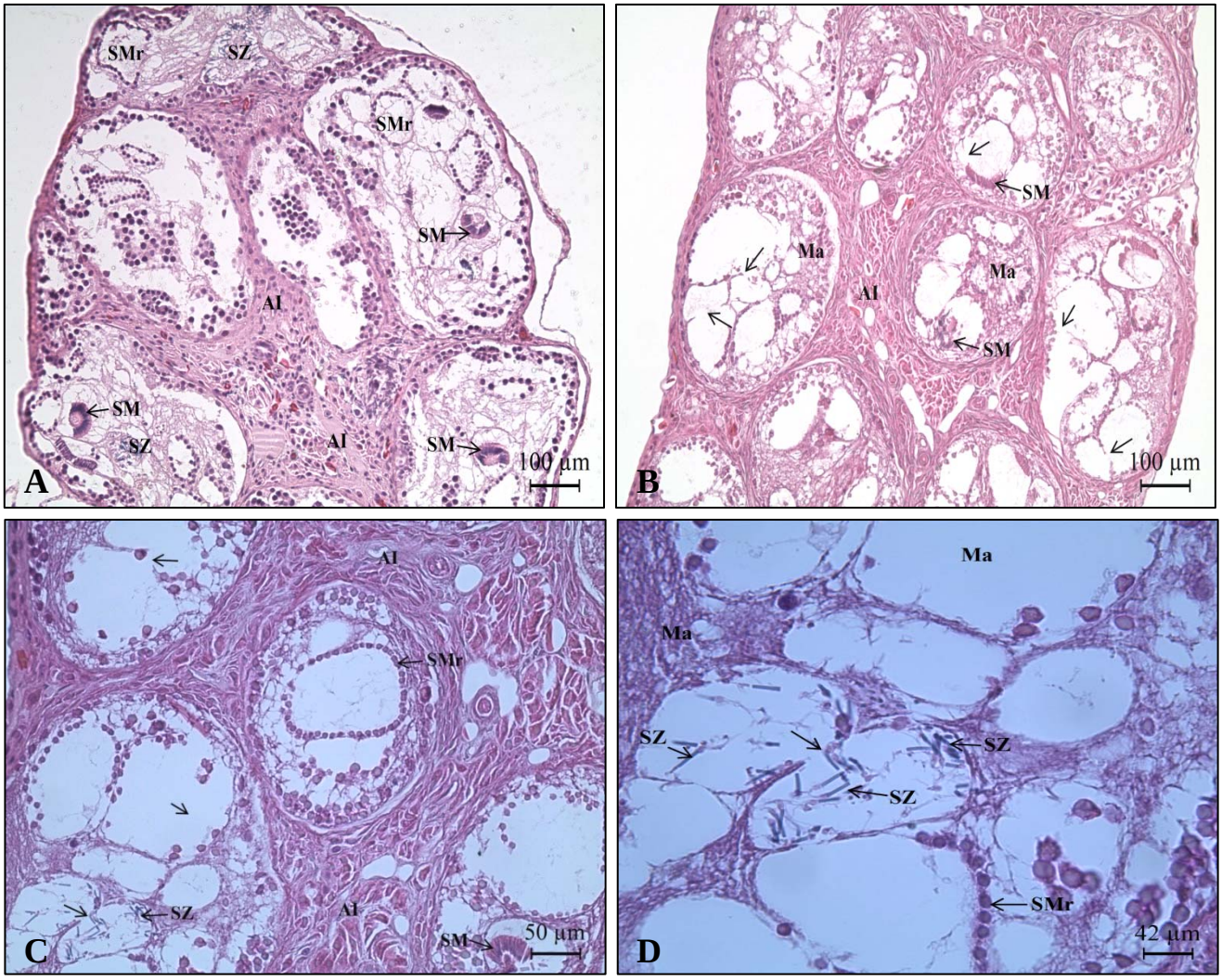
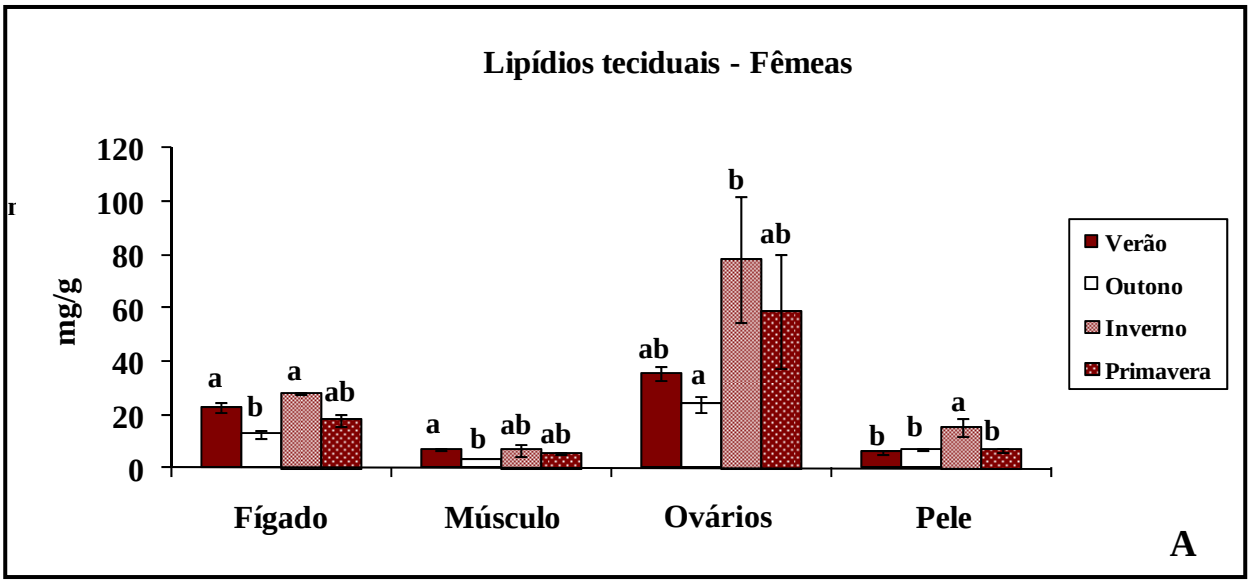


Figura 15: Regressão nos testículos de machos de *S. annulatus.* **A)** Lobos testiculares em fase de regressão inicial caracterizada pela diminuição do diâmetros dos lóbulos e presença de cistos contendo estágios iniciais da espermatogênese, além de espermátides e espermatozóides remanescentes. **B)** Lobos testiculares em um estágio de regressão mais avançado, mostrando o tecido gonadal desestruturado, cistos vazios e rompidos e alguns espermatozóides remanescentes. **C)** Regressão avançada mostrando grande área intersticial e lóbulos contendo alguns cistos com espermátides arredondadas e alongadas, cistos rompidos e espermatozóides remanescentes no ducto espermático. **D)** Lóbulo com cistos rompidos e espermatozóides remanescentes no ducto espermático durante a regressão avançada. **Legenda:** Área intersticial, AI; Matriz lipídica, Ma; Espermátide arredondada, SMr; Espermátide alongada, SM; Espermatozóide, SZ. Setas pretas apontam os cistos rompidos.



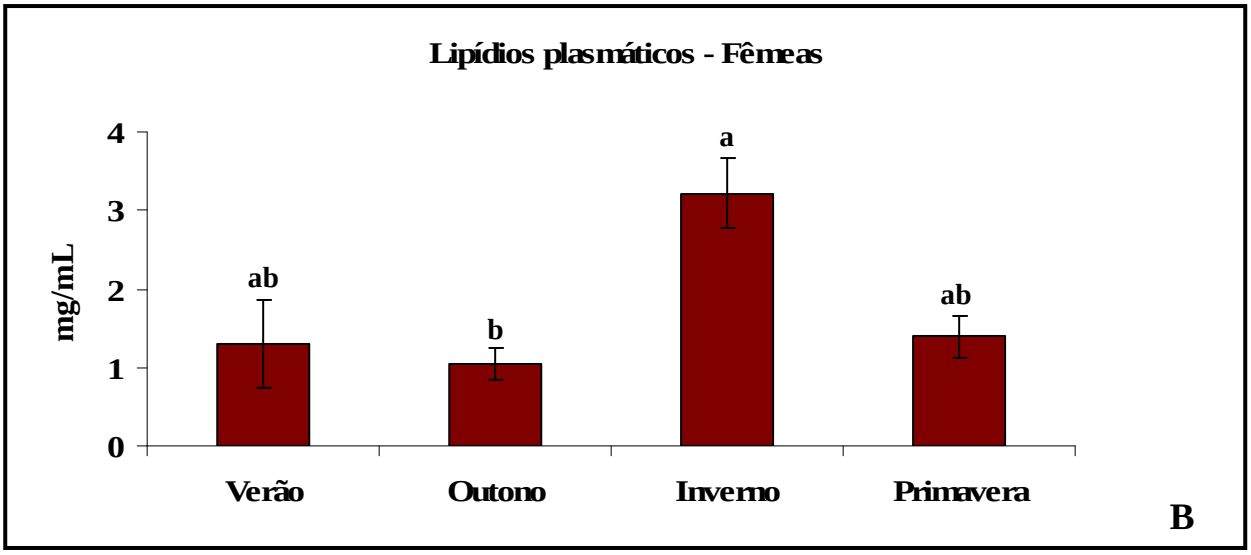
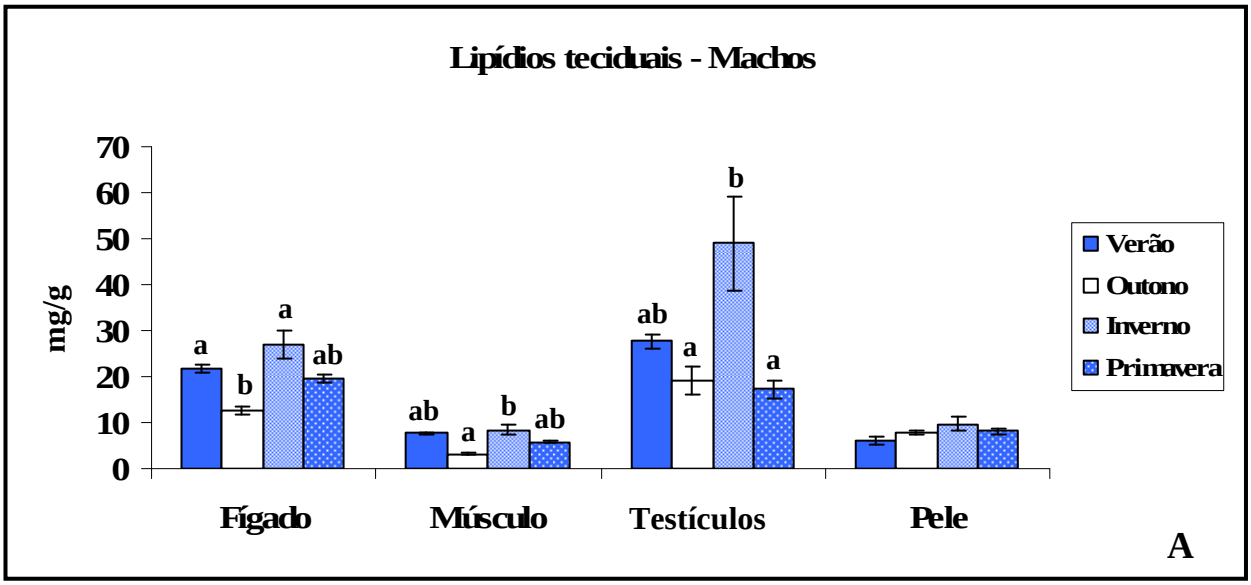


Figura16: Lipídios totais em fêmeas de *S. annulatus* ao longo do ciclo anual. **A)** Lipídios totais teciduais (fígado, músculo, ovários e pele). **B)** Lipídios plasmáticos. [ab]Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas para fêmeas ao longo do ciclo anual.



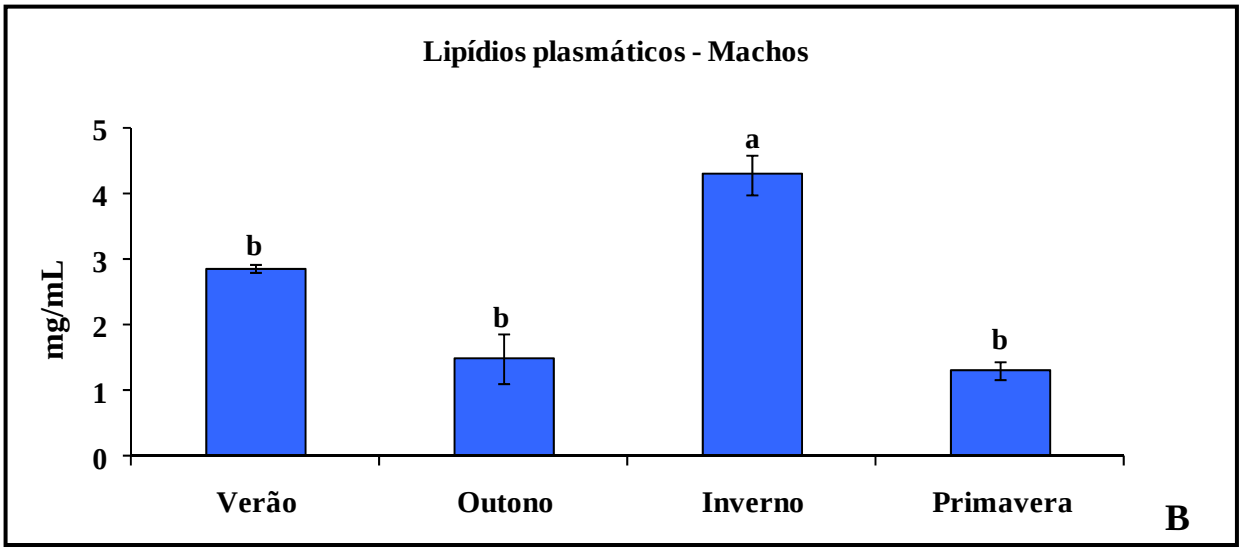


Figura 17: Lipídios totais em machos de *S. annulatus* ao longo do ciclo anual. **A)** Lipídios totais teciduais (fígado, músculo, testículos e pele). **B)** Lipídios plasmáticos. [ab] Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas para machos ao longo do ciclo anual.

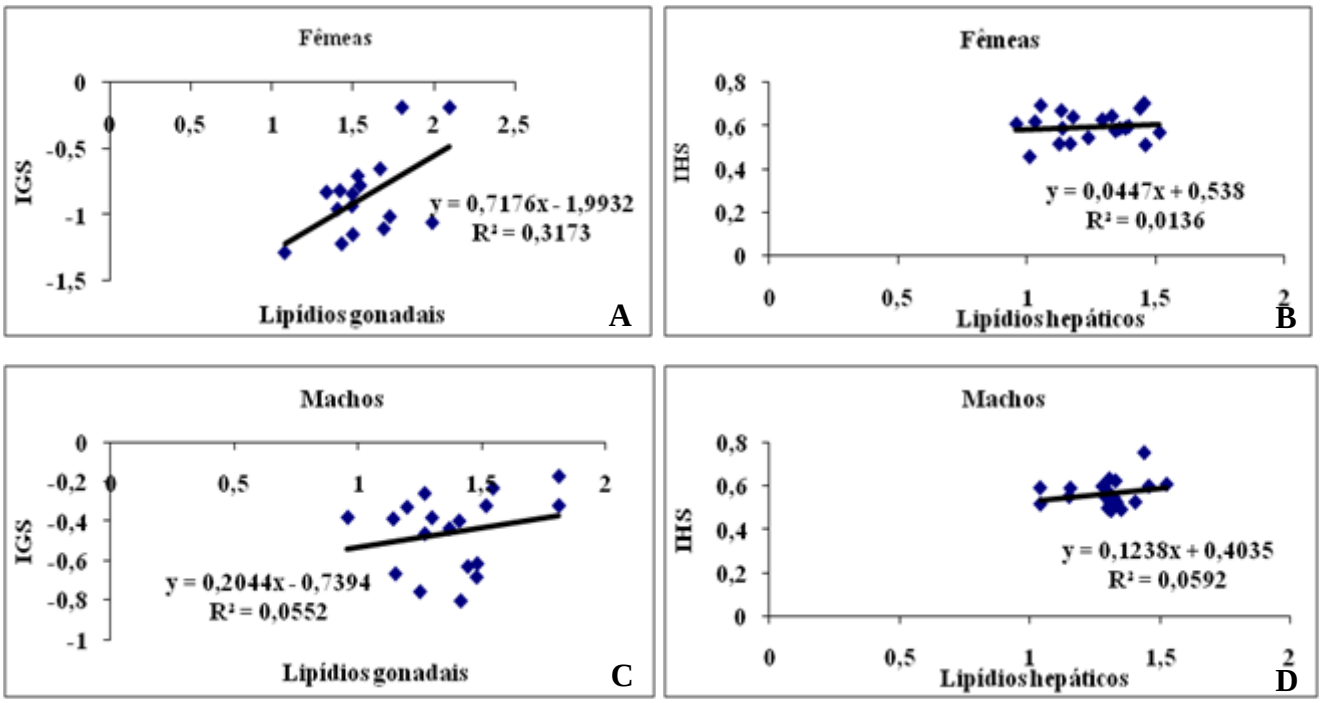
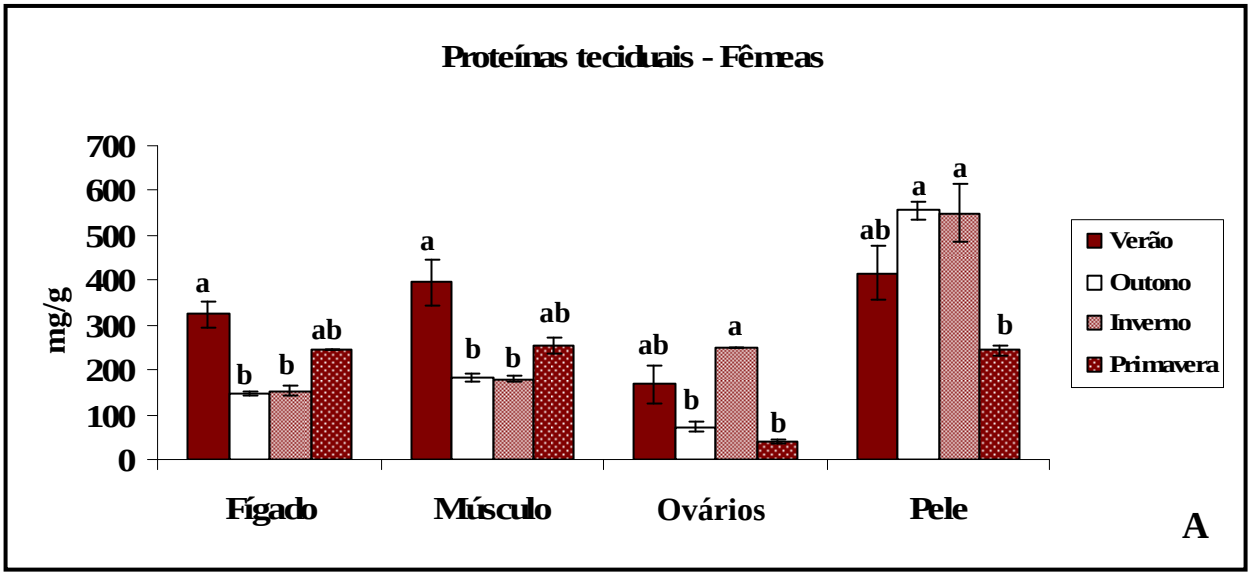


Figura 18: Correlação de Pearson. **A)** Correlação entre IGS e lipídios gonadais para fêmeas de *S. annulatus.* **B)** Correlação entre IHS e lipídios hepáticos para fêmeas de *S. annulatus.* **C)** Correlação entre IGS e lipídios gonadais para machos de *S. annulatus.* **D)** Correlação entre IHS e lipídios hepáticos para machos de *S. annulatus.*



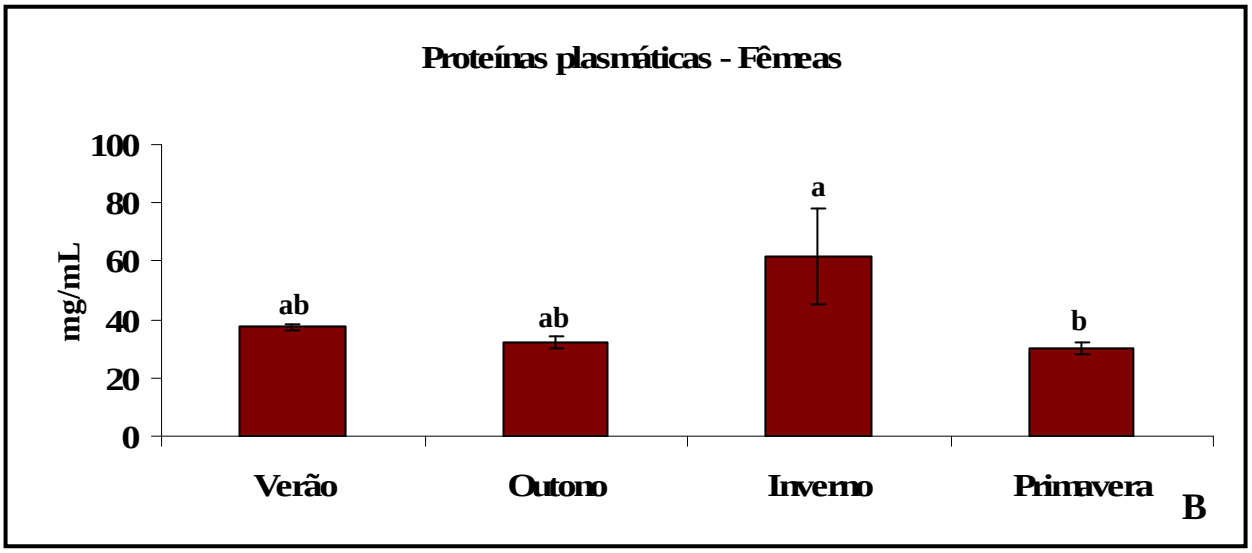


Figura 19: Proteínas totais em fêmeas de *S. annulatus* ao longo do ciclo anual. **A)** Proteínas totais teciduais (fígado, músculo, ovários e pele). **B)** Proteínas plasmáticas. [ab] Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas para fêmeas ao longo do ciclo anual.

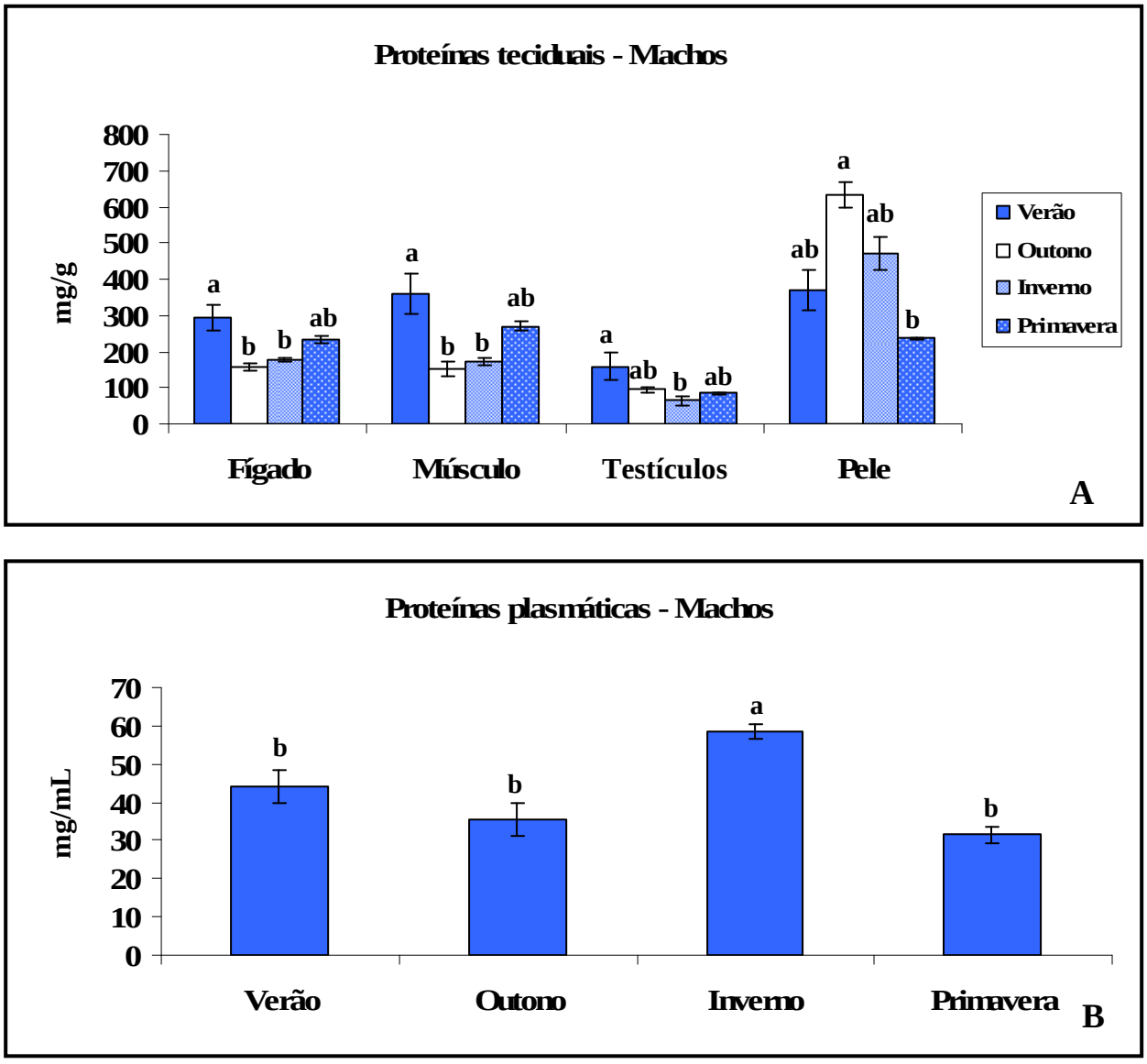


Figura 20: Proteínas totais em machos de *S. annulatus* ao longo do ciclo anual. **A)** Proteínas totais teciduais (fígado, músculo, testículos e pele). **B)** Proteínas plasmáticas. [ab] Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas para machos ao longo do ciclo anual.

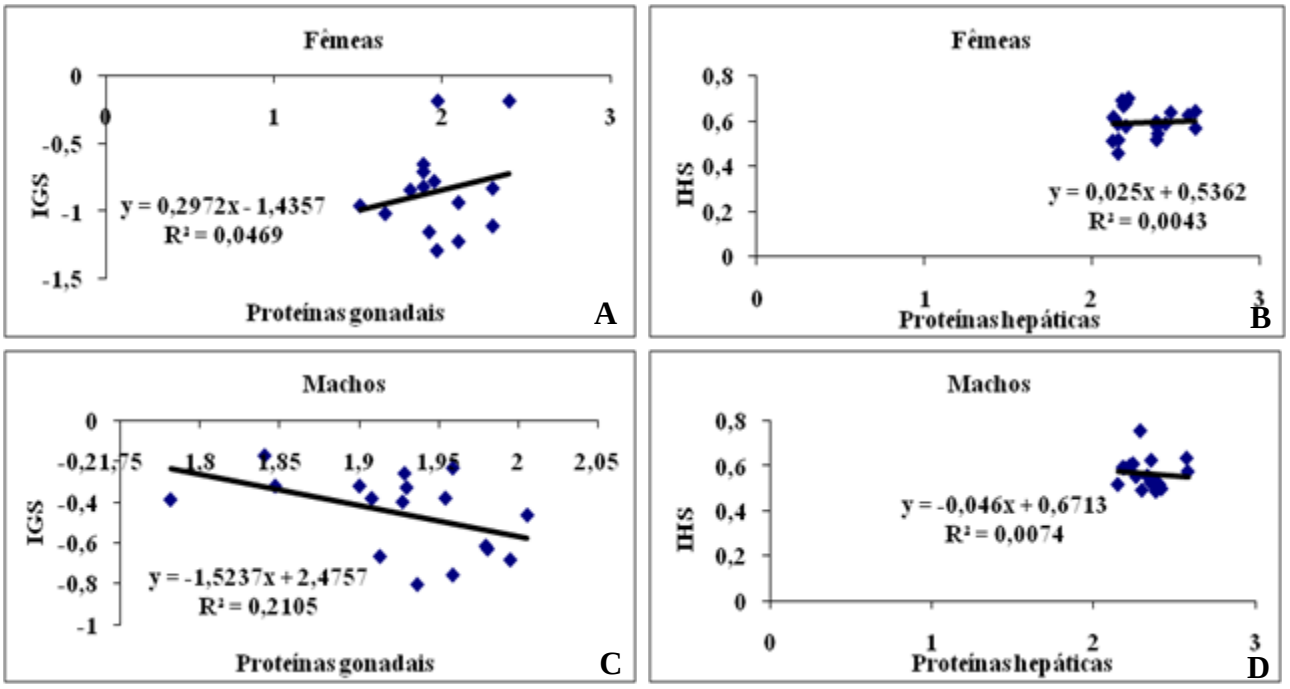


Figura 21: Correlação de Pearson. **A)** Correlação entre IGS e proteínas gonadais para fêmeas de *S. annulatus.* **B)** Correlação entre IHS e proteínas hepáticas para fêmeas de *S. annulatus.* **C)** Correlação entre IGS e proteínas gonadais para machos de *S. annulatus.* **D)** Correlação entre IHS e proteínas hepáticas para machos de *S. annulatus.*

Tabela 3: Nomenclatura dos ácidos graxos encontrados nas amostras de *S. annulatus* de acordo com as regras da IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry).*

Ácido Graxo	Nomenclatura
C14:0	Ácido mirístico
C15:0	Ácido heptadecenóico
C16:0	Ácido palmítico
C17:0	Ácido margárico
C18:0	Ácido esteárico
C20:0	Ácido araquídico
C21:0	Ácido heneicosanóico
C22:0	Ácido behênico
C23:0	Ácido docosanóico
C24:0	Ácido lignocérico
C14:1t	Ácido miristoléico
C15:1c	Ácido pentadecenoléico
C16:1	Ácido palmitoléico
C17:1c	Ácido malválico
C18:1n9c	Ácido oléico
C18:1n11	Ácido vacênico
C20:1n9	Ácido gondoóico
C20:1n11	Ácido gadoléico
C22:1n9	Ácido erúcico
C24:1	Ácido nervônico
C16:2n4	Ácido hexadecadienóico
C18:2n6c	Ácido linoléico
C18:2n6t	Ácido linoléico
C18:3n6	Ácido γ-linolênico
C20:2n6	Ácido eicosadienóico
C20:3n6	Ácido homo- γ-linolênico
C20:4n6	Ácido araquidônico
C22:2n6	Ácido docosadienóico
C22:4n6	Ácido docosatetraenóico
C22:5n6	Ácido docosapentaenóico
C18:3n3	Ácido α-linolênico
C18:4n3	Ácido octadecatetraenóico
C20:3n3	Ácido eicosatrienóico
C20:4n3	Ácido eicosatetraenóico

C20:5n3	Ácido eicosapentanóico
C22:4n3	Ácido docosatetraenóico
C22:5n3	Ácido docosapentanóico
C22:6n3	Ácido docosahexanóico

Tabela 4: Perfil de ácidos graxos totais (%) do tecido adiposo de fêmeas e machos de *Siphonops annulatus* ao longo do ciclo anual (Média ± EPM).

AG (%)	Fêmeas				Machos			
	Verão	**Outono**	**Inverno**	**Primavera**	**Verão**	**Outono**	**Inverno**	**Primavera**
C14:0	1.4±0.19	1.2±0.08	1.9±0.27	0.7±0.04	1.2±0.20	0.9±0.24	1.3±0.15	1.0±0.04
C15:0	0.3±0.03	0.4±0.06	0.4±0.02	0.2±0.03	0.2±0.03	0.3±0.04	0.3±0.02	0.2±0.01
C16:0	16.1±1.24	15.9±0.82	15.3±1.63	12.4±0.69	14.9±1.11^{ab}	16.8±0.31^{b}	12.5±0.36^{a}	13.9±0.75^{ab}
C17:0	0.4±0.03	0.7±0.14	0.6±0.07	0.4±0.09	0.5±0.02	0.5±0.04	0.5±0.03	0.5±0.03
C18:0	9.9±0.88	7.6±1.30	10.1±0.51	8.7±0.33	11.9±1.82	10.1±0.85	9.5±0.32	9.9±0.34
C20:0	0.1±0.02	0.4±0.12	NE	0.1±0.04	0.1±0.00	0.9±0.00	NE	0.8±0.71
C22:0	0.1±0.03	0.3±0.10	NE	0.2±0.05	0.1±0.01	2.2±0.00	NE	0.1±0.00
C23:0	NE	NE	0.5±0.00	NE	NE	0.8±0.00	NE	NE
C24:0	NE	0.2±0.15	0.1±0.00	0.2±0.00	NE	2.0±0.00	0.1±0.00	NE
∑SFA	**28.2±0.85**	**26.1±1.32**	**28.6±2.16**	**22.9±0.35**	**29.0±1.42^{b}**	**30.1±1.57^{b}**	**24.1±0.55^{a}**	**25.9±0.66^{ab}**
C14:1t	0.4±0.03	0.5±0.18	0.3±0.06	0.2±0.10	0.2±0.03	0.2±0.02	0.2±0.03	0.2±0.01
C15:1c	0.1±0.01	0.4±0.13	NE	NE	0.1±0.01	0.1±0.03	0.1±0.00	0.1±0.01
C16:1	4.7±0.26	4.2±0.50	5.2±0.85	3.5±0.61	4.1±0.30	3.6±0.81	3.9±0.24	3.9±0.21
C17:1c	0.4±0.04	0.4±0.05	0.8±0.01	0.3±0.01	0.4±0.02	0.4±0.04	0.6±0.03	0.5±0.03
C18:1n9c	45.3±1.58	43.8±3.40	51.4±2.87	44.7±0.99	45.9±0.82^{bc}	35.1±6.72^{b}	53.4±0.50^{a}	47.5±1.65^{ac}
C18:1n11	3.6±0.20	5.2±0.83	4.1±0.12	3.8±0.70	3.2±0.32	4.2±0.28	5.0±0.20	4.9±0.97
C20:1n9	1.3±0.19	1.9±0.64	0.5±0.05	1.6±0.37	1.3±0.10	1.2±0.14	0.8±0.33	1.8±018
C20:1n11	NE	1.9±0.27	1.4±0.03	2.7±0.00	NE	NE	1.9±0.35	NE
C22:1n9	0.1±0.01	0.1±0.03	NE	NE	NE	0.1±0.06	0.1±0.02	NE
C24:1	NE	NE	0.1±0.02	NE	NE	1.4±0.00	0.2±0.05	NE
∑MUFA	**55.9±1.61**	**57.4±2.83**	**63.5±2.60**	**55.3±2.08**	**55.4±1.15^{bc}**	**47.3±5.26^{b}**	**65.9±0.79^{a}**	**58.7±1.31^{ac}**
C18:2n6c	9.1±1.08^{b}	7.6±1.16^{b}	3.3±0.34^{a}	11.1±0.99^{b}	9.2±0.34^{a}	10.1±1.16^{a}	4.6±0.46^{b}	8.1±0.84^{ab}
C18:3n6	0.2±0.02	0.3±0.13	0.3±0.05	0.1±0.02	0.1±0.00	0.2±0.05	0.2±0.01	0.3±0.21
C20:2n6	0.7±0.04	0.7±0.09	0.4±0.03	0.8±0.21	0.7±0.03	1.0±0.31	0.5±0.06	0.7±0.05
C20:3n6	0.5±0.03	0.9±0.31	0.3±0.03	1.1±0.23	0.5±0.03^{ab}	1.4±0.69^{a}	0.4±0.04^{b}	0.6±0.02 ^{ab}
C20:4n6	1.6±0.09^{ab}	2.2±0.39^{ab}	0.9±0.2^{a}	2.4±0.37^{b}	1.4±0.07	3.8±2.02	1.1±0.09	1.6±0.07
C22:2n6	0.2±0.02	0.2±0.06	0.2±0.00	0.1±0.00	NE	NE	0.2±0.01	NE
C22:4n6	0.6±0.05^{ab}	1.2±0.47^{ab}	0.3±0.04^{a}	1.3±0.48^{b}	0.6±0.05^{ab}	1.2±0.48^{a}	0.6±0.05^{b}	0.7±0.03^{ab}
C22:5n6	0.1±0.00	0.4±0.15	NE	0.1±0.05	0.1±0.00	0.1±0.03	NE	NE
∑PUFAn6	**12.8±1.14^{b}**	**13.3±1.51^{b}**	**5.7±0.53^{a}**	**17.4±0.96^{b}**	**12.6±0.45^{ab}**	**17.9±3.32^{a}**	**7.7±0.64^{b}**	**11.9±0.88^{ab}**
∑C18n6	**9.2±1.07^{b}**	**7.9±1.15^{b}**	**3.6±0.32^{a}**	**11.2±1.01^{b}**	**9.2±0.35^{a}**	**10.3±1.14^{a}**	**4.9±0.46^{b}**	**8.3±0.84^{ab}**
∑C20-22n6	**3.6±0.23^{ab}**	**5.3±1.31^{ab}**	**2.1±0.21^{a}**	**6.1±1.27^{b}**	**3.3±0.17^{ab}**	**7.6±3.51^{a}**	**2.8±0.24^{b}**	**3.6±0.09^{ab}**
C18/20-22n6	**0.4±0.05**	**0.8±0.23**	**0.6±0.01**	**0.5±0.16**	**0.3±0.02**	**0.8±0.40**	**0.6±0.05**	**0.4±0.05**
C18:3n3	0.6±0.05	0.8±0.21	0.2±0.03	0.9±0.29	0.6±0.07	0.7±0.17	0.3±0.09	0.7±0.10
C18:4n3	0.6±0.07	0.5±0.09	0.5±0.11	0.3±0.08	0.6±0.03	0.4±0.03	0.5±0.03	0.5±0.07

C20:3n3	NE	0.1±0.01	0.3±0.00	0.1±0.01	0.1±0.00	0.1±0.04	NE	0.1±0.00
C20:4n3	0.1±0.01	0.1±0.03	0.1±0.00	0.1±0.01	0.1±0.00	0.1±0.01	0.1±0.00	0.1±0.01
C20:5n3	0.3±0.04[ab]	0.3±0.05[ab]	0.2±0.02[a]	0.5±0.26[b]	0.3±0.04[ab]	0.8±0.26[a]	0.3±0.02[b]	0.6±0.14[ab]
C22:5n3	0.7±0.06[ab]	0.8±0.17[ab]	0.5±0.01[a]	1.1±0.0[b]	0.6±0.07	0.9±0.14	0.7±0.03	0.8±0.04
C22:6n3	0.4±0.08	0.2±0.04	NE	0.9±0.54	0.4±0.13	1.2±0.46	NE	0.4±0.09
∑PUFAn3	**2.6±0.20**	**2.7±0.24**	**1.6±0.04**	**4.0±1.14**	**2.6±0.30[ab]**	**4.3±0.92[a]**	**1.8±0.09[b]**	**3.1±0.19[ab]**
∑C18n3	**1.1±0.05**	**1.2±0.23**	**0.81±0.11**	**1.2±0.30**	**1.2±0.06**	**1.1±0.16**	**0.8±0.11**	**1.2±0.10**
∑C20-22n3	**1.5±0.17[ab]**	**1.5±0.25[ab]**	**0.8±0.07[a]**	**2.8±0.86[b]**	**1.4±0.27[ab]**	**3.2±0.92[a]**	**0.9±0.04[b]**	**1.9±0.19[ab]**
C18/20-22n3	**1.3±0.12**	**1.8±0.72**	**1.1±0.26**	**2.1±0.27**	**1.1±0.22**	**3.2±1.29**	**1.2±0.17**	**1.7±0.28**
n3/n6	**0.2±0.03**	**0.2±0.02**	**0.3±0.03**	**0.2±0.06**	**0.2±0.02**	**0.2±0.04**	**0.2±0.03**	**0.3±0.03**
∑PUFAt	**15.5±1.09[b]**	**16.1±1.70[b]**	**7.3±0.51[a]**	**21.4±1.77[b]**	**15.2±0.74[ab]**	**22.3±4.10[a]**	**9.5±0.57[b]**	**14.9±0.91[ab]**
∑Outros	**0.3±0.03**	**0.4±0.05**	**0.5±0.08**	**0.2±0.04**	**0.3±0.00**	**0.3±0.06**	**0.5±0.01**	**0.4±0.03**

[ab] Letras diferentes significam diferenças estatísticas *(P<0.05)* ao longo do ciclo anual para machos e fêmeas. Valores abaixo de 0.1 não foram considerados. ∑SFA, ∑MUFA, ∑PUFA, ∑PUFAn6, ∑C18n6, ∑C20-22n6, ∑PUFAn3, ∑C18n3, ∑C20-22n3 e ∑PUFAt, são as somatórias dos ácidos graxos saturados, monoinsaturados, polinsaturados n6, cadeias curtas de polinsaturados n6, cadeias longas de polinsaturados n6, polinsaturados n3, cadeias curtas de polinsaturados n3, cadeias longas de polinsaturados n3 e polinsaturados totais. NE – não encontrado.

Tabela 5: Perfil de ácidos graxos (%) da fração polar hepática de fêmeas e machos de *Siphonops annulatus* ao longo do ciclo anual (Média ± EPM).

AG (%)	Fêmeas				Machos			
	Verão	**Outono**	**Inverno**	**Primavera**	**Verão**	**Outono**	**Inverno**	**Primavera**
C14:0	0.3±0.09	0.2±0.02	0.2±0.08	0.1±0.01	0.1±0.04	0.1±0.01	0.3±0.14	0.1±0.01
C15:0	0.1±0.04	0.1±0.03	0.1±0.00	0.2±0.04	0.1±0.02	NE	0.2±0.11	0.1±0.04
C16:0	7.4±1.54	6.0±0.72	5.6±1.07	4.8±0.72	5.7±0.46	5.6±0.91	6.1±0.99	5.2±0.70
C17:0	0.3±0.03	0.5±0.14	0.3±0.05	0.3±0.06	0.3±0.02	0.4±0.02	0.4±0.03	0.4±0.03
C18:0	19.4±2.44[b]	29.8±1.53[a]	21.4±1.40[b]	16.9±0.36[b]	22.2±1.45[b]	33.3±1.59[a]	20.9±0.65[b]	17.8±0.7[b]
C20:0	0.2±0.02[b]	0.2±0.03[a]	0.2±0.02[ab]	3.2±0.99[b]	0.2±0.02	0.3±0.05	0.21±0.02	0.2±0.01
C21:0	0.1±0.02	NE	NE	NE	0.1±0.01	0.6±0.41	NE	0.1±0.01
C22:0	0.3±0.08	0.4±0.04	0.5±0.12	0.4±0.12	0.3±0.05	0.7±0.26	0.4±0.06	0.2±0.04
C23:0	0.2±0.05	0.3±0.04	0.3±0.08	0.2±0.07	0.1±0.03	0.2±0.06	0.2±0.08	0.2±0.03
C24:0	0.6±0.17	0.6±0.12	0.6±0.21	0.5±0.15	0.4±0.07	0.4±0.12	0.4±0.11	0.5±0.08
∑SFA	**28.9±1.54[b]**	**38.2±2.28[a]**	**29.4±2.42[b]**	**26.9±0.85[b]**	**29.6±1.98 [b]**	**41.6±2.72[a]**	**29.2±1.18[b]**	**25.1±0.26[b]**
C14:1t	NE	NE	0.1±0.00	NE	NE	NE	0.1±0.00	NE
C15:1c	0.4±0.11	NE	0.2±0.05	NE	0.2±0.09	NE	0.3±0.11	0.2±0.03
C16:1	1.5±0.68	0.8±0.05	0.7±0.17	0.6±0.17	0.5±0.11	0.5±0.04	1.0±0.29	0.5±0.06
C17:1c	0.5±0.11	NE	0.3±0.10	0.3±0.05	0.4±0.30	NE	0.4±0.17	0.3±0.05
C18:1n9c	13.5±3.88	9.1±0.81	8.4±0.95	8.6±2.41	7.4±1.17	7.7±0.76	10.1±1.68	8.0±0.67
C18:1n11	3.0±0.15	3.6±0.30	3.5±0.24	3.7±0.89	2.7±0.07	3.3±0.18	4.0±0.44	3.4±0.24
C20:1n9	2.0±0.32	1.7±0.30	2.3±0.32	0.2±0.05	2.3±0.19	2.2±0.38	2.6±0.16	2.9±0.36
C20:1n11	1.4±0.00	1.3±0.06	NE	0.9±0.00	NE	NE	NE	NE
C22:1n9	0.2±0.03	0.2±0.04	0.3±0.05	NE	0.2±0.03	0.2±0.06	0.3±0.03	NE
C24:1	1.0±0.18	1.3±0.15	2.3±0.56	2.6±0.25	1.1±0.18	1.7±0.45	2.0±0.32	2.3±0.17
∑MUFA	**22.2±4.60**	**17.1±1.01**	**18.2±0.74**	**16.5±3.61**	**14.6±1.55**	**15.7±1.58**	**20.9±2.37**	**17.5±0.93**
C16:2n4	0.3±0.12	NE	NE	NE	NE	NE	0.2±0.03	NE
C18:2n6c	8.6±1.28[a]	4.6±0.79[b]	5.4±0.43[ab]	4.1±0.24[b]	NE	NE	6.0±0.56	6.7±0.83
C18:2n6t	NE	NE	NE	NE	8.4±0.54	5.7±0.59	NE	NE
C18:3n6	0.2±0.08	0.1±0.00	NE	0.1±0.02	0.1±0.01	NE	0.1±0.03	0.1±0.00
C20:2n6	1.4±0.08	1.3±0.11	1.3±0.09	2.1±0.41	1.7±0.07	1.3±0.09	1.3±0.14	2.0±0.13
C20:3n6	4.3±0.67	3.4±0.25	3.8±0.18	4.5±0.24	5.4±0.50	4.3±0.52	3.8±0.18	5.0±0.32
C20:4n6	19.2±3.50	21.7±1.91	24.4±1.94	23.9±3.19	24.2±1.45[b]	18.5±1.65[a]	22.9±2.45[b]	23.2±1.19[b]
C22:2n6	0.8±0.59	0.7±0.19	1.2±0.82	0.6±0.31	0.8±0.00	0.1±0.00	1.6±0.21	0.2±0.03
C22:4n6	3.6±0.54	4.2±0.45	4.6±0.60	7.9±0.89	4.1±0.37	3.4±0.33	3.6±0.49	5.7±0.22
C22:5n6	1.1±0.31	0.5±0.10	0.4±0.05	0.6±0.04	0.6±0.12	0.3±0.07	0.4±0.09	0.6±0.06
∑PUFAn6	**39.3±3.29**	**36.4±1.97**	**41.4±1.57**	**43.8±3.25**	**44.9±1.79[b]**	**33.7±2.63[a]**	**39.5±2.64[ab]**	**43.6±0.99[b]**
∑C18n6	**8.8±1.36[a]**	**4.6±0.78[b]**	**5.4±0.43[ab]**	**4.2±0.20[b]**	**8.5±0.55**	**5.7±0.59**	**6.0±0.55**	**6.8±0.83**
∑C20-22n6	**30.4±4.41**	**31.7±2.15**	**36.0±1.95**	**39.5±3.37**	**36.3±2.10[b]**	**28.0±2.08[a]**	**33.4±2.45[b]**	**36.7±1.29[b]**
C18/20-22n6	**4.0±0.74**	**9.2±2.20**	**6.8±0.88**	**9.3±1.18**	**4.3±0.45**	**4.9±0.25**	**5.6±0.57**	**6.1±1.19**

C18:3n3	0.2±0.10	0.1±0.02	0.2±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	0.2±0.04	0.1±0.03
C18:4n3	0.1±0.02	0.1±0.00	NE	NE	NE	0.1±0.00	NE	0.1±0.00
C20:3n3	0.1±0.01	NE	0.1±0.02	0.2±0.03	0.1±0.02	0.1±0.02	NE	0.2±0.02
C20:4n3	0.4±0.16	0.2±0.02	0.2±0.02	0.1±0.04	0.2±0.04	0.1±0.02	0.2±0.02	0.3±0.06
C20:5n3	2.1±0.44[ab]	1.2±0.26[a]	2.1±0.15[ab]	2.7±1.20[b]	2.3±0.47[ab]	1.4±0.52[a]	2.2±0.22[ab]	3.4±0.42[b]
C22:5n3	1.6±0.29[ab]	1.6±0.18[a]	3.1±0.46 [ab]	3.4±0.34[b]	2.2±0.31[ab]	1.6±0.31[a]	3.0±0.23[ab]	4.0±0.09[b]
C22:6n3	4.5±0.83[ab]	2.5±0.47[a]	4.3±0.93[b]	5.9±1.30[b]	4.9±1.14[ab]	2.4±0.82[a]	3.1±0.35[ab]	5.1±0.58[b]
∑PUFAn3	**8.8±1.28[ab]**	**5.7±0.84[a]**	**10.3±1.52[b]**	**12.7±2.58[b]**	**10.0±1.87[ab]**	**5.8±1.66[a]**	**8.9±0.42[ab]**	**13.3±0.99[b]**
∑C18n3	**0.2±0.11**	**0.1±0.03**	**0.2±0.01**	**0.1±0.01**	**0.1±0.01**	**0.1±0.03**	**0.2±0.04**	**0.1±0.02**
∑C20-22n3	**8.6±1.35[ab]**	**5.5±0.83[a]**	**10.1±1.53[ab]**	**12.5±2.58[b]**	**9.9±1.87[ab]**	**5.7±1.68[a]**	**8.7±0.42[ab]**	**13.2±0.99[b]**
C18/20-22n3	**52.0±17.63**	**38.7±7.52**	**38.7±7.60**	**80.1±21.06**	**65.2±14.88**	**42.3±16.12**	**41.7±8.73**	**90.6±12.08**
n3/n6	**0.2±0.02**	**0.1±0.02**	**0.2±0.03**	**0.3±0.06**	**0.2±0.04**	**0.1±0.03**	**0.2±0.02**	**0.3±0.03**
∑PUFAt	**48.3±4.26**	**42.1±2.64**	**51.7±3.09**	**56.5±3.55**	**54.9±3.13[b]**	**39.6±4.23[a]**	**48.6±2.79[ab]**	**57.0±0.76[b]**
∑Outros	**1.1±0.05**	**2.4±0.32**	**0.9±0.14**	**0.1±0.00**	**0.7±0.05**	**2.9±0.38**	**1.6±0.32**	**0.27±0.06**

[ab] Letras diferentes significam diferenças estatísticas *(P<0.05)* ao longo do ciclo anual para machos e fêmeas. Valores abaixo de 0.1 não foram considerados. ∑SFA, ∑MUFA, ∑PUFA, ∑PUFAn6, ∑C18n6, ∑C20-22n6, ∑PUFAn3, ∑C18n3, ∑C20-22n3 e ∑PUFAt, são as somatórias dos ácidos graxos saturados, monoinsaturados, polinsaturados n6, cadeias curtas de polinsaturados n6, cadeias longas de polinsaturados n6, polinsaturados n3, cadeias curtas de polinsaturados n3, cadeias longas de polinsaturados n3 e polinsaturados totais. NE – não encontrado.

Tabela 6: Perfil de ácidos graxos (%) da fração polar muscular de fêmeas e machos de *Siphonops annulatus* ao longo do ciclo anual (Média ± EPM).

AG (%)	Fêmeas				Machos			
	Verão	**Outono**	**Inverno**	**Primavera**	**Verão**	**Outono**	**Inverno**	**Primavera**
C14:0	1.2±0.15	0.5±0.05	1.1±0.37	1.4±0.07	1.4±0.20	0.5±0.12	1.1±0.13	1.0±0.06
C15:0	0.4±0.08	0.2±0.02	0.6±0.27	0.9±0.00	0.5±0.14	0.3±0.06	0.6±0.14	0.3±0.19
C16:0	7.6±0.50	5.7±0.19	7.9±1.31	7.9±1.35	8.2±1.03[b]	6.2±1.06[ab]	9.6±0.78[b]	6.4±0.24[a]
C17:0	0.5±0.12	0.3±0.02	0.4±0.09	0.4±0.04	0.6±0.21	0.3±0.05	0.5±0.07	0.5±0.05
C18:0	17.5±0.63	18.4±0.68	16.3±1.58	17.2±1.16	19.1±1.11[b]	18.5±0.60[ab]	18.8±1.08[b]	16.0±0.73[a]
C20:0	0.4±0.09	0.2±0.02	0.2±0.03	0.5±0.12	0.5±0.13	0.2±0.02	0.4±0.09	0.6±0.05
C21:0	0.3±0.03	NE	0.2±0.00	0.3±0.10	0.3±0.03	NE	0.3±0.03	0.2±0.02
C22:0	0.1±0.01	0.2±0.04	0.2±0.10	0.2±0.02	0.1±0.01	0.2±0.05	NE	0.3±0.02
C24:0	0.2±0.03	0.1±0.02	0.4±0.19	0.2±0.01	0.2±0.10	0.1±0.04	0.2±0.00	0.9±0.63
∑SFA	**28.4±0.71**	**25.9±0.81**	**27.4±2.71**	**28.5±2.69**	**30.9±1.02[b]**	**26.4±1.72[ab]**	**31.4±0.50[b]**	**26.3±1.04[a]**
C14:1t	0.5±0.09	0.1±0.01	0.2±0.00	0.4±0.04	0.4±0.10	NE	0.4±0.12	0.4±0.03
C15:1c	3.6±1.07	0.3±0.08	1.9±0.00	NE	NE	0.4±0.10	0.4±0.02	0.3±0.09
C16:1	1.8±0.39	2.3±0.48	2.8±0.98	2.7±0.49	1.7±0.47	2.6±0.44	2.7±0.51	1.5±0.17
C17:1c	0.8±0.23	0.2±0.10	0.3±0.16	NE	0.8±0.31	NE	0.5±0.14	NE
C18:1n9c	11.5±0.49	10.6±1.01	10.9±1.08	13.1±0.63	11.7±1.04[ab]	8.7±0.76[a]	13.8±0.22[b]	12.2±0.46[ab]
C18:1n11	2.7±0.11	2.8±0.26	2.1±0.17	2.7±0.29	2.8±0.17	2.6±0.22	2.8±0.32	2.8±0.16
C20:1n9	0.4±0.05	0.5±0.05	0.4±0.07	0.5±0.00	0.6±0.11	0.4±0.06	0.6±0.08	NE
C22:1n9	0.1±0.01	0.1±0.01	0.3±0.09	NE	0.8±0.00	0.1±0.04	0.3±0.01	NE
C24:1	0.5±0.13	0.4±0.04	0.7±0.11	1.0±0.01	0.6±0.25	0.4±0.13	0.6±0.01	1.3±0.09
∑MUFA	**20.0±1.34**	**17.4±0.81**	**18.5±2.78**	**20.2±0.75**	**18.4±1.55[ab]**	**15.5±1.06[a]**	**21.8±1.02[b]**	**18.3±0.61[ab]**
C16:2n4	0.1±0.05	NE	0.7±0.26	NE	NE	0.1±0.01	0.8±0.18	NE
C18:2n6c	8.5±0.51[b]	6.1±0.92[ab]	4.9±0.14[a]	7.3±0.07[b]	8.7±0.26[b]	6.7±0.56[a]	6.2±0.69[a]	8.5±0.44[b]
C18:3n6	0.3±0.07	0.2±0.03	2.1±1.88	0.4±0.11	0.2±0.05	0.1±0.04	0.2±0.03	0.2±0.03
C20:2n6	0.9±0.07	0.9±0.17	0.7±0.14	0.7±0.14	0.7±0.15	0.8±0.24	0.9±0.21	1.2±0.08
C20:3n6	4.6±0.29	5.0±0.37	3.6±0.22	4.7±0.46	4.0±0.21[ab]	4.9±0.39[b]	3.8±0.30[a]	5.0±0.25[ab]
C20:4n6	22.3±0.81[a]	27.1±1.43[b]	22.6±2.89[ab]	21.9±1.03[ab]	22.8±1.38[ab]	26.3±1.43[b]	21.8±0.52[a]	22.2±0.62[ab]
C22:2n6	0.7±0.27	0.1±0.03	2.1±1.73	0.4±0.11	0.2±0.07	0.2±0.04	0.3±0.15	0.5±0.20
C22:4n6	2.1±0.18	3.0±0.22	3.1±0.39	2.20±0.18	1.6±0.15	2.8±0.81	2.2±0.31	3.0±0.33
C22:5n6	0.6±0.06	0.7±0.08	1.8±1.11	0.52±0.08	0.7±0.10	0.7±0.13	0.4±0.09	0.6±0.44
∑PUFAn6	**39.8±1.19**	**43.2±0.82**	**40.4±3.53**	**38.4±0.76**	**39.3±1.19[ab]**	**42.6±1.86[b]**	**35.9±0.53[a]**	**41.3±1.05[b]**
∑C18n6	**8.9±0.48**	**6.1±0.93**	**6.4±1.40**	**7.8±0.15**	**9.0±0.29[b]**	**6.8±0.52[a]**	**6.3±0.70[a]**	**8.7±0.43[b]**
∑C20-22n6	**30.9±1.16[a]**	**37.0±1.51[b]**	**34.0±2.81[ab]**	**30.6±0.86[ab]**	**30.2±1.39[ab]**	**35.8±2.38[b]**	**29.6±0.20[a]**	**32.6±0.78[ab]**
C18/20-22n6	**3.5±0.27**	**7.18±1.39**	**5.7±0.99**	**3.9±0.17**	**3.3±0.24**	**5.4±0.76**	**4.7±0.56**	**3.7±0.17**
C18:3n3	0.2±0.02	0.3±0.03	0.1±0.01	0.2±0.05	0.2±0.04	0.2±0.03	0.2±0.02	0.2±0.02
C18:4n3	0.3±0.09	0.4±0.05	0.2±0.06	0.3±0.10	0.1±0.00[a]	0.4±0.07[b]	0.3±0.08[ab]	0.2±0.08[ab]
C20:3n3	0.2±0.04	0.1±0.01	NE	NE	NE	0.1±0.00	NE	0.2±0.03

C20:4n3	0.2±0.01	0.2±0.04	0.2±0.02	0.4±0.06	0.3±0.02	0.2±0.01	0.2±0.03	0.2±0.02
C20:5n3	2.4±0.27	1.6±0.26	4.0±2.33	2.3±0.67	1.7±0.19[ab]	2.4±0.53[b]	1.6±0.14[a]	2.7±0.26[ab]
C22:4n3	NE	NE	2.9±0.00	0.3±0.05	NE	NE	NE	NE
C22:5n3	3.3±0.22	5.0±0.51	3.8±0.06	3.2±0.71	3.3±0.35	4.7±0.57	3.5±0.29	4.3±0.61
C22:6n3	4.7±0.67	3.9±0.38	3.2±0.46	5.0±1.78	5.3±0.82[ab]	5.5±1.12[b]	2.2±0.46[a]	4.8±0.71[ab]
∑PUFAn3	**10.9±0.92**	**11.6±0.91**	**11.5±2.03**	**11.7±3.36**	**10.7±1.17[ab]**	**13.7±1.63[b]**	**8.1±0.73[a]**	**12.8±1.20[ab]**
∑C18n3	**0.5±0.05**	**0.6±0.06**	**0.4±0.05**	**0.6±0.15**	**0.3±0.04[a]**	**0.6±0.10[b]**	**0.5±0.05[ab]**	**0.4±0.07[ab]**
∑C20-22n3	**10.7±0.94**	**10.9±0.94**	**11.0±2.03**	**11.1±3.34**	**10.5±1.20[ab]**	**13.0±1.66[b]**	**7.5±0.78[a]**	**12.3±1.21[ab]**
C18/20-22n3	**38.7±4.88**	**19.0±3.93**	**27.6±6.02**	**20.5±8.86**	**54.6±15.07**	**23.8±5.44**	**14.3±3.04**	**30.9±5.84**
n3/n6	**0.2±0.02**	**0.2±0.02**	**0.2±0.05**	**0.3±0.09**	**0.3±0.03**	**0.3±0.04**	**0.2±0.02**	**0.3±0.03**
∑PUFAt	**50.8±1.77**	**54.8±1.00**	**52.6±4.74**	**50.2±2.96**	**50.0±2.08[ab]**	**56.4±2.69[b]**	**44.6±0.88[a]**	**54.2±1.49[b]**
∑Outros	**0.7±0.16**	**1.8±0.22**	**1.3±0.51**	**0.9±0.26**	**0.7±0.27**	**1.6±0.13**	**2.0±0.23**	**1.0±0.16**

[ab] Letras diferentes significam diferenças estatísticas *(P<0.05)* ao longo do ciclo anual para machos e fêmeas. Valores abaixo de 0.1 não foram considerados. ∑SFA, ∑MUFA, ∑PUFA, ∑PUFAn6, ∑C18n6, ∑C20-22n6, ∑PUFAn3, ∑C18n3, ∑C20-22n3 e ∑PUFAt, são as somatórias dos ácidos graxos saturados, monoinsaturados, polinsaturados n6, cadeias curtas de polinsaturados n6, cadeias longas de polinsaturados n6, polinsaturados n3, cadeias curtas de polinsaturados n3, cadeias longas de polinsaturados n3 e polinsaturados totais. NE – não encontrado.

Tabela 7: Perfil de ácidos graxos (%) da fração polar gonadal de fêmeas e machos de *Siphonops annulatus* ao longo do ciclo anual (Média ± EPM).

AG (%)	Fêmeas				Machos			
	Verão	**Outono**	**Inverno**	**Primavera**	**Verão**	**Outono**	**Inverno**	**Primavera**
C14:0	0.6±0.15	0.7±0.15	0.3±0.01	0.5±0.08	0.4±0.09	0.7±0.14	0.3±0.07	0.5±0.05
C15:0	0.2±0.04	0.4±0.09	0.1±0.04	0.2±0.02	0.1±0.01	0.4±0.06	0.2±0.02	0.5±0.23
C16:0	7.4±0.52	10.1±1.11	6.2±0.51	6.4±0.27	9.0±0.90	11.7±0.96	9.9±0.93	8.6±0.32
C17:0	0.3±0.04	0.5±0.07	0.4±0.04	0.6±0.07	0.3±0.05	0.4±0.06	0.3±0.01	0.3±0.03
C18:0	19.6±0.82	20.6±1.58	18.0±0.70	19.0±0.88	17.7±0.91[ab]	20.1±0.78[a]	12.1±0.68[b]	12.2±0.51[b]
C20:0	0.9±0.21	0.3±0.04	0.3±0.09	1.2±0.25	0.6±0.28	0.2±0.04	0.2±0.06	1.6±0.14
C21:0	0.3±0.03	0.4±0.00	0.1±0.03	0.4±0.04	0.1±0.02	0.8±0.68	0.1±0.00	0.2±0.06
C22:0	0.4±0.03	0.3±0.05	0.5±0.15	0.5±0.01	0.2±0.01	0.3±0.11	0.1±0.01	0.3±0.02
C23:0	0.2±0.03	0.1±0.00	0.1±0.00	NE	3.6±0.00	0.1±0.00	0.1±0.00	0.1±0.01
C24:0	0.6±0.08	0.3±0.05	0.4±0.06	0.8±0.02	0.2±0.05	0.1±0.06	0.2±0.02	0.3±0.03
∑SFA	**30.5±0.97**	**33.5±2.21**	**26.5±0.27**	**29.7±0.42**	**29.5±2.30[ab]**	**34.5±0.54[a]**	**23.6±1.35[b]**	**24.5±0.51[b]**
C14:1t	0.3±0.07	0.1±0.00	0.1±0.00	0.3±0.03	0.2±0.05	NE	0.1±0.00	0.2±0.02
C15:1c	1.5±0.52	0.2±0.03	0.1±0.00	0.2±0.05	1.2±0.38	0.3±0.12	0.1±0.00	0.8±0.34
C16:1	1.4±0.19	2.8±0.40	1.2±0.19	1.1±0.18	1.2±0.27	2.3±0.34	1.7±0.13	1.4±0.08
C17:1c	1.1±0.27	0.2±0.02	0.2±0.08	0.5±0.00	1.4±0.14	0.3±0.00	0.3±0.03	0.7±0.21
C18:1n9c	14.2±0.49	16.6±1.27	14.7±1.21	11.8±1.43	17.6±2.23	15.5±1.19	20.4±0.52	17.9±0.66
C18:1n11	2.7±0.12	2.9±0.32	3.2±0.46	2.4±0.31	2.7±0.21	2.7±0.13	2.9±0.21	2.6±0.14
C20:1n9	1.0±0.08	0.9±0.11	1.7±0.49	0.1±0.02	1.8±0.21	0.9±0.11	1.5±0.23	0.2±0.00
C20:1n11	NE	0.7±0.00	NE	NE	0.3±0.00	NE	NE	NE
C22:1n9	0.2±0.03	0.1±0.02	0.2±0.01	NE	0.1±0.00	0.1±0.01	0.2±0.07	NE
C24:1	1.8±0.41	0.9±0.14	1.9±0.15	2.1±0.31	1.3±0.13	0.7±0.09	2.6±0.89	1.8±0.13
∑MUFA	**22.2±0.71**	**24.9±1.70**	**23.2±0.51**	**18.2±2.23**	**25.9±2.82**	**22.6±1.40**	**29.9±1.30**	**25.1±0.98**
C16:2n4	0.2±0.00	NE	0.2±0.04	NE	0.1±0.00	NE	0.3±0.12	0.1±0.00
C18:2n6c	0.2±0.05	NE	NE	0.4±0.13	3.7±0.30[ab]	3.9±0.26[a]	1.5±0.05[b]	2.3±0.19[b]
C18:2n6t	4.7±0.17	3.7±0.55	3.8±0.40	4.0±0.36	NE	NE	NE	NE
C18:3n6	0.2±0.07	0.6±0.00	0.3±0.13	0.4±0.06	0.2±0.03	0.3±0.11	0.3±0.24	0.2±0.03
C20:2n6	0.8±0.06	0.6±0.06	1.1±0.21	0.8±0.13	1.0±0.14	0.6±0.08	0.6±0.02	0.8±0.04
C20:3n6	3.9±0.15	3.0±0.31	3.1±0.24	3.6±0.42	4.4±0.40	3.9±0.21	2.8±0.20	4.5±0.22
C20:4n6	20.8±0.62	19.8±1.78	23.5±1.50	22.6±1.59	18.5±2.70	18.4±1.22	16.3±1.18	16.4±0.33
C22:2n6	0.5±0.43	0.7±0.23	0.8±0.71	0.5±0.12	0.3±0.09	0.1±0.03	0.3±0.14	0.5±0.36
C22:4n6	3.0±0.28	2.6±0.31	4.5±1.06	3.6±0.70	6.3±1.40[ab]	5.9±0.72[b]	11.2±1.04[a]	12.0±0.46[a]
C22:5n6	0.3±0.03	0.4±0.06	0.6±0.23	0.4±0.08	0.5±0.06	0.3±0.02	0.4±0.08	0.5±0.06
∑PUFAn6	**34.5±0.78**	**30.9±2.56**	**38.0±1.73**	**36.4±0.72**	**34.8±3.96**	**33.6±1.26**	**33.6±1.99**	**37.0±0.50**
∑C18n6	**5.2±0.20**	**3.8±0.54**	**4.1±0.50**	**4.9±0.51**	**3.9±0.33[ab]**	**4.2±0.19[a]**	**1.9±0.23[b]**	**2.5±0.18[b]**
∑C20-22n6	**29.3±0.96**	**27.1±2.51**	**33.8±1.62**	**31.5±1.23**	**30.9±4.25**	**29.4±1.33**	**31.7±2.00**	**34.5±0.52**

C18/20-22n6	**5.7±0.44**	**8.5±2.29**	**8.4±1.22**	**6.6±0.94**	**8.3±1.40**	**7.0±0.49**	**17.4±2.45**	**14.1±0.97**
C18:3n3	0.2±0.03	0.2±0.03	0.1±0.03	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.02	0.1±0.01
C18:4n3	0.4±0.05[ab]	0.3±0.05[a]	0.1±0.00[b]	0.2±0.01[ab]	0.1±0.03[b]	0.4±0.07[a]	0.1±0.02[ab]	0.1±0.03[b]
C20:3n3	0.1±0.0	0.2±0.01	NE	0.2±0.00	NE	0.1±0.00	NE	0.2±0.02
C20:4n3	0.2±0.03	0.2±0.01	0.2±0.03	0.6±0.46	0.2±0.08	0.1±0.02	0.1±0.01	0.2±0.01
C20:5n3	2.1±0.22[ab]	1.0±0.15[a]	1.9±0.21[ab]	2.7±1.34[b]	1.2±0.07	1.1±0.21	1.1±0.27	1.5±0.16
C22:4n3	0.8±0.35	NE	NE	0.5±0.11	NE	NE	NE	NE
C22:5n3	4.3±0.25	4.4±0.72	4.8±0.71	5.0±0.80	3.6±0.55[b]	3.4±0.20[b]	4.8±0.58[ab]	6.2±0.10[a]
C22:6n3	4.4±0.54[ab]	2.8±0.41[a]	3.5±0.51[ab]	5.7±0.90[b]	3.0±.69[b]	2.5±0.42[b]	3.8±0.94[ab]	4.3±0.50[a]
∑PUFAn3	**11.9±0.92[ab]**	**9.1±1.08[a]**	**10.7±1.24[ab]**	**14.9±1.61[b]**	**8.0±1.37[b]**	**7.8±0.74[b]**	**10.1±0.45[ab]**	**12.4±0.59[a]**
∑C18n3	**0.4±0.11[ab]**	**0.5±0.08[a]**	**0.2±0.06[b]**	**0.3±0.02[ab]**	**0.1±0.03[b]**	**0.5±0.07[a]**	**0.2±0.03[ab]**	**0.1±0.03[b]**
∑C20-22n3	**11.4±0.84[ab]**	**8.5±1.04[a]**	**10.5±1.19[ab]**	**14.6±1.60[b]**	**7.9±1.38[b]**	**7.3±0.78[b]**	**9.9±0.47[ab]**	**12.3±0.60[a]**
C18/20-22n3	**33.8±7.78**	**16.8±2.19**	**52.7±12.38**	**40.7±4.42**	**63.9±17.20**	**15.3±3.27**	**41.7±6.40**	**84.1±12.53**
n3/n6	**0.3±0.03**	**0.3±0.03**	**0.2±0.05**	**0.4±0.04**	**0.2±0.03**	**0.2±0.02**	**0.3±0.03**	**0.3±0.01**
∑PUFAt	**46.4±1.11**	**40.0±3.43**	**49.0±0.93**	**51.3±1.80**	**42.9±5.18[bc]**	**41.4±1.57[a]**	**44.0±1.68[ab]**	**49.4±0.88[c]**
∑Outros	**0.7±0.15**	**1.5±0.11**	**1.3±0.50**	**0.7±0.22**	**1.9±0.35**	**1.3±0.41**	**2.4±0.22**	**1.1±0.26**

[ab] Letras diferentes significam diferenças estatísticas *(P<0.05)* ao longo do ciclo anual para machos e fêmeas. Valores abaixo de 0.1 não foram considerados. ∑SFA, ∑MUFA, ∑PUFA, ∑PUFAn6, ∑C18n6, ∑C20-22n6, ∑PUFAn3, ∑C18n3, ∑C20-22n3 e ∑PUFAt, são as somatórias dos ácidos graxos saturados, monoinsaturados, polinsaturados n6, cadeias curtas de polinsaturados n6, cadeias longas de polinsaturados n6, polinsaturados n3, cadeias curtas de polinsaturados n3, cadeias longas de polinsaturados n3 e polinsaturados totais. NE – não encontrado.

Tabela 8: Perfil de ácidos graxos (%) da fração polar dérmica de fêmeas e machos de *Siphonops annulatus* ao longo do ciclo anual (Média ± EPM).

AG (%)	Fêmeas				Machos			
	Verão	**Outono**	**Inverno**	**Primavera**	**Verão**	**Outono**	**Inverno**	**Primavera**
C14:0	0.9±0.13	1.0±0.13	0.9±0.05	0.9±0.11	1.0±0.05	0.8±0.13	0.9±0.17	0.9±0.05
C15:0	0.3±0.15	0.5±0.07	1.0±0.41	0.3±0.10	0.2±0.00	0.4±0.09	0.4±0.05	0.3±0.01
C16:0	7.0±0.61[ab]	10.8±0.70[b]	10.5±1.62[b]	6.7±0.82[a]	6.9±0.62[ab]	8.8±0.93[ab]	9.8±1.99[a]	6.4±0.19[b]
C17:0	0.6±0.13	0.5±0.05	0.7±0.20	1.2±0.69	0.4±0.08	0.4±0.03	0.5±0.07	0.4±0.06
C18:0	17.3±0.26[ab]	17.6±0.58[b]	17.2±0.55[b]	14.6±1.25[a]	17.5±0.14[ab]	17.7±0.57[ab]	18.1±0.16[a]	16.3±0.37[b]
C20:0	0.5±0.09	0.3±0.02	0.3±0.05	0.9±0.23	0.5±0.03	0.4±0.02	0.6±0.01	0.3±0.02
C21:0	0.4±0.07	NE	0.3±0.06	0.6±0.28	0.3±0.04	0.3±0.06	0.3±0.02	0.3±0.03
C22:0	0.4±0.07	0.3±0.01	0.4±0.02	0.4±0.05	0.4±0.07	0.4±0.04	0.4±0.05	0.5±0.09
C23:0	NE	NE	0.8±0.00	0.1±0.00	0.2±0.05	NE	NE	0.2±0.02
C24:0	0.6±0.14	0.5±0.04	0.3±0.09	0.9±0.21	0.8±0.16	0.6±0.04	0.4±0.00	0.9±0.09
∑SFA	**28.0±0.83[ab]**	**31.6±0.80[b]**	**32.2±1.93[b]**	**26.3±0.93[a]**	**28.2±0.49[ab]**	**29.9±1.69[ab]**	**31.52±0.44[a]**	**26.1±0.43[b]**
C14:1t	0.5±0.10	0.1±0.01	0.3±0.6	0.6±0.13	0.6±0.05	0.1±0.01	0.15±0.00	0.4±0.02
C15:1c	1.7±0.80	0.7±0.30	0.3±0.02	NE	1.3±0.00	0.4±0.07	1.7±0.87	NE
C16:1	1.1±0.09[b]	2.3±0.17[ab]	5.4±2.69[a]	1.5±0.21[b]	0.9±0.06	2.0±0.21	2.3±0.43	1.2±0.07
C17:1c	0.8±0.11	0.3±0.14	0.5±0.06	0.1±0.00	0.4±0.00	0.2±011	0.4±0.29	NE
C18:1n9c	14.5±0.63	15.7±0.99	16.7±0.94	14.3±1.27	14.1±0.65	13.9±0.78	14.1±1.13	14.7±0.68
C18:1n11	2.6±0.14	2.6±0.10	2.9±0.25	2.6±0.65	2.6±0.13	2.7±0.33	2.8±0.17	2.8±0.15
C20:1n9	0.7±0.04	0.4±0.04	0.5±0.02	0.2±0.00	0.8±0.06	0.6±0.03	0.6±0.15	1.0±0.13
C22:1n9	0.2±0.04	0.1±0.01	0.4±0.08	0.7±0.00	0.3±0.00	0.2±0.02	0.2±0.12	NE
C24:1	1.3±0.34	0.8±0.10	1.1±0.08	1.8±0.37	1.6±0.19	1.3±0.12	0.7±0.05	2.4±0.17
∑MUFA	**22.0±0.91[b]**	**22.8±0.93[ab]**	**28.0±1.94[a]**	**21.1±1.95[b]**	**21.2±0.98**	**21.3±1.27**	**23.1±0.41**	**22.6±0.86**
C16:2n4	0.2±0.00	0.3±0.00	NE	1.6±0.00	NE	NE	0.5±0.08	NE
C18:2n6c	6.6±0.50[b]	5.9±0.64[ab]	4.3±0.16[a]	4.8±1.20[ab]	7.1±0.23[b]	5.3±0.77[ab]	4.3±0.47[a]	7.0±0.35[ab]
C18:2n6t	0.3±0.00	NE	NE	3.2±2.92	NE	NE	NE	NE
C18:3n6	0.5±0.19	NE	0.3±0.04	0.5±0.25	0.3±0.02	0.3±0.18	0.3±0.01	0.3±0.02
C20:2n6	0.9±0.03	0.6±0.08	0.5±0.12	1.5±0.71	0.9±0.04	0.7±0.08	0.8±0.19	1.1±0.11
C20:3n6	6.1±0.29	5.5±0.18	4.1±0.27	4.7±1.83	5.8±0.19	5.4±0.37	4.8±0.28	5.7±0.23
C20:4n6	23.4±1.13	21.6±1.03	19.5±0.68	15.6±6.79	24.5±0.78	24.9±0.95	24.2±1.07	22.1±0.58
C22:2n6	0.5±0.29	0.9±0.40	1.1±0.30	5.7±5.16	0.2±0.04	0.26±0.06	1.3±0.00	0.3±0.03
C22:4n6	2.3±0.11	1.9±0.22	2.1±0.31	2.1±0.56	2.2±0.08	2.6±0.09	2.3±0.32	2.9±0.27
C22:5n6	0.4±0.03	0.4±0.04	0.3±0.07	1.0±0.57	0.5±0.04	0.4±0.03	0.3±0.00	0.5±0.03
∑PUFAn6	**40.8±0.90[b]**	**36.8±1.13[ab]**	**32.3±1.39[a]**	**36.3±3.26[ab]**	**41.5±0.65**	**39.9±1.29**	**37.5±3.15**	**39.8±1.00**
∑C18n6	**7.2±0.46[b]**	**5.9±0.64[ab]**	**4.6±0.14[a]**	**7.4±1.09[ab]**	**7.4±0.24[b]**	**5.5±0.82[ab]**	**4.6±0.46[a]**	**7.30±0.34[ab]**
∑C20-22n6	**33.6±1.17**	**30.9±1.37**	**27.7±1.34**	**28.8±4.35**	**34.1±0.84**	**34.3±1.25**	**32.9±2.69**	**32.5±0.90**
C18/20-22n6	**4.8±0.42**	**5.9±1.08**	**6.0±0.28**	**4.1±1.08**	**4.6±0.24**	**6.8±1.55**	**7.1±0.14**	**4.5±0.23**

C18:3n3	0.2±0.03	0.2±0.02	0.1±0.03	0.2±0.02	0.1±0.02	0.1±0.01	0.1±0.02	0.2±0.01
C18:4n3	0.2±0.09[a]	1.1±0.18[b]	0.4±0.16[ab]	0.4±0.22[ab]	0.2±0.05[b]	0.6±0.17[a]	0.4±0.03[ab]	0.2±0.03[b]
C20:3n3	0.2±0.03	0.2±0.02	NE	0.5±0.00	0.1±0.00	0.1±0.06	NE	0.2±0.00
C20:4n3	0.2±0.03	0.2±0.02	0.2±0.01	0.3±0.00	0.2±0.06	0.2±0.05	0.2±0.02	0.3±0.04
C20:5n3	1.9±0.26[ab]	1.1±0.19[b]	1.1±0.24[ab]	5.6±3.06[a]	1.5±0.28[ab]	1.1±0.27[b]	1.0±0.15[b]	2.1±0.17[a]
C22:4n3	0.6±0.17	NE	NE	0.4±0.00	NE	NE	NE	NE
C22:5n3	2.5±0.15	2.3±0.25	2.5±0.07	4.6±1.39	2.5±0.08	2.6±0.46	2.8±0.61	3.7±0.14
C22:6n3	2.6±0.30	1.7±0.22	1.6±0.10	3.3±1.31	3.3±0.57[ab]	2.2±0.38[b]	1.8±0.31[b]	3.4±0.42[a]
∑PUFAn3	**8.2±0.47[ab]**	**6.8±0.44[b]**	**5.9±0.40[b]**	**14.7±3.32[a]**	**7.9±0.91[ab]**	**6.9±0.96[b]**	**6.3±0.76[b]**	**9.9±0.53[a]**
∑C18n3	**0.3±0.03[a]**	**1.2±0.17[b]**	**0.6±0.13[ab]**	**0.5±0.16[ab]**	**0.3±0.06[b]**	**0.7±0.16[a]**	**0.5±0.02[ab]**	**0.3±0.05[b]**
∑C20-22n3	**7.9±0.47[ab]**	**5.5±0.53[b]**	**5.4±0.30[ab]**	**14.1±3.15[a]**	**7.5±0.85[ab]**	**6.2±0.99[b]**	**5.7±0.74[b]**	**9.6±0.53[a]**
C18/20-22n3	**26.9±4.38**	**5.2±1.02**	**10.4±1.96**	**27.1±3.47**	**22.9±2.53**	**9.9±3.28**	**10.9±1.04**	**33.6±5.95**
n3/n6	**0.2±0.01**	**0.2±0.01**	**0.2±0.02**	**0.4±0.14**	**0.2±0.02**	**0.1±0.02**	**0.2±0.01**	**0.2±0.02**
∑PUFAt	**49.1±1.22[ab]**	**43.7±1.26[bc]**	**38.3±1.00[c]**	**51.5±1.13[a]**	**49.4±1.28**	**46.9±2.03**	**44.3±0.83**	**49.7±0.99**
∑Outros	**0.8±0.19**	**1.8±0.21**	**1.4±0.66**	**1.0±0.38**	**1.1±0.19**	**2.0±0.08**	**1.1±0.98**	**1.4±0.11**

[ab] Letras diferentes significam diferenças estatísticas *(P<0.05)* ao longo do ciclo anual para machos e fêmeas. Valores abaixo de 0.1 não foram considerados. ∑SFA, ∑MUFA, ∑PUFA, ∑PUFAn6, ∑C18n6, ∑C20-22n6, ∑PUFAn3, ∑C18n3, ∑C20-22n3 e ∑PUFAt, são as somatórias dos ácidos graxos saturados, monoinsaturados, polinsaturados n6, cadeias curtas de polinsaturados n6, cadeias longas de polinsaturados n6, polinsaturados n3, cadeias curtas de polinsaturados n3, cadeias longas de polinsaturados n3 e polinsaturados totais. NE – não encontrado.

Tabela 9: Perfil de ácidos graxos (%) da fração polar do encéfalo de fêmeas e machos de *Siphonops annulatus* ao longo do ciclo anual (Média±EPM).

AG (%)	Fêmeas			Machos		
	Verão	**Outono**	**Primavera**	**Verão**	**Outono**	**Primavera**
C14:0	0.4±0.03	0.5±0.06	0.6±0.31	0.8±0.40	0.6±0.04	0.4±0.11
C15:0	0.1±0.01	0.2±0.02	1.1±0.84	0.3±0.16	0.2±0.01	1.5±0.13
C16:0	9.8±1.24	9.3±0.95	7.1±1.50	10.2±5.11	11.6±1.21	11.4±2.25
C17:0	0.2±0.03	0.2±0.01	0.4±0.09	0.4±0.21	0.2±0.03	0.3±0.12
C18:0	18.6±0.88	19.5±1.12	18.0±1.28	18.9±9.43	18.6±0.83	16.9±0.75
C20:0	0.5±0.08	0.2±0.01	0.4±0.03	0.4±0.21	0.7±0.16	0.4±0.09
C21:0	0.2±0.07	NE	0.2±0.04	0.3±0.24	NE	0.1±0.00
C22:0	0.1±0.01	0.1±0.02	0.2±0.02	0.2±0.15	0.1±0.01	0.2±0.01
C23:0	5.1±0.21	NE	NE	NE	NE	NE
C24:0	0.2±0.02	NE	0.3±0.16	0.2±0.15	NE	0.1±0.01
∑SFA	**32.7±3.54**	**30.1±0.71**	**28.5±2.57**	**31.4±15.71**	**32.1±0.99**	**30.8±174**
C14:1t	0.2±0.03	NE	0.2±0.14	0.3±0.18	0.1±0.00	NE
C15:1c	2.8±0.83	0.1±0.01	NE	1.1±0.80	0.1±0.01	NE
C16:1	1.8±0.18	2.2±0.38	1.5±0.43	1.9±0.99	2.6±0.19	1.6±0.26
C17:1c	1.4±0.58	NE	NE	0.7±0.43	0.2±0.01	1.2±0.07
C18:1n9c	9.8±0.38	10.9±1.08	8.6±0.32	9.9±4.97	11.9±0.61	10.1±1.28
C18:1n11	3.8±0.27	4.0±0.39	3.1±0.48	3.5±1.77	4.4±0.26	4.0±0.30
C20:1n9	1.5±0.04	0.6±0.16	0.6±0.09	0.6±0.31	0.4±0.09	0.2±0.00
C22:1n9	0.3±0.04	0.2±0.04	0.3±0.04	0.4±0.29	0.2±0.01	0.1±0.00
C24:1	2.7±0.47	1.4±0.53	3.1±1.63	1.4±0.71	2.0±0.31	1.1±0.42
∑MUFA	**20.6±1.30**	**19.6±2.21**	**17.5±0.38**	**19.2±9.59**	**21.8±1.27**	**17.9±1.77**
C18:2n6c	0.8±0.13	0.7±0.11	0.9±0.11	1.2±0.62[a]	0.8±0.39[b]	0.7±0.06[ab]
C18:2n6t	0.2±0.04	0.1±0.00	0.1±0.03	NE	NE	NE
C18:3n6	0.2±0.04	NE	0.2±0.07	0.3±0.14	NE	0.1±0.01
C20:2n6	1.3±0.14	0.7±0.29	0.6±0.31	0.9±0.48	0.7±0.07	0.7±0.25
C20:3n6	0.8±0.39	1.0±0.08	1.4±0.39	1.2±0.63	1.2±0.13	0.9±0.15
C20:4n6	20.1±0.69	22.3±1.15	21.6±0.91	19.7±9.87	19.4±0.92	23.4±1.47
C22:2n6	0.4±0.09	0.1±0.04	0.3±0.11	0.5±0.32	0.1±0.02	0.7±0.38
C22:4n6	3.6±1.40	5.3±0.51	7.4±0.16	6.1±3.05	4.4±0.12	5.6±0.90
C22:5n6	0.9±0.15	1.0±0.26	0.9±0.31	1.4±0.73	0.8±0.08	1.34±0.12
∑PUFAn6	**27.4±2.19**	**31.3±1.47**	**33.7±1.05**	**31.4±15.72**	**27.5±1.07**	**33.4±2.02**
∑C18n6	**1.0±0.07**	**0.7±0.10**	**1.3±0.21**	**1.5±0.76[a]**	**0.79±0.12[b]**	**0.8±0.05[ab]**

∑C20-22n6	**26.5±2.25**	**30.5±1.42**	**32.4±1.26**	**29.9±14.95**	**26.7±1.04**	**32.5±1.97**
C18/20-22n6	**25.7±3.83**	**42.0±5.50**	**26.2±5.31**	**23.1±11.55**	**36.0±4.60**	**38.5±0.60**
C18:3n3	0.3±0.19	NE	0.1±0.04	0.1±0.10	0.2±0.06	NE
C18:4n3	0.2±0.03	0.3±0.06	0.2±0.04	0.2±0.15[a]	0.5±0.17[b]	NE
C20:3n3	NE	NE	NE	0.1±0.00	0.2±0.00	NE
C20:5n3	0.5±0.24	0.5±0.13	0.9±0.19	0.9±0.48	0.5±0.10	1.3±0.44
C22:4n3	0.6±0.16	NE	NE	NE	NE	NE
C22:5n3	0.7±0.32	0.8±0.19	1.2±0.17	0.9±0.45	0.7±0.02	0.9±0.10
C22:6n3	14.6±1.41	12.8±0.84	16.4±0.93	13.9±6.97	11.9±0.52	14.7±1.57
∑PUFAn3	**16.6±1.69**	**14.6±1.05**	**18.9±1.37**	**16.0±8.01**	**14.0±0.52**	**17.0±1.25**
∑C18n3	**0.3±0.09**	**0.3±0.06**	**0.3±0.08**	**0.2±0.09[a]**	**0.7±0.23[b]**	**NE**
∑C20-22n3	**16.3±1.60**	**14.3±1.09**	**18.6±1.28**	**15.8±7.92**	**13.3±0.49**	**17.0±1.25**
C18/20-22n3	**52.2±6.39**	**54.1±13.10**	**53.2±8.57**	**98.9±49.44**	**22.4±5.01**	**-**
n3/n6	**0.6±0.05**	**0.4±0.01**	**0.5±0.02**	**0.5±0.25**	**0.5±0.01**	**0.5±0.02**
∑PUFAt	**38.4±7.04**	**45.8±2.52**	**52.6±2.42**	**47.5±23.75**	**41.5±1.58**	**50.4±3.20**
∑Outros	**2.0±1.20**	**4.3±0.62**	**1.30±0.23**	**1.9±0.95**	**4.6±0.37**	**2.5±0.00**

[ab] Letras diferentes significam diferenças estatísticas *(P<0.05)* ao longo do ciclo anual para machos e fêmeas. Valores abaixo de 0.1 não foram considerados. ∑SFA, ∑MUFA, ∑PUFA, ∑PUFAn6, ∑C18n6, ∑C20-22n6, ∑PUFAn3, ∑C18n3, ∑C20-22n3 e ∑PUFAt, são as somatórias dos ácidos graxos saturados, monoinsaturados, polinsaturados n6, cadeias curtas de polinsaturados n6, cadeias longas de polinsaturados n6, polinsaturados n3, cadeias curtas de polinsaturados n3, cadeias longas de polinsaturados n3 e polinsaturados totais. NE – não encontrado.

Tabela 10: Perfil de ácidos graxos totais (%) plasmáticos de fêmeas e machos de *Siphonops annulatus* ao longo do ciclo anual (Média ± EPM).

AG (%)	Fêmeas				Machos			
	Verão	**Outono**	**Inverno**	**Primavera**	**Verão**	**Outono**	**Inverno**	**Primavera**
C14:0	0.4±0.12	0.4±0.06	0.4±0.15	0.3±0.05	0.4±0.08	0.4±0.07	0.6±0.31	0.3±0.07
C15:0	NE	0.2±0.03	0.1±0.03	NE	NE	0.2±0.02	0.2±0.07	NE
C16:0	12.1±0.83	13.8±0.54	11.2±1.88	9.5±0.59	12.0±1.00	15.7±2.19	15.3±1.34	11.4±1.64
C17:0	1.1±0.21	0.5±0.09	0.4±0.06	0.9±0.34	0.7±0.22	0.4±0.05	0.5±0.05	0.8±0.12
C18:0	12.5±0.25	10.1±0.45	8.3±0.55	10.6±1.07	13.2±0.32	11.4±0.28	8.1±0.90	10.9±0.19
C20:0	0.7±0.05	0.6±0.03	0.7±0.11	1.2±0.22	0.8±0.07	0.7±0.07	0.9±0.25	1.1±0.08
C21:0	0.5±0.07	0.2±0.00	0.3±0.07	0.6±0.06	0.5±0.03	NE	0.3±0.06	0.6±0.07
C22:0	2.1±0.16	1.4±0.21	1.8±0.35	3.8±0.66	2.0±0.39	2.0±0.18	1.3±0.47	3.5±0.41
C23:0	1.3±0.18	1.1±0.16	1.1±0.02	1.5±0.09	1.3±0.31	0.8±0.09	1.1±0.28	2.3±0.27
C24:0	2.5±0.38	2.9±0.50	2.2±0.40	3.7±0.48	2.6±0.73	1.8±0.19	1.7±0.47	4.3±0.58
∑SFA	**33.4±0.98**	**31.0±1.21**	**26.6±2.92**	**32.0±2.37**	**33.5±0.85**	**33.5±2.53**	**30.2±2.34**	**35.3±1.84**
C14:1t	1.1±0.13	NE	0.1±0.00	0.2±0.04	0.7±0.20	NE	0.3±0.12	0.2±0.05
C15:1c	0.6±0.00	NE	NE	NE	NE	NE	0.2±0.01	NE
C16:1	1.3±0.20	1.3±0.18	1.3±0.58	0.9±0.13	1.1±0.10	1.4±0.09	2.1±1.15	0.8±0.07
C17:1c	0.3±0.00	0.1±0.04	0.3±0.08	NE	0.2±0.06	0.1±0.02	0.5±0.21	NE
C18:1n9c	18.3±1.65	17.0±2.14	15.8±3.04	11.9±2.10	16.9±2.03	15.2±0.25	22.2±7.28	11.6±0.87
C18:1n11	3.7±0.25	4.5±0.36	3.8±0.62	3.9±0.74	3.5±0.17	4.3±0.15	3.7±0.22	3.4±0.25
C20:1n9	1.5±0.18	1.6±0.19	2.1±0.58	2.5±0.59	1.8±0.11	1.4±0.03	1.5±0.69	2.0±0.27
C20:1n11	NE	NE	NE	NE	NE	NE	1.6±0.00	NE
C22:1n9	0.7±0.20	0. 3±0.04	0.9±0.24	0.6±0.13	0.4±0.10	0.4±0.09	0.6±0.29	0.6±0.09
C24:1	12.4±1.43	10.1±0.82	18.2±4.53	24.7±3.09	13.0±2.96[a]	10.7±0.78[a]	14.4±2.89[ab]	23.6±2.30[b]
∑MUFA	**38.4±1.30**	**35.0±2.59**	**42.6±5.24**	**44.9±5.76**	**37.4±0.87[a]**	**33.5±1.16[a]**	**45.8±6.05[ab]**	**42.3±1.29[b]**
C16:2n4	0.3±0.11	NE	0.9±0.04	0.3±0.08	0.3±0.18	NE	0.4±0.06	NE
C18:2n6c	7.6±0.61[a]	4.8±0.79[b]	2.9±0.06[b]	3.3±0.54[b]	8.0±0.76[a]	7.5±0.59[ab]	4.2±0.63[b]	4.5±0.53[b]
C18:2n6t	1.0±0.69	NE	NE	1.2±0.67	0.5±0.28	NE	NE	1.3±0.41
C18:3n6	0.5±0.05	0.4±0.09	1.4±1.05	0.4±0.09	0.4±0.08	0.3±0.00	0.3±0.07	0.4±0.06
C20:2n6	1.2±0.06	1.2±0.13	1.3±0.33	1.3±0.08	1.4±0.15	1.4±0.27	0.8±0.09	1.0±0.08
C20:3n6	3.0±0.32	2.5±0.37	2.2±0.27	1.6±0.10	2.9±0.37[ab]	3.8±0.17[a]	2.3±0.50[ab]	1.9±0.13[b]
C20:4n6	6.9±0.80[a]	11.0±1.90[b]	5.6±1.10[ab]	5.4±1.39[ab]	6.6±0.74[ab]	8.8±0.74[a]	5.7±1.15[ab]	4.7±0.22[b]
C22:2n6	0.7±0.28[a]	8.8±1.13[b]	5.5±0.41[ab]	1.6±0.93[ab]	1.8±1.35 [ab]	4.5±0.00[a]	2.6±1.08 [ab]	2.0±0.63[b]
C22:4n6	1.6±0.20[a]	2.9±0.59[b]	2.2±0.39[ab]	2.6±0.58[ab]	1.8±0.21	2.6±0.34	1.7±0.39	1.5±0.16
C22:5n6	0.2±0.08	0.3±0.06	0.6±0.33	NE	0.2±0.02	0.2±0.02	0.2±0.03	NE
∑PUFAn6	**22.4±1.23**	**27.6±1.94**	**21.8±5.17**	**17.1±2.90**	**23.4±1.04[a]**	**26.2±2.24[a]**	**17.9±3.58[ab]**	**16.9±1.16[b]**
∑C18n6	**8.6±0.48[a]**	**5.1±0.83[b]**	**4.3±1.09[b]**	**4.6±0.40[b]**	**9.0±0.75[a]**	**7.7±0.52[ab]**	**4.5±0.58[b]**	**6.1±0.58[b]**
∑C20-22n6	**13.8±1.36[a]**	**22.5±2.02[b]**	**17.5±4.11[ab]**	**12.5±2.52[ab]**	**14.4±0.59[ab]**	**18.5±2.23[a]**	**13.4±3.07[ab]**	**10.8±0.82[b]**

C18/20-22n6	**1.6±0.24**	**5.6±1.31**	**4.1±0.33**	**2.7±0.36**	**1.6±0.14**	**2.4±0.36**	**2.8±0.49**	**1.8±0.16**
C18:3n3	0.2±0.04	0.2±0.04	0.2±0.04	NE	0.2±0.05	0.3±0.03	0.2±0.07	0.2±0.02
C18:4n3	0.3±0.03[ab]	1.0±0.25[a]	0.2±0.06[ab]	0.2±0.11[b]	0.2±0.04	0.8±0.26	0.3±0.06	0.7±0.00
C20:3n3	NE	0.4±0.05	NE	NE	0.2±0.01	0.2±0.00	0.2±0.00	0.2±0.04
C20:4n3	0.2±0.03	0.3±0.09	0.2±0.08	NE	0.3±0.04	0.2±0.02	0.4±0.12	0.2±0.01
C20:5n3	1.8±0.37	1.0±0.13	4.2±2.36	2.6±0.72	2.3±0.96	1.4±0.45	1.5±0.26	2.8±0.67
C22:4n3	1.1±0.00	NE	NE	0.5±0.00	NE	NE	NE	NE
C22:5n3	1.4±0.51	1.6±0.28	1.7±0.50	1.2±0.38	0.9±0.12	1.5±0.24	1.4±0.24	1.1±0.13
C22:6n3	1.5±0.44	1.8±0.33	1.7±0.51	1.4±0.38	1.6±0.26	2.4±0.43	1.4±0.54	1.0±0.15
∑PUFAn3	**5.3±0.79**	**6.1±0.54**	**8.2±2.71**	**5.6±0.99**	**5.4±0.67**	**6.7±1.33**	**5.3±1.03**	**5.5±0.72**
∑C18n3	**0.5±0.03[ab]**	**1.3±0.24[a]**	**0.4±0.03[ab]**	**0.2±0.09[b]**	**0.4±0.02**	**1.1±0.26**	**0.5±0.13**	**0.9±0.12**
∑C20-22n3	**4.8±0.79**	**4.8±0.59**	**7.7±2.71**	**5.4±0.95**	**4.9±0.68**	**5.6±1.11**	**4.7±1.10**	**5.2±0.72**
C18/20-22n3	**10.1±2.05**	**4.6±0.93**	**16.8±5.62**	**20.7±2.10**	**10.7±1.44**	**5.1±0.92**	**10.2±2.79**	**20.1±3.57**
n3/n6	**0.2±0.03**	**0.2±0.02**	**0.3±0.06**	**0.3±0.03**	**0.2±0.03**	**0.2±0.03**	**0.3±0.05**	**0.3±0.03**
∑PUFAt	**27.9±2.00**	**33.8±2.32**	**30.6±7.91**	**23.0±3.80**	**28.9±1.12[ab]**	**32.9±3.50[a]**	**23.5±4.41[ab]**	**22.3±1.79[b]**
∑Outros	**0.2±0.00**	**0.3±0.05**	**0.3±0.00**	**NE**	**0.2±0.03**	**0.1±0.01**	**0.4±0.12**	**0.1±0.00**

[ab] Letras diferentes significam diferenças estatísticas *(P<0.05)* ao longo do ciclo anual para machos e fêmeas. Valores abaixo de 0.1 não foram considerados. ∑SFA, ∑MUFA, ∑PUFA, ∑PUFAn6, ∑C18n6, ∑C20-22n6, ∑PUFAn3, ∑C18n3, ∑C20-22n3 e ∑PUFAt, são as somatórias dos ácidos graxos saturados, monoinsaturados, polinsaturados n6, cadeias curtas de polinsaturados n6, cadeias longas de polinsaturados n6, polinsaturados n3, cadeias curtas de polinsaturados n3, cadeias longas de polinsaturados n3 e polinsaturados totais. NE – não encontrado.

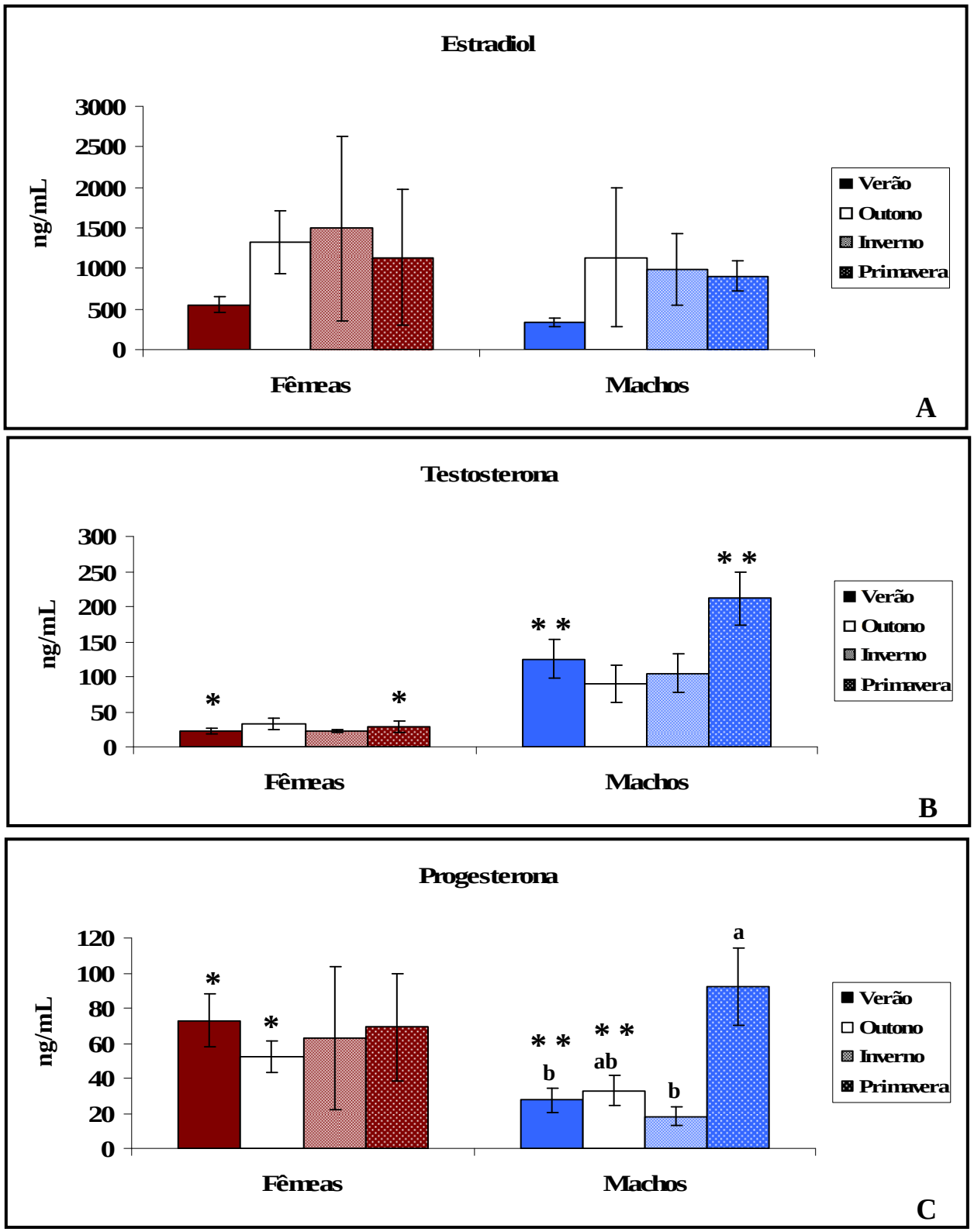


Figura 22: Esteróides gonadais em fêmeas e machos de *S. annulatus* ao longo do ciclo anual. **A)** Estradiol. **B)** Testosterona. **C)** Progesterona. [ab] Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas para fêmeas e machos ao longo do ciclo anual. * Símbolos diferentes significam diferenças estatisticamente significativas entre os sexos.

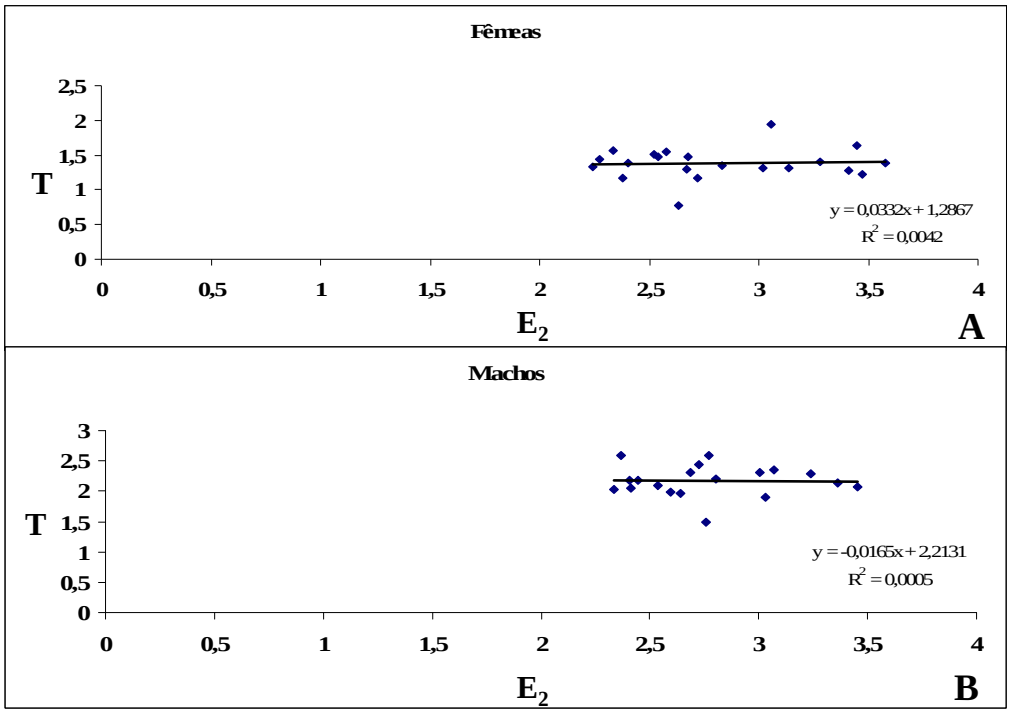


Figura 23: Correlação de Pearson. **A)** Correlação entre as concentrações de testosterona e estradiol para fêmeas de *S. annulatus*. **B)** Correlação entre as concentrações de testosterona e estradiol para machos de *S. annulatus*.

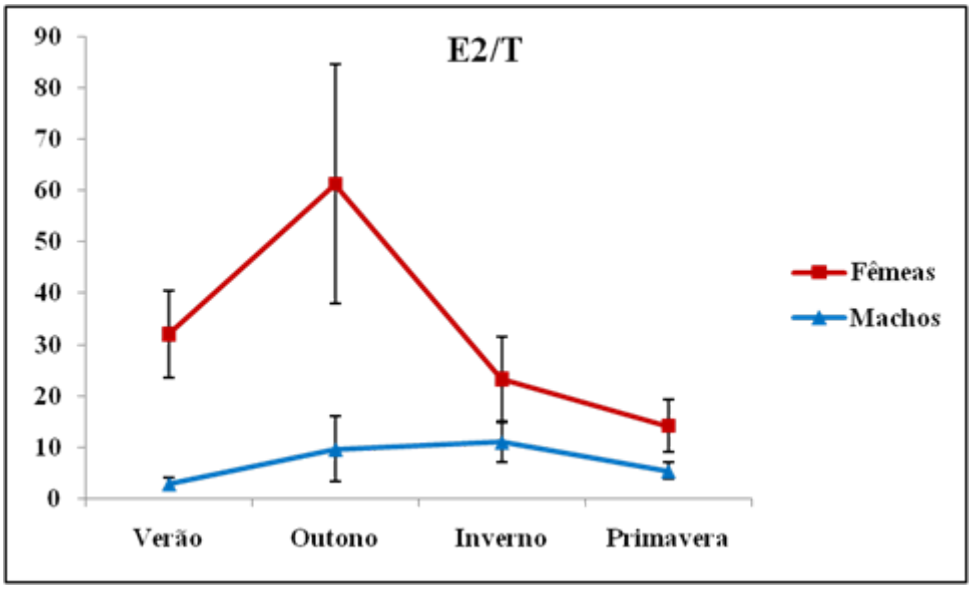


Figura 24: Relação E2/T encontrada em machos e fêmeas ao longo do ciclo anual.

5. DISCUSSÃO

Algumas espécies de cecílias dependem da chuva para garantir as propriedades hídricas apropriadas para a reprodução. Neste caso, quando as condições são ideais, esses anfíbios detectam os ciclos ambientais e apresentam as modificações endócrinas e fisiológicas necessárias (EXBRAYAT & DELSOL, 1985). Contudo, pouco ainda é conhecido sobre as bases fisiológicas que modulam a reprodução sazonal de Gymnophiona (JARED *et al*., 1999; EXBRAYAT, 2006).

Neste estudo, foram analisados diferentes parâmetros morfológicos e fisiológicos que estão intimamente associados à reprodução. Os resultados demonstram que as fêmeas e os machos de *S. annulatus* apresentaram alterações no metabolismo de lipídios, proteínas e ácidos graxos, bem como variações na concentração dos esteróides gonadais ao longo do ciclo anual. De forma geral, essas variações atuam promovendo a maturação gonadal e este é o primeiro estudo que abrange as diferentes variáveis fisiológicas (metabólicas e endócrinas) que regulam a oogênese e a espermatogênese de *S. annulatus*, mantidas em cativeiro, ao longo do ciclo anual.

5.1 Sazonalidade

As observações obtidas com as análises histológicas demonstraram que os animais coletados durante o inverno apresentaram as gônadas mais desenvolvidas, ou seja, as fêmeas com oócitos vitelogênicos e machos com espermatozóides, do que os animais em outras estações, incluindo primavera e verão. Observações em campo de *Siphonops annulatus* no sul da Bahia descrevem o início da atividade reprodutiva em julho, com o nascimento dos filhotes ocorrendo no fim da primavera e início do verão (Jared & Antoniazzi, 2005). Com base nessas informações, podemos sugerir que *S. annulatus* criados em cativeiro no presente trabalho já apresentavam as gônadas desenvolvidas, aptas à cópula no período do inverno, corroborando as informações do ambiente natural.

Muitos anuros e salamandras habitam ambientes tropicais e iniciam a reprodução e/ou oviposição durante o período de chuvas (HEYER, 1973; SPIELER & LINSENMAIR, 1997). Contudo, não é claro se as cecílias apresentam uma correlação sazonal similar em seu comportamento reprodutivo. Estudos anteriores sugerem que a reprodução pode ser relacionada às monções em uma cecília ovípara, *Ichthyophis*, encontrada na Índia (SESHACHAR *et al*., 1982), no Sri Lanka (SARASIN & SARASIN, 1887-1890) e na Tailândia (HIMSTEDT, 1996). Um trabalho mais recente

para *Icthyophis* cf. *kohtaoensis* da Tailândia demonstrou que a atividade reprodutiva e a eclosão das larvas são sazonais e altamente correlacionadas às monções (KUPFER *et al*., 2004), suportando as observações dos outros autores.

Entretanto, sapos e rãs em laboratório tendem a apresentar um desenvolvimento oocitário menos sincrônico e a atresia das células germinativas é mais comum do que na natureza (JORGENSEN *et al.*, 1992). Adicionalmente, *Typhlonectes compressicauda,* uma espécie de cecília vivípara, quando reproduzida em cativeiro apresentou uma modificação no ciclo espermatogênico e a vitelogênese foi retardada, assim o ciclo entre os machos e as fêmeas se tornou dessincronizado (EXBRAYAT & LAURENT, 1986).

De forma geral, a variação anual da precipitação parece ser o principal fator na indução da periodicidade reprodutiva em anfíbios, incluindo as cecílias. Contudo, a ausência dessas variações ambientais em cativeiro, devido à manutenção constante dos fatores abióticos, dificulta a captação pelos animais dos estímulos necessários para a reprodução. No presente trabalho, os animais parecem se preparar para a reprodução, mas por um motivo ainda não esclarecido não ocorre a cópula. Desta forma, o desencadeamento normal das fases subsequentes do ciclo reprodutivo foi alterado.

5.2 Parâmetros morfológicos

Os dados obtidos para a massa corpórea e comprimento não apresentaram nenhuma variação anual significativa, mesmo para as fêmeas, nas quais a massa das gônadas parece interferir na massa corpórea. Assim, não foi possível estabelecer nenhuma relação entre esses parâmetros e o estádio do ciclo reprodutivo nos quais os animais se encontravam. Além disso, no presente trabalho esses dados também não foram bons indicadores para diferenciar o sexo em *S. annulatus*.

De modo geral, o dimorfismo sexual descreve diferenças intraespecíficas em tamanho, forma ou características entre machos e fêmeas (FAIRBAIRN, 2007). As diferenças sexuais no tamanho corpóreo estão difundidas nos animais e muitas hipóteses explicam a existência do dimorfismo sexual de tamanho. É bem documentado que o tamanho da prole, e em alguns casos dos ovos e o sucesso reprodutivo, aumentam com o tamanho corpóreo das fêmeas em muitas espécies ovíparas como, a maioria dos peixes (WOOTTON, 1979), anfíbios (WELLS, 2007) e répteis (SHINE, 1994; COX *et al.*, 2007).

Em cecílias, a morfologia uniforme, com ausência de caracteres sexuais secundários óbvios, prejudica as comparações interssexuais. Contudo, Delêtre &

Measey (2004) sugerem que os machos de *Schistometopum thomense* usam a sua cabeça mais larga para atracar as fêmeas durante o acasalamento. Ao contrário disso, um estudo realizado com *Ichthyophis* cf. *kohtaoensis* utilizando diferentes parâmetros morfológicos, demonstrou que as fêmeas foram significativamente mais longas do que os machos e, consequentemente os outros caracteres analisados para o corpo e a cabeça apresentaram tamanho relacionado. Contudo, quando os resultados foram ajustados para o tamanho de cada animal, apenas o disco cloacal se apresentou maior nas fêmeas do que nos machos (KUPFER, 2009). Diferenças sexuais no número de anéis e vértebras foram também reportadas para uma espécie de cecília, *Scolecomorphus uluguruensis* (NUSSBAUM, 1985). Deste modo, particularmente em relação à espécie *S. annulatus*, uma das dificuldades encontradas no estudo de sua reprodução está relacionada à ausência de características externas que possibilitem a diferenciação entre os sexos.

Apesar disso, variações anuais dos valores de IGS e IHS foram encontradas para as fêmeas e os machos de *S. annulatus*. Como já mencionado, as cecílias observadas durante o inverno apresentaram um desenvolvimento gonadal em estádio mais avançado, com presença de oócitos vitelogênicos nos ovários e espermatozóides nos testículos, o que refletiu em uma massa ovariana e testicular maior, corroborando os dados obtidos para o IGS no presente trabalho.

Segundo Sayer *et al*. (1995), alterações nos valores de IHS em peixes durante o ciclo reprodutivo podem ser devido à utilização do fígado como órgão de reserva energética. Adicionalmente, a correlação inversa observada entre IGS e IHS em algumas espécies pode ser devido à mobilização de substratos hepáticos para as gônadas durante o processo de reprodução, principalmente a vitelogênese. Essa correlação inversa entre IGS e IHS não foi encontrada para as cecílias no presente estudo, pois ambos os índices apresentaram-se elevados no inverno. Este aumento parece ser devido à deposição de substratos, mais especificamente lipídios, no fígado e nas gônadas de *S. annulatus* em ambos os sexos. Assim como visto para as cecílias do presente trabalho, uma espécie vivípara, *Typhlonectes compressicauda,* apresentou também aumento da massa do fígado e das gônadas durante o período reprodutivo (EXBRAYAT, 1988). Esses resultados demonstram a importância do tecido hepático como reserva de substratos neste período.

Mesmo não havendo diferença estatística significativa, as fêmeas de *S. annulatus* tendem a apresentar durante o inverno o valor de IGS maior do que os machos. Este dado é esperado, devido à intensa mobilização de substratos para os

ovários sob a forma de vitelogenina, uma vez que nos testículos essa deposição lipídica é incipiente.

5.2.1 Anatomia do sistema reprodutor feminino e oogênese

O sistema reprodutor das fêmeas de *S. annulatus* no presente trabalho foi semelhante ao que foi descrito para outras espécies de cecílias, como *Caecilia gracilis, Ichthyophis glutinosus* (SPENGEL, 1876 *apud* SMITA *et al.,* 2004)*, Hypogeophis rostratus* (TONUTTI, 1931), *C. ochrocephala, Gegenophus ramaswami, Geotrypetes seraphinii, Rhimatrema bicolor, Scolecomorphus kirkii, Typhlonectes compressicauda, Boulengerula taitanus*, *B. uluguruensis* (WAKE, 1968), *Dermophis mexicanus* (WAKE, 1980), *Ichthyophis beddomei* (MASOOD-PARVEEZ & NADKARNI, 1993) e *Chthonerpeton indistintum* (BEROIS & DE SA, 1988), corroborando também as descrições já apresentadas para *S. annulatus* por Spengel (1876 *apud* SMITA *et al.,* 2004) e Wake (1968). Contudo, nas espécies vivíparas uma porção do oviduto é diferenciada em uma estrutura semelhante ao útero (EXBRAYAT, 2006).

Em algumas espécies, os ovários contêm de 3 a 12 oócitos maduros que apresentam 2mm de diâmetro; outros são caracterizados por terem de 20 a 30 oócitos com 2 a 5mm de diâmetro, e há ainda espécies nas quais os ovários possuem de 50 a 100 pequenos oócitos com menos de 1mm de diâmetro (WAKE, 1968). No presente trabalho, foi possível verificar uma grande quantidade de oócitos presente nos ovários, corroborando os dados descritos por Wake (1968) para *S. annulatus.*

Contudo, parece que alguns oócitos são degenerados ao longo do desenvolvimento oocitário, pois encontramos nas fêmeas menos desenvolvidas uma quantidade muito maior de oócitos com um menor tamanho, comparado as fêmeas vitelogênicas coletadas durante o inverno, que apresentaram os ovários com um número reduzido de oócitos, mas com maior diâmetro. Adicionalmente, estes dados sugerem o aumento progressivo dos oócitos devido à incorporação de vitelo, o que foi corroborado pelas análises histológicas. Além disso, como já relatado, esses oócitos maiores refletiram em um maior valor de IGS encontrado para as fêmeas no inverno.

Uma grande quantidade de corpos gordurosos foi observada aderida aos ovários, característica muito comum à maioria dos anfíbios (WELLS, 2007). De acordo com Exbrayat & Estabel (2006), estes órgãos apresentam um ciclo correlacionado aos períodos de reprodução. Em Gymnophiona, os corpos gordurosos são órgãos segmentados pareados, compostos por 8 a 30 lobos, sendo seu tamanho variado e

relacionado ao tamanho do animal (WAKE, 1968), como observado no presente trabalho.

Com relação à histologia dos ovários, não há nenhum estudo preciso dos estágios da oogênese para Gymnophiona. Os oócitos e folículos foram descritos para algumas espécies como *Chthoneperton indistinctum* (BEROIS & DE SÁ, 1988); *Typhlonectes compressicauda* (EXBRAYAT, 1983; 1986), *Ichthyophis beddomei* (MASOOD-PARVEEZ, 1987; MASOOD-PARVEEZ & NADKARNI, 1993), *Ichthyophis tricolor* e *Gegeneophis ramaswamii* (BEYO *et al*., 2007a, 2007b, 2008a, 2008b). Contudo, cada autor apresenta uma denominação diferente para os estágios do desenvolvimento oocitário. No presente trabalho foi adotada a classificação proposta por Masood-Parveez & Nadkarni (1993) para *Ichthyophis beddomei*, uma espécie ovípara.

Durante o ciclo reprodutivo anual, as oogônias e as células foliculares derivadas do tecido gonadal (estroma) associam-se para formar o folículo, num processo denominado de foliculogênese. Os folículos sofrem uma transformação envolvendo alterações no oócito, nas células foliculares da granulosa e da teca e originam os oócitos pré-vitelogênicos. Posteriormente, esses oócitos entram na fase vitelogênica na qual ocorre o acúmulo de vitelo (BEYO *et al*., 2007a, 2007b). Deste modo, o oócito se associa às células somáticas granulosas e se torna uma estrutura funcional conhecida como folículo ovariano. Todas essas alterações foram encontradas também nas fêmeas de *S. annulatus* no presente trabalho.

Na literatura, os termos, células granulosa e células foliculares, têm sido utilizados sinonimamente. No presente trabalho foi adotado o termo células granulosas e a denominação de camada folicular foi utilizada referindo-se a todo o envoltório do oócito (teca e granulosa).

Após a formação do folículo as células da granulosa permanecem como uma simples camada de células na maioria dos anuros, urodelos (SAIDAPUR, 1989; DE OLIVEIRA & SANTOS, 2004), quelônios e crocodilianos (URIBE & GUILLETTE, 2000; CALDERON *et al*., 2004), ou diferenciada em uma estrutura consistindo de 3 tipos celulares, como em *Torpedo marmorata* (MARINA *et al*., 2004), *Scinax fuscovarius* (DE OLIVEIRA & SANTOS, 2004). Nas cecílias as células foliculares granulosas permanecem como uma estrutura simples homogênea, ou se tornam uma estrutura heterogênea simples ou ainda uma estrutura heterogênea em multicamadas. Trabalhos realizados com microscopia eletrônica para observação da oogênese em *I.*

tricolor e *G. ramaswamii* demonstraram a ocorrência de dois tipos de células granulosas, as claras e as escuras. Contudo, antes da transformação dos folículos pré-vitelogênicos em vitelogênicos, todas as células da granulosa se tornam escuras (BEYO *et al*., 2007a). Como no estudo que realizamos com *S. annulatus* foi utilizada apenas a técnica de microscopia de luz, não podemos afirmar se houve ou não diferenças nos tipos celulares da granulosa.

As células da granulosa formam a interface entre os capilares sanguíneos e o oócito e participam de funções críticas no sequestro da vitelogenina do plasma para o oócito (VILLECCO *et al*., 2002; URIBE, 2003), na formação do envelope vitelínico (DUMONT & BRUMMET, 1978), na biossíntese de esteróides (MAHMOUD *et al*., 2006), na produção do hormônio indutor da maturação final (PATINO *et al*., 2001) e na síntese e secreção de componentes do envelope vitelínico (CABADA *et al*., 1996). Contudo, a possível função destas células foliculares nestes aspectos nas cecílias ainda está sob investigação (BEYO *et al*., 2007a).

Como visto para as fêmeas de *S. annulatus*, durante a vitelogênese o oócito aumenta em tamanho e a interface folículo/oócito é gradualmente transformada. Os grânulos de vitelo observados no citoplasma dos oócitos de *S. annulatus* são constituídos de lipovitelina e fosvitina, que são produzidas no fígado como um material precursor da vitelogenina (SANCHEZ & VILECCO, 2003). Contudo, o vitelo não é formado apenas pelos substratos provenientes do fígado. Em *Xenopus laevis*, durante o período vitelogênico, 80-90% do total de proteínas do oócito é derivado da captação de vitelogenina do plasma, enquanto os outros 10-20% são sintetizados pelo próprio oócito pelo processo de autossíntese (OPRESKO & WILLEY, 1987). O mesmo foi observado na cecília *G. ramaswamii* (BEYO *et al*., 2008b).

Após a ovulação desses oócitos vitelogênicos, em espécies vivíparas, o folículo se torna um corpo lúteo. Esta estrutura tem sido também observada em muitas espécies de cecílias ovíparas (TONUTTI, 1931, WAKE, 1968). No presente trabalho, uma estrutura semelhante ao corpo lúteo foi também encontrada. Após a ovulação, as células foliculares proliferam e invadem o espaço central, formando uma cavidade cheia de uma substância. Em *Typhlonectes compressicauda*, a atividade da enzima 3β hidroxiesteróides desidrogenase (3β-HSD), enzima da via esteroidogênica, tem sido analisada nas células do corpo lúteo, evidenciando uma atividade endócrina relacionada a gravidez (EXBRAYAT, 1986). Contudo, ainda não foi estabelecida a função do corpo lúteo em espécie ovíparas (EXBRAYAT, 2006).

Além de todas as estruturas apresentadas, foram observados também folículos atrésicos nas fêmeas de *S. annulatus* analisadas. De modo geral, ao longo do ciclo reprodutivo das cecílias, ovíparas e vivíparas, certos oócitos se degeneram e os folículos correspondentes desenvolvem-se em corpos atrésicos. Em *I. beddomei* dois tipos de folículos atrésicos foram reconhecidos. O primeiro tipo envolve a atresia durante o crescimento do folículo, no qual os oócitos degeneram-se *in situ* e são reabsorvidos. No segundo tipo, ocorre a atresia de oócitos vitelogênicos, caracterizado pela hipertrofia das células granulosas que se multiplicam e invadem o oócito. Essas células se tornam fagocíticas degenerando o oócito, numerosos vasos sanguíneos invadem a teca que se prolifera e, finalmente o folículo é reduzido a uma massa integrada ao tecido conectivo (MASOOD-PARVEEZ, 1987). Massod-Parveez & Nadkarni (1993) descreveram 5 estágios para esse segundo tipo de atresia. Os folículos atrésicos encontrados nos ovários de *S. annulatus* no presente trabalho são semelhantes ao terceiro estágio dos oócitos atrésicos descritos para *I. beddomei.*

O ciclo sexual de fêmeas de Gymnophiona ovíparas parece ser anual, descontínuo e obedece a um regime sazonal. Em *I. beddomei,* as oogônias são produzidas ao longo do ano, mas sofrem divisões apenas no fim do verão. Pequenos oócitos envolvidos por uma camada de células estão presentes também ao longo do ano. O diâmetro dos folículos aumenta progressivamente na primavera, quando os primeiros oócitos vitelogênicos aparecem. No verão, a estação reprodutiva, os oócitos são liberados no oviduto e durante o outono e inverno, os ovários regridem. Os ovos são postos pelas fêmeas em janeiro após a fertilização interna. Assim, o ciclo sexual anual desta espécie é dividido em 3 principais fases: pré-reprodutiva (agosto a novembro); reprodutiva (dezembro a fevereiro) e pós-reprodutiva (março a julho) (MASOOD-PARVEEZ, 1987; MASOOD-PARVEEZ & NADKARNI, 1993).

No presente trabalho foi possível identificar variações no desenvolvimento gonadal de *Siphonops annulatus*, contudo a oogênese segue um padrão sazonal contrário ao apresentado para *I. beddomei*. As fêmeas de *S. annulatus* foram encontradas em um estágio de maturação avançada, incluindo vitelogênica, durante o inverno (Fig. 7A), sendo que as fêmeas coletadas no verão apresentaram muitos ninhos de oogônias e oócitos I (Fig. 5A). Essa diferença deve-se possivelmente a diferenças no ambiente em que ambas espécies são encontradas.

5.2.2 Anatomia do sistema reprodutor masculino e espermatogênese

Assim como visto para as fêmeas, a anatomia genital dos machos de *S. annulatus* é semelhante ao que tem sido descrito para outras espécies (SPENGEL, 1876; TONUTTI, 1931; SESHACHAR, 1936; WAKE, 1968; EXBRAYAT, 1985, 1992; ANJUBAULT & EXBRAYAT, 2000; SMITA *et al*., 2004). Deste modo, NOBLE (1931 *apud* WAKE, 1968) descreveu que o testículo de cecílias é geralmente composto por uma série de lobos ovais de mesmo tamanho, conectados uns aos outros por um ducto central e portando uma série de ductos transversos que transportam os espermatozóides, corroborando as observações descritas para os machos de *S. annulatus* no presente trabalho.

Entretanto, podemos encontrar variações no tamanho dos lobos. Em *Uraeothphylus oxyurus*, o lobo central é maior, já em *Geotrypetes seraphini, Siphonops brasiliensis, Chthoneperton viviparus* e *Typhlonectes compressicauda* o lobo anterior ou posterior é maior (WAKE, 1968), como foi observado para *S. annulatus* no presente trabalho. Ao contrário disso, em *Dermophis mexicanus*, cada testículo é constituído por um simples lobo alongado com constrições mostrando a fusão entre as unidades (WAKE, 1968).

Usualmente, o número de lobos também pode variar, mas isto não está relacionado ao tamanho ou idade do animal. (EXBRAYAT & ESTABEL, 2006). *Typhlonectes compressicauda* possui mais ou menos 12 lobos em cada testículo, com variações entre o lado direito e esquerdo (EXBRAYAT, 1986). Estudos realizados por Smita *et al.* (2004) mostraram que a organização dos testículos de *Ichthyophis tricolor* (7-11 lobos) e *Uraeothplhus* cf. *naraya* (9-12 lobos) correspondem também ao que já foi reportado para outras espécies de cecílias, como em *Ichthyophis glutinosus* (11-14 lobos) e *Uraeothplhus* sp. (SESHACHAR, 1936). Contudo, como apresentado no presente estudo, o número de lobos nos testículos das cecílias é sujeito a variações, não apenas entre espécies, mas também entre indivíduos da mesma espécie.

As diferenças macroscópicas encontradas nos testículos foram relacionadas ao estádio de maturação gonadal e refletiram nas alterações do IGS ao longo do ano, sendo que os maiores valores foram encontrados para os animais coletados durante o inverno, período no qual os testículos estavam maiores, bem vascularizados e em espermatogênese ativa. Essa diferença foi também descrita para os machos de *Boulengrula taitanus* na Índia, os quais apresentaram testículos mais desenvolvidos e

vascularizados em novembro, durante a fase de espermatogênese ativa (MEASEY *et al*., 2008).

Adicionalmente, a espermatogênese em cecílias, do tipo cística, têm sido extensivamente estudada (SPENGEL, 1876; SESHACHAR, 1936; WAKE, 1968; EXBRAYAT, 1986; EXBRAYAT & DANSARD, 1992, 1993, 1994; SMITA *et al*., 2003, 2004, 2005). De modo geral, os estudos revelaram que a estrutura dos lóbulos é hexagonal ou circular dependendo da espécie. No trabalho de Smita *et al*. (2004), já mencionado, os autores descreveram a estrutura dos lobos como hexagonais para *Ichthyophis tricolor* e circulares para *Uraeotyphlus cf. narayani,* para *B. taitanus*, Measey *et al.* (2008) descreveram como circulares, e no presente trabalho foram encontrados lobos circulares, corroborando o que foi mencionado sobre a variação interespecífica da estrutura lobular em cecílias.

Segundo Wake (1968), cada lóbulo está envolvido por uma membrana basal e uma rede de fibras e células suporta as células germinativas e as células de Sertoli. Foi proposto por Seshachar (1936) que o tecido intersticial ocupa a área triangular entre os lóbulos. A maior parte da área intersticial consiste de células de Leydig, mas pouco é conhecido sobre sua função na secreção dos hormônios masculinos e na regulação da espermatogênese. Contudo, o tecido intersticial mostrou variações correlacionadas ao ciclo sexual e ao desenvolvimento dos órgãos sexuais em muitos machos de Gymnophiona. Tais correlações sugerem que as células de Leydig estão envolvidas no desenvolvimento de caracteres sexuais (SMITA *et al*., 2006). No presente trabalho, essas correlações não foram feitas, entretanto, podemos notar que os animais em fase de quiescência sexual apresentaram uma grande área intersticial nos testículos em comparação aos machos em espermatogênese ativa, nos quais esta área se mostrou reduzida. Em *Gymnopis multiplicata* foi observado um tecido intersticial bem desenvolvido quando os lóbulos continham apenas espermatogônias primárias e, então uma diminuição deste tecido com o avanço da espermatogênese (WAKE, 1968). Variações da área intersticial foram estudadas também em *Typhlonectes compressicauda* mostrando que, durante os períodos nos quais as células germinativas consistiam apenas de espermatogônias primárias e secundárias o tecido intersticial ocupava 28% da área total de superfície, provavelmente devido à diminuição dos lóbulos, ao contrário disso, a área intersticial foi mínima durante a fase reprodutiva (ANJUBAULT & EXBRAYAT, 2000, 2004).

Na área intersticial dos testículos de *S annulatus* observamos os ductos coletores, os quais parecem assumir uma grande importância no contexto da geração de espermatogônias a partir do epitélio do ducto (SESHACHAR, 1936). No presente trabalho, foi possível observar espermatogônias próximas ao epitélio dos ductos coletores, o que pode evidenciar a origem dessas células germinativas. Smita *et al*. (2006) confirmaram a origem das espermatogônias primárias a partir do epitélio do ducto coletor em *Ichthyophis tricolor* e *Uraeotyphlus* cf. *narayani*.

Como já mencionado, cada lóbulo está envolvido por uma membrana basal e uma rede de fibras e células, formando uma matriz, na qual as células germinativas estão imersas (SESHACHAR, 1936; WAKE, 1968), o que foi observado para *S. annulatus* no presente trabalho. De acordo com os autores, essa matriz é composta essencialmente de lipídios, um substrato com valor nutricional, que serve para suporte e manutenção das células germinativas nos lóbulos. Sendo assim, é esperado que o volume desta matriz lipídica aumente com o aumento do tamanho dos lóbulos durante a fase de espermatogênese ativa, o que pode ter contribuído para o maior valor de IGS e para as elevadas concentrações de lipídios testiculares encontrados nos machos coletados na estação de inverno. Adicionalmente, durante a espermatogênese, seja no padrão cístico como em peixes e anfíbios ou no padrão não cístico, como em outros vertebrados, as células germinativas dos testículos estão intimamente associadas com as células Sertoli (SMITA *et al.,* 2003), como pode ser visto para *S. annulatus* na figura 13B.

Em adição a estrutura dos lóbulos, células mióides foram observadas aderidas à membrana basal. Essas células apresentam características contráteis, semelhantes a células musculares lisas (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). Em mamíferos, as células mióides são encontradas ao redor dos túbulos seminíferos sendo importantes na contração dos túbulos para movimentação de fluidos e espermatozóides (RUSSELL *et al*., 1990).

Em geral, mesmo a espermatogênese sendo tão estudada em Gymnophiona, não há nenhum estudo que identifique os estágios correspondentes na espermatogênese de cecílias. Spengel (1876 *apud* SMITA *et al*., 2004), na descrição da espermatogênese em *Caecilia gracili, Ichthyophis glutinosus* e *Siphonops annulatus,* identificou sete estágios de diferenciação das células germinativas, corroborando então os estágios encontrados para *S. annulatus* mantidos em cativeiro no presente trabalho. Seshachar (1936) descreveu seis estágios das células germinativas: espermatogônia primária,

espermatogônia secundária, espermatócito primário, espermatócito secundário, espermátide e espermatozóide. Exbrayat & Sentis (1982) identificaram séries isogênicas de células germinativas em *Tiphlonectes compressicauda,* como espermatogônia primária, espermatogônia secundária, espermatócito primário, espermatócito secundário, espermátide, espermatozóides jovens, espermatozóides e espermatozóides livres. Nos estudos da espermatogênese de *Ichthyophis tricolor* e *Uraeotyphlus narayani,* Smita *et al.* (2004) identificaram o mesmo número de estágios da classificação antiga de van Oordt (1956): espermatogônia primária e secundária, espermatócito primário e secundário, espermátide arredondada e alongada e espermatozóides, como o descrito também para *S. annulatus* no presente trabalho.

Células amebóides foram observadas nos ductos espermáticos juntamente com os espermatozóides. Estas células possuem uma forma irregular apresentando de poucas a muitas protuberâncias pseudopodiais. As células amebóides são encontradas no lúmen dos cistos, aumentando a sua abundância com o avanço dos estágios da espermatogênese. A origem e a função das células amebóides são pouco conhecidas, mas de acordo com Smita *et al.* (2005), observações feitas por microscopia de luz revelaram uma função fagocítica dessas células.

Uma característica comum à espermatogênese de cecílias e outros anfíbios é que todas as células em um simples cisto representam o mesmo estágio de diferenciação e maturação (LOFT, 1974; OLIVEIRA & VICENTINI, 1998; SANTOS & OLIVEIRA, 2008). Contudo, a grande diferença entre a espermatogênese desses grupos é que em salamandras e anuros, os lobos testiculares possuem todos os cistos germinativos se desenvolvendo no mesmo estádio de maturação dentro do lóbulo e os espermatozóides são liberados diretamente no lúmen de um ducto coletor central (WAKE, 1968). Além disso, Seshachar (1936) reportou que a matriz de lipídio observada dentro dos lóbulos em cecílias não está presente em nenhum outro grupo de anfíbio.

Os machos de anfíbios geralmente apresentam um ciclo testicular anual caracterizado por um período quiescente no final do outono e inverno (PANIAGUA *et al.,* 1990). Gallien (1959) revisou a influência da sazonalidade na reprodução em anuros e urodelos e concluiu que a reprodução é invariavelmente correlacionada com a primavera e regimes de aumento ou temperatura ótima em espécies de zona temperada e tropical. De modo geral, os machos de cecílias apresentam um ciclo anual descontínuo que é caracterizado, em todas as espécies estudadas, por uma fase de reprodução, que ocorre na estação úmida ou chuvosa, e outra de inatividade sexual que corresponde ao

período de seca. Em *Icthyophis glutinosos,* uma espécie ovípara no Sri Lanka, apenas espermatogônias foram observadas nos testículos durante o inverno. Na primavera, essas células se diferenciaram em espermatozóides que foram liberados durante o verão, na estação reprodutiva (SARASIN & SARASIN, 1987-1890).

Para *Ichthyophis tricolor*, coletados na Índia, três principais períodos reprodutivos foram encontrados: espermatogênese ativa, regressão e quiescência. A quiescência sexual foi observada durante a primeira monção, entre abril e junho, seguida pela espermatogênese ativa no início da segunda monção, em julho, considerando que a regressão corresponde ao longo período inter-monção, durante o qual as células germinativas morrem devido a apoptose. Uma observação interessante é que neste estudo os testículos foram observados em regressão em junho e, rapidamente, em julho (verão), entraram na fase de espermatogênese ativa (SMITA *et al.,* 2005).

Deste modo, podemos sugerir que as observações feitas por Gallien (1959) podem ser aplicadas também para a maioria dos machos de cecília, incluindo a espécie analisada no presente trabalho. Como já mencionado, os machos de *S. annulatus* em cativeiro foram observados com espermatogênese ativa durante o inverno, estação úmida e chuvosa no sul da Bahia, enquanto nas outras estações do ano (primavera, verão e outono) foram encontrados tanto machos com testículos em regressão quanto em quiescência.

5.3 Parâmetros metabólicos

5.3.1 Padrão de deposição e mobilização dos lipídios em fêmeas e machos

Como já reportado, os animais que apresentam reprodução sazonal detectam as variações dos estímulos ambientais, que são transduzidas em respostas endócrinas e metabólicas. Desta forma, um problema encontrado por esses animais no ambiente é a disponibilidade e consequentemente o armazenamento de energia (JARED *et al*., 1999). Sendo assim, quando o alimento é abundante e o requerimento energético é baixo, a energia é acumulada e direcionada para todos os processos necessários para sobrevivência do indivíduo e da população, incluindo crescimento, manutenção, termorregulação e reprodução. Por outro lado, quando a energia é escassa, os mecanismos fisiológicos tendem a favorecer aqueles processos que garantem apenas a sobrevivência do indivíduo e neste caso, a reprodução é retardada (SCHENEIDER, 2004).

Deste modo, o acúmulo de lipídios, como fonte de energia, nos diferentes tecidos é altamente dependente da qualidade nutricional, bem como da estação do ano e do estágio de desenvolvimento e reprodução do animal (SHERIDAN, 1994). Para as cecílias, o fígado e os corpos gordurosos são importantes órgãos de reserva de lipídios, que apresentam um grande papel no processo reprodutivo (EXBRAYAT, 1988).

Durante a vitelogênese, o fígado é estimulado pelo hormônio estradiol a sintetizar a vitelogenina, uma fosfoglicolipoproteína, que dentre seus diferentes componentes é formada por lipídios mobilizados dos órgãos de reserva e incorporados nos oócitos por pinocitose (CARNEVALI & MOSCONI, 1992). Desta forma, é esperado que as fêmeas armazenem uma grande quantidade de lipídios nos tecidos de reserva em um período que antecede a vitelogênese, para que posteriormente esse substrato seja mobilizado para a síntese da VTG, aumentando assim a concentração de lipídios nos ovários e, consequentemente a diminuição nos outros tecidos.

Ao contrário disso, no presente trabalho encontramos uma redução dos lipídios em todos os tecidos analisados durante o outono (estação que antecede a vitelogênese das fêmeas no presente trabalho), seguido por um aumento no inverno, quando encontramos as fêmeas vitelogênicas. Devido a grande quantidade de corpos gordurosos encontrados nestes animais e a grande importância deste tecido para a reprodução em cecílias, podemos sugerir que a diminuição dos lipídios no fígado e no músculo durante o outono seja decorrente da utilização deste substrato como fonte de energia, enquanto os lipídios obtidos a partir da dieta parecem estar sendo depositados no tecido adiposo para repor os estoques. Quando chega a fase de vitelogênese, no inverno, novamente a concentração lipídica aumenta no fígado, mas este aumento não é decorrente de uma depleção do substrato em nenhum outro tecido analisado, indicando que possivelmente os lipídios tenham sido mobilizados dos corpos gordurosos para o fígado e, finalmente para os ovários, resultando no crescimento folicular observado durante o inverno. Essa mobilização pode ser confirmada pelo aumento de lipídios plasmáticos observado nas fêmeas durante o inverno. Desta forma, o aumento do IGS neste período foi decorrente do aumento de lipídios nas gônadas, como já relatado. Poucas foram as alterações ocorridas no músculo e em uma proporção menor, indicando a pequena participação deste tecido como órgão de reserva de lipídios na reprodução de cecílias *S. annulatus.* Todas essas alterações podem ser visualizadas na figura 25.

De modo geral, podemos encontrar nos vertebrados diferentes padrões de mobilização e utilização dos lipídios para a reprodução. Trabalhos com peixes

mostraram que em fêmeas de *Oreochromis niloticus* e *Trisopterus lucus*, com a chegada da fase vitelogênica, ocorreu a mobilização de lipídios hepático e muscular para as gônadas (EL-SAYED *et al*., 1984; MERAYO, 1996). Ao contrário disso, em machos e fêmeas de *Diplodus sargus* ocorreu um aumento de lipídios em todos os órgãos de reserva analisados (fígado, músculo e gônadas) durante a fase reprodutiva (PÉREZ *et al*., 2007).

Para os répteis, os corpos gordurosos representam o principal estoque de lipídios (SCOTT *et al*., 1995; SHERIDAN, 1994), contudo os lipídios do fígado contribuem para o crescimento folicular (BONNET *et al*., 1994) e os lipídios do músculo podem ser usados quando as fontes energéticas do tecido adiposo são limitadas (DERICKSON, 1976). As fêmeas reprodutivas de serpentes viperinas *Natrix maura* têm mais lipídios no fígado do que as fêmeas pós-reprodutivas, suportando a importância deste órgão na produção de vitelogenina. Além disso, comparações feitas entre as serpentes nas fases pré e pós-reprodutivas nessa mesma espécie indicaram que os corpos gordurosos foram a principal fonte de lipídios para a reprodução em machos e fêmeas. (SANTOS & LLORENTE, 2004). O mesmo ocorreu para as fêmeas do lagarto *Urosaurus ornatus,* que apresentaram um aumento da gordura abdominal e dos lipídios no fígado no início da produção dos oócitos, seguida de uma diminuição na fase final da vitelogênese e gravidez. Assim, o lipídio armazenado no fígado parece prover um substrato disponível para a síntese de vitelogenina e a diminuição da gordura abdominal parece refletir a utilização destes estoques como energia imediata ou transferência desses estoques para o fígado (LACY *et al*., 2002).

Contudo, poucos são os estudos envolvendo a participação dos lipídios na reprodução dos anfíbios, principalmente para Gymnophiona. Sabe-se que para este grupo de vertebrados, os corpos gordurosos parecem ter um papel muito importante na reprodução, variando com as alterações sazonais e os ciclos reprodutivos. No anuro *Bufo arenarum* (PENHOS, 1953) este tecido foi relacionado ao aumento de massa ovariana. O mesmo foi observado para *Rana sculenta*, em que a variação da massa e a composição química dos corpos gordurosos foram relacionados à atividade sexual (ROCA *et al*., 1970), e para *Rana cyanophlyctis,* na qual foi encontrada uma diminuição da massa dos corpos gordurosos com o aumento da massa dos ovários (PANCHARATNA & SAIDAPUR, 1985). Nas fêmeas de uma espécie de cecília vivípara, *Typhlonectes compressicauda,* foi observado um aumento da concentração de lipídios em todos os órgãos de reserva (tecido adiposo e fígado) no início da estação

chuvosa, que parece estar relacionado a vitelogênese e ao preparo para a gravidez (EXBRAYAT, 1988), corroborando os resultados encontrados para as fêmeas de *S. annulatus* no presente trabalho.

Além disso, foi possível notar também um aumento dos lipídios no tecido dérmico apenas nas fêmeas vitelogênicas, coletadas na estação de inverno. Este resultado pode indicar a possível mobilização dos lipídios de outros tecidos, por exemplo, dos corpos gordurosos, por meio do plasma para a pele; retratando o início do preparo deste tecido para a futura alimentação dos filhotes. Adicionalmente, pode-se sugerir que é muito importante para esses animais o acúmulo de grande quantidade de tecido adiposo no corpo, pois além de participarem no fornecimento de energia e de substrato para a síntese de vitelogenina, podem estar envolvidos também na dermatofagia. Análises histológicas feitas com fêmeas de *S. annulatus* indicaram que durante o cuidado parental as células epidermais são mais largas e apresentam muitas inclusões no citoplasma com grande afinidade por tetróxido de ósmio e *Sudan Black* B, que evidenciam a presença de lipídios (WILKINSON *et al*., 2008), corroborando os resultados encontrados no presente trabalho para as fêmeas de *S. annulatus* mantidas em cativeiro.

Por outro lado, é importante mencionar que o constante fornecimento de alimento no cativeiro pode ter possibilitado a manutenção de altas concentrações lipídicas corpóreas encontradas nas fêmeas durante o inverno, pois estando em confinamento esses animais não apresentam gastos energéticos para captura de presas ou fuga de predadores. *Typhlonectes compressicauda* em cativeiro gasta a maior parte do tempo escondido e imóvel e apenas 25% do tempo observado é utilizado para atividades (GANS, 1975).

Os machos de *S. annulatus* apresentaram um padrão de deposição dos lipídios totais semelhante ao observado para as fêmeas, sendo os maiores valores encontrados também durante o inverno, posteriormente à redução deste substrato encontrada nos animais coletados no outono. Assim, o aparente avanço da espermatogênese não é acompanhado por uma diminuição dos lipídios corpóreos (Fig. 25). Devido a grande quantidade de corpos gordurosos presentes na cavidade abdominal destes animais e a pequena variação de lipídios encontrada nos outros tecidos analisados, sugere-se também que o tecido adiposo seja um importante fornecedor de energia para os machos nesse processo, como visto para as fêmeas. Ou ainda, a alimentação contínua no cativeiro permite que os estoques sejam mantidos neste órgão.

No trabalho de Exbrayat (1988), já mencionado para as fêmeas, foram estudadas também as variações nos tecidos de reserva dos machos de *Typhlonectes compressicauda*. Os valores mínimos para a massa corpórea, hepática e dos corpos gordurosos foram encontrados apenas na fase de inatividade sexual, coincidente com a estação seca. Essas observações são explicadas apenas pela escassez de alimento no campo neste período e, de acordo com isso, as reservas metabólicas são progressivamente exauridas. Durante a estação chuvosa, os animais têm uma maior disponibilidade de alimento, mas eles também necessitam de uma fonte suplementar de energia relacionada à atividade sexual. Assim, parte da reserva pode ser usada e outra parte é acumulada nos corpos gordurosos.

Adicionalmente, machos anuros *Scinax* que apresentam alta taxa de vocalização no período reprodutivo, mostraram que não houve diferença no acúmulo de lipídios nos órgãos de reserva durante este período. Esses animais parecem se alimentar durante esta fase mantendo os estoques lipídicos (CARVALHO *et al*., 2008). Ao contrário disso, machos de serpentes viperinas, *Natrix maura,* apresentaram uma depleção de lipídios nos corpos gordurosos e músculo, correspondendo a atividade de corte e espermatogênese. Para esta espécie o fígado apresentou um papel menos importante na reprodução (SANTOS & LLORENTE, 2004).

Como reportado por muitos autores, os testículos dos machos de cecílias são compostos por uma matriz lipídica, na qual as células germinativas estão imersas (WAKE, 1968). Com o avanço da espermatogênese, os lóbulos testiculares aumentam seu tamanho e, provavelmente ocorre um aumento dessa matriz, o que explicaria o pico de lipídios nas gônadas no inverno, corroborando as análises de histologia, com a qual identificamos uma espermatogênese ativa em todos os machos desse período. Os valores de IGS também foram maiores para os machos coletados no inverno, contudo não encontramos correlação ao aumento de lipídios observados nos testículos neste período.

Segundo Sheridan (1994) o fígado, juntamente com o tecido adiposo, são órgãos de armazenamento que apresentam importante papel na reprodução de anfíbios. Sendo o tecido adiposo o órgão primário de deposição de lipídios, podemos notar que no presente trabalho o tecido hepático nas fêmeas e nos machos de *S. annulatus* apresentou as maiores concentrações lipídicas em comparação aos outros tecidos, com exceção das gônadas. Deste modo, podemos sugerir que o fígado parece funcionar como um órgão secundário de armazenamento de lipídios para *S. annulatus*, tendo também um papel

importante na vitelogênese desses animais, como já reportado, corroborando os dados encontrados na literatura.

De modo geral, podemos sugerir que esse aumento na deposição de lipídios totais no fígado, músculo e gônadas de fêmeas e machos durante a estação de inverno, início do período reprodutivo de *S. annulatus,* demonstra a importância dos lipídios como fonte de energia para o desenvolvimento dos processos reprodutivos, além de atuar como um substrato importante na composição dos ovários e testículos maduros (Fig. 25). Como em outros anfíbios, acredita-se que para *S. annulatus* o tecido adiposo apresente também um papel importante na reprodução, armazenando os lipídios que são mobilizados para os outros tecidos durante a estação reprodutiva. Destaca-se ainda que essa mobilização de lipídios ocorre também para o tecido dérmico das fêmeas, ao mesmo tempo da vitelogênese, como um início do preparo da pele para a futura alimentação dos filhotes que ocorrerá na primavera.

5.3.2 Padrão de deposição e mobilização das proteínas em machos e fêmeas

Ao contrário do que foi apresentado para a deposição de lipídios, encontrou-se uma intensa depleção de proteínas totais no fígado e músculo de machos e fêmeas coletados no outono e inverno. Essa diminuição refletiu em um aumento das proteínas no tecido dérmico em ambos os sexos durante o outono e inverno, e nos ovários no inverno (Fig. 25). Com base nessas informações, podemos evidenciar claramente a mobilização de proteínas totais do fígado e músculo para o tecido ovariano e dérmico por meio do plasma, que apresentou também as maiores concentrações protéicas neste período (Fig. 25). De acordo com Jalabert (2005), durante a maturação sexual, as fêmeas dos vertebrados incorporam vitelogenina nos oócitos, sendo esta glicolipofosfoproteína composta por 19% de lipídios e 79% de proteínas. Assim é esperado que as fêmeas de *S. annulatus* apresentem valores altos destes substratos nas gônadas neste período.

Não há informações na literatura que descrevam a importância das proteínas nos processos reprodutivos de anfíbios. Contudo, esses dados são bem conhecidos para os peixes. Von Der Decken *et al*. (1992) analisaram o processo de mobilização de proteínas ao longo do ciclo reprodutivo em fêmeas de *Salmo salar,* mostrando também que o avanço da maturação promove elevação nos níveis de proteína plasmática acrescida de uma hipertrofia hepática. Em *Salminus brasiliensis*, a concentração de proteínas hepáticas em fêmeas maduras diminuiu e ocorreu um aumento das proteínas

plasmáticas (MOREIRA *et al*., 2002), dados estes que corroboram os resultados apresentados para as fêmeas de *S. annulatus*.

Como nas fêmeas, os machos também possuem altas concentrações de proteínas na pele, que parece ser proveniente também da mobilização de proteínas do fígado e músculo. Essa deposição na pele em machos e fêmeas de *S. annulatus* parece não ser relacionada apenas a dermatofagia, mas sim uma característica da espécie de utilizar a pele como órgão de reserva de proteínas.

A depleção de proteínas nas gônadas e na pele, principalmente durante a primavera, para ambos os sexos não refletiu em aumento nos outros tecidos e nem em conversão a lipídios, sugerindo que este substrato esteja sendo utilizado como fonte de energia, ou ainda, transformado em glicogênio. É bem conhecido que os lipídios, o glicogênio e as proteínas são as principais fontes do metabolismo energético para a manutenção corpórea dos animais. Anuros semi-aquáticos armazenam principalmente glicogênio e lipídios (SMITH, 1950; PASANEN & KOSKELA, 1974) e anuros terrestres, por outro lado, dependem primariamente dos estoques de lipídios (SEYMOUR, 1973; MORTON, 1981). Além disso, sabe-se que devido à baixa concentração de oxigênio no solo, animais subterrâneos tendem a consumir principalmente glicogênio, corroborando os dados apresentados na literatura sobre a importância deste substrato para espécies subterrâneas, como *S. annulatus.* Entretanto, esta afirmação não pode ser confirmada, pois devido à insuficiência de tecido não foram realizadas análises de glicogênio no presente trabalho.

Como visto para as análises lipídicas, as alterações de proteínas totais nas fêmeas e nos machos de *S. annulatus* parecem seguir o avanço da maturação gonadal. Assim a diminuição de proteínas totais observadas no fígado e no músculo dos animais coletados na estação reprodutiva (inverno) parecem refletir no aumento desse mesmo substrato nos ovários e na pele de ambos os sexos (Fig. 25).

5.3.3 Perfil de ácidos graxos teciduais e plasmáticos

A diferença na composição dos tecidos pode ser resultado da especificidade e afinidade de ácidos graxos pelos mesmos ou do próprio metabolismo do animal. De uma forma geral, os ácidos graxos têm papel diferenciado no metabolismo dos vertebrados, e os fosfolípídios são importantes constituintes de membranas e funcionam como o principal precursor de prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, enquanto os

triacilgliceróis servem como depósitos para ácidos graxos que são catabolisados no metabolismo energético celular (NELSON & COX, 2005).

O tecido adiposo funciona como o principal órgão de reserva desses lipídios, armazenados sob a forma de triacilgliceróis, na maioria dos vertebrados (SHERIDAN, 1994). Em geral, esses compostos são formados por dois SFA ou MUFAs e uma cadeia central de PUFA. Assim, sabe-se que aproximadamente 80% da composição dos triacilgliceróis correspondem aos ácidos graxos saturados e monoinsaturados (BELL *et al.,* 1986). Corroborando essas informações, os lipídios totais do tecido adiposo de fêmeas e machos adultos de *Siphonops annulatus*, apresentaram maiores porcentagens de SFA e MUFAs do que PUFAs (Tab. 4).

Adicionalmente, os fosfolipídios são constituídos por dois ácidos graxos que estão unidos a um grupamento polar por meio de uma ligação fosfodiéster, possibilitando sua característica anfipática. Em geral, os FLs contêm um SFA ou MUFA com 16 ou 18 carbonos na posição sn1 e um PUFA com 18 a 22 carbonos na posição sn2 (GURR & HARWOOD, 1991). A proporção relativa dos lipídios varia com o tipo de membrana. Cada reino, espécie, tecido ou tipo celular possui um conjunto característico de lipídios de membrana, sendo que esta composição é regulada pela célula de forma a alcançar uma fluidez constante em várias condições (NELSON & COX, 2005). Contudo, ao contrário do que foi apresentado para os TGAs, nos fosfolipídios 70 a 80% da sua composição é de PUFAs. As propriedades de permeabilidade da bicamada lipídica são dependentes da natureza e do comprimento da cadeia de ácidos graxos constituintes na membrana (BELL *et al.*, 1986). Deste modo, os FLs de todos s tecidos analisados no presente trabalho apresentaram maiores porcentagens de PUFAs do que SFA e/ou MUFAs (Tab. 5-9).

Contudo, mesmo havendo diferenças na composição de TAGs e FLs, encontramos ácidos graxos comuns entre o tecido adiposo e os FLs dos outros tecidos estudados, como C16:0, C18:0, C18:1 e C18:2n6. Isso pode indicar que esses AGs funcionem como fonte de precursores metabólicos para elongação e dessaturação de AGs ou ainda que possam constituir uma fonte de reserva para β-oxidação. Em vertebrados, o C18:2n6c é um AG essencial, importante como precursor de PUFAs C20-22, que são incorporados como componentes integrais das biomembranas ou metabolizados por 2 principais sistemas de oxigenação em produtos biologicamente ativos, como os eicosanóides (NOR ALIZA, 2001).

As alterações ocorridas ao longo do ciclo anual nos fosfolipídios das fêmeas de *S. annulatus* foram devidas principalmente às variações dos ácidos graxos saturados e polinsaturados, inversamente proporcionais (Fig. 26). Assim, a diminuição dos SFAs no fígado e no ovário durante as estações de inverno, primavera e verão foram decorrentes do aumento de PUFAs no mesmo período, contudo em alguns casos não foi comprovado diferença estatística significativa, devido ao alto erro padrão encontrado.

As fêmeas coletadas durante o inverno apresentaram oócitos vitelogênicos, indicando assim a ocorrência da vitelogênese no fígado nessa estação. Este processo envolve uma sequência temporal de fatos: a ativação de lipases no tecido adiposo via estrógenos; hidrólise dos triacilgliceróis por lipases lipoprotéicas gerando os ácidos graxos livres; exportação desses ácidos graxos para o fígado; incorporação em fosfolipídios e triacilgliceróis e associação destes lipídios recém formados à apoproteínas, biossintetizadas no retículo endoplasmático rugoso dos hepatócitos, e aos aminoácidos mobilizados do tecido muscular, para formar a VTG que será transportada aos oócitos (SARGENT, 1995). Assim, podemos sugerir que esses fosfolipídios formados nos hepatócitos, que constituirão a vitelogenina, parecem conter grandes quantidades de PUFAs, importantes no desenvolvimento de embriões, o que corrobora o aumento destes AGs da série n6 e n3 de cadeia longa, como C20:4n6 e C22:4n6, C22:5n3 e C22:6n3, respectivamente, encontrados no fígado das fêmeas de *S. annulatus* durante o inverno no presente trabalho. Adicionalmente, podemos sugerir que esses AGs, constituintes dos FLs do fígado e ovário, que estão envolvidos com a VTG podem ter sido mobilizados do tecido adiposo, onde observamos uma redução de PUFAs durante o inverno (Fig. 26). Ao contrário disso, poucas alterações foram encontradas nos FL do músculo, demonstrando que para as fêmeas de *S. annulatus,* este tecido não tem influência tão marcante nos processos reprodutivos (Fig. 26).

Além disso, a vitelogênese é uma das atividades mais intensas durante o período reprodutivo das fêmeas. Estudos realizados com *Physalaemus pustulosus* (RYAN *et al.*, 1983) e *Hyperolius viridiflavus* (GRAFE *et al.,* 1992) mostraram o aumento da taxa metabólica das fêmeas durante esse período. Deste modo, esse aumento de PUFAs, principalmente C20:4n6, C22:4n6, C22:5n3 e C22:6n3, observado nos fosfolipídios do fígado pode estar envolvido com o aumento da permeabilidade das membranas dos hepatócitos, devido a intensa atividade dessas células durante a fase de vitelogênese. Há fortes evidências de uma correlação entre a composição lipídica das membranas, as funções metabólicas que a membrana desempenha e a atividade metabólica dos

organismos (HULBERT & ELSE, 2000). Uma correlação entre a composição lipídica das biomembranas e a taxa metabólica é dada pela influência dos ácidos graxos dos FLs sobre a atividade da Na^+K^+ATPase, demonstrando que o aumento de PUFAs está relacionado a maior atividade da enzima e, em alguns casos ao aumento da taxa metabólica (WU *et al.,* 2001). Nesse contexto, as membranas, e mais especificamente a composição da bicamada, seria o fator comum que exerce uma grande influência, direta ou indiretamente, sobre todos os processos fisiológicos, funcionando como um possível marca-passo do metabolismo (HULBERT & ELSE, 2002).

Os vertebrados de modo geral requerem os PUFAs para um crescimento e desenvolvimento normal, incluindo a reprodução. Esses AGs atuam na reprodução influenciando nos padrões de desenvolvimento gonadal, na qualidade dos ovos, na fecundidade e na taxa de sobrevivência dos filhotes (IZQUIERDO *et al.*, 2001; SARGENT *et al.*, 2002; HUANG *et al.*, 2003), sendo que essas influências estão relacionadas principalmente as fêmeas. Deste modo é esperado que ocorram alterações no perfil de AGs, mais especificamente os PUFAs, nos diferentes tecidos de reserva ao longo do ciclo reprodutivo de fêmeas, como visto no presente trabalho.

Blanchard *et al.* (2005), em um estudo com uma espécie de teleósteo, *Perca fluviatilis*, encontraram um decréscimo na concentração de PUFAs totais no fígado durante o ciclo de maturação sexual e um aumento nos ovários, e neste caso, o C20:4n6 foi o responsável por essas variações encontradas ao longo do ciclo reprodutivo. De acordo com muitos autores, o ácido araquidônico é o precursor de eicosanóides, como prostaglandinas e leucotrienos, que estão envolvidos na esteroidogênese e maturação dos oócitos em vertebrados (JOHNSON *et al.,* 1991; WADE *et al.,* 1994; MERCURE & VAN DER KRAAK, 1995; WANG *et al.*, 2000; SORBERA *et al.,* 2001;).

Adicionalmente, em mamíferos o LH surge no final da maturação oocitária e ovulação e está acompanhado pelo aumento desses eicosanóides, produzidos no folículo, em uma fase anterior à ovulação. Em *Xenopus laevis* foi comprovado que a ovulação é também mediada por eicosanóides, como as prostaglandinas (DHILLON *et al.*, 2010), estando envolvida com as alterações de PUFAs. Estudos feitos com uma salamandra aquática, *Hynobius leechii*, sugerem que a prostaglandina atue como um ferormônio sexual para esses animais (EOM *et al.*, 2009).

No presente trabalho, não ocorreram alterações na porcentagem de PUFAs totais e nos PUFAs da série n6 nos FLs do ovário. Assim, podemos notar que o ácido araquidônico, importante na síntese dos eicosanóides, permanece alto ao longo do ano,

demonstrando a sua possível importância na esteroidogênese das fêmeas de *S. annulatus* durante todo o ciclo. Ao contrário disso, os PUFAs n3 foram maiores no ovário durante o inverno e a primavera, devido principalmente ao ácido docosahexanóico (C22:6n3, DHA), outro importante precursor dos eicosanóides envolvidos no processo de maturação final dos oócitos (SORBERA *et al.,* 2001).

Com relação à composição do vitelo, o perfil de ácidos graxos do ovo de anfíbios é similar àqueles encontrados nos ovos de lagartos insetívoros, os quais mostram altas porcentagens de C20:4n6 e C20:5n3 (ácido eicosapentanóico – EPA) e baixas de C22:6n3 nos lipídios polares. Estas similaridades podem ser parcialmente devido à dieta de alguns anuros e lagartos ser baseada em insetos (HUANG *et al.,* 2003). No caso da espécie estudada no presente trabalho, que também apresenta um hábito insetívoro, os valores do AA na fração polar ovariana (19-23%, tab. 7) corroboraram o apresentado para outros anfíbios e lagartos, mas com relação aos PUFAs n3 mencionados, podemos observar que as porcentagens de EPA e DHA são similares na fração polar ovariana (Tab. 7), diferente do que foi encontrado por Huang *et al.* (2003). Como já mencionado esses PUFAs, componentes dos fosfolipídios de membranas, estão envolvidos no desenvolvimento dos embriões (SPEAKE *et al.*, 2002). Nos embriões de aves, são encontrados valores altos de AA nos lipídios do fígado e coração (SPEAKE *et al.*, 2002). O DHA está presente em grandes quantidades em larvas de peixes e nos embriões das aves durante os primeiros estágios de crescimento, sendo importante também nos tecidos neurais e na retina, agindo como uma barreira biofísica apropriada ao desenvolvimento dos neurônios e fotorreceptores (OLSEN, 1999; SPEAKE *et al.*, 2002).

Contudo, esses importantes PUFAs não parecem ser provenientes diretamente da dieta, pois em cativeiro as fêmeas de *S. annulatus* não se alimentam de insetos como no ambiente natural. A alimentação fornecida para as cecílias é principalmente filé de frango, coração de boi e ração, alimentos ricos em SFA, MUFAs e PUFAs n6 de cadeia curta, como C18:2n6 (Tab. 1). Deste modo, esses animais parecem apresentar grande capacidade de conversão de PUFAs de cadeia curta, C18, a PUFAs de cadeia longa, C20-22, demonstrando a influência da dieta materna na composição de AGs no vitelo e também a importância desses compostos para um desenvolvimento adequado em todos os estágios de vida.

De uma forma geral, a reprodução é afetada por fatores ambientais, nutricionais e sociais. Um estudo feito com *Xenopus laevis* claramente indicou a influência da dieta

materna na composição de ácidos graxos dos embriões, principalmente nos fosfolipídios bioativos. No início do desenvolvimento, os embriões não se alimentaram e utilizaram todos os substratos armazenados no ovo, então a dieta utilizada pela mãe antes da vitelogênese influenciou todo o desenvolvimento embrionário (RIZZO *et al.*, 1999).

Poucas alterações foram encontradas para os MUFAs nos FLs da maioria dos tecidos analisados ao longo do ciclo anual das fêmeas de *S. annulatus*, e as porcentagens se mantiveram altas devido ao ácido graxo C18:1n9. Sabe-se que ácidos graxos monoinsaturados de cadeia longa, como C18:1n9, presentes em altas concentrações nos tecidos, como foi visto no tecido adiposo, bem como na circulação sanguínea, aparentemente constituem sinais que informam o hipotálamo e os tecidos sobre o estado nutricional do organismo, desencadeando um conjunto de respostas integradas e compensatórias (LAM *et al.*, 2005). Várias evidências indicam ainda, um papel direto desse ácido graxo como regulador da transcrição gênica envolvida com a reesterificação de AGs em TAGs e inibição do consumo de AGs (DUPLUS *et al.,* 2000).

Contudo, na pele das fêmeas foram encontradas alterações nos MUFAs ao longo do ano, sendo que as cecílias durante o inverno apresentaram um pequeno aumento desses AGs, principalmente C16:1 e C18:1n9, como visto na tabela 8, contudo na primavera esses valores diminuíram em decorrência do aumento de PUFAs (Fig. 25). De modo geral, durante a primavera e o verão, estações que correspondem ao período de cuidado parental de *S. annulatus,* as cecílias apresentaram valores altos de PUFAs nos FLs, principalmente os AGs da série n3, como o EPA e o DHA. Assim, o tecido dérmico das fêmeas parece apresentar uma fonte adequada de ácidos graxos aos filhotes, fornecendo PUFAs essenciais como C18:2n6, além de elevadas porcentagens de PUFAs altamente insaturados como C20:4n6 e C22:6n3.

Interessantemente, podemos notar que as fêmeas mobilizam os ácidos graxos polinsaturados, importantes para o desenvolvimento embrionário e larval, para os ovários e para a pele em dois momentos diferentes. Durante a estação de inverno em que há a necessidade da produção de um vitelo de qualidade para o desenvolvimento dos embriões, esses AGs são transportados para a fração polar do ovário. Contudo, na primavera ocorre um aumento desses ácidos graxos no tecido dérmico, importante para o crescimento dos filhotes que só se alimentam da pele descamada da mãe nesse período de cuidado parental. Essa diferença no tempo de produção do vitelo e de uma pele mais nutritiva, importantes para o desenvolvimento da prole, parece funcionar

como uma estratégia que garante o fornecimento adequado de nutrientes em todas as fases.

Como visto para as fêmeas, alterações no perfil de AGs dos FLs hepáticos e gonadais ao longo do ciclo foram observadas nos machos de *S. annulatus*, demonstrando mais uma vez, a importância desses órgãos no processo reprodutivo. De modo geral, a diminuição dos SFAs durante o inverno e a primavera observada no fígado e no testículo é inversamente proporcional ao aumento de PUFAs t (Fig. 26), bem como os n6 e n3 de cadeia longa (C20:4n6 e C22:4n6, C22:5n3 e C22:6n3, respectivamente) em ambos os tecidos nesse mesmo período, sendo mais pronunciado nos machos durante a primavera.

Segundo Bell *et al.* (1996), a maioria dos lipídios presentes nos espermatozóides dos vertebrados é polar e está presente na membrana plasmática, apresentando pouca quantidade de lipídio neutro. Em machos de mamíferos, o tecido reprodutivo junto com o tecido neural tem altas proporções de C22:6n3 (DHA), o que explica a alta porcentagem de ácidos graxos polinsaturados n3 de cadeia longa (C20-22n3) nos testículos e no fígado, como visto nas tabelas 5 e 7. O comportamento da membrana plasmática do espermatozóide pode ser importante no controle da fusão com o óvulo. Em humanos, a densidade dos espermatozóides, o número e a motilidade foram todos positivamente correlacionados a quantidade de C22:6n3 (BELL *et al.*, 1996).

Contudo, há grande diferença entre aves e mamíferos com respeito à composição de AGs dos fosfolipídios dos espermatozóides. Os espermatozóides de mamíferos, como em peixes, são caracterizados por altas proporções de PUFAs da série n3, principalmente DHA, em aves, ao contrário, predomina os PUFAs da série n6. Essa diferença no perfil de AG parece representar uma adaptação à temperatura, já que as aves apresentam uma temperatura corpórea maior do que a de mamíferos (41°C e 37°C, respectivamente). Além disso, os testículos dos mamíferos estão mantidos a uma temperatura mais baixa do que o resto do corpo, devido a externalização da cavidade testicular. Desta forma, os espermatozóides das aves devem se desenvolver e funcionar em um ambiente consideravelmente mais quente que o experimentado por mamíferos. O principal PUFA dos espermatozóides das aves, o C22:4n6, possui o mesmo comprimento de cadeia do DHA (C22:6n3), o principal PUFA dos espermatozóides de peixes e mamíferos, mas com 2 insaturações a menos. Essa diferença no grau de insaturação pode representar a manutenção de propriedades biofísicas das membranas dos espermatozóides nas diferentes temperaturas (KELSO *et al.,* 1997).

Mesmo não havendo diferenças para os PUFAs n6 no testículo dos machos de cecílias, podemos observar maiores porcentagens do ácido graxo C22:4n6 durante o inverno e primavera (Tab. 7), valores estes muito maiores até do que os encontrados para C22:6n3, discutido anteriormente, o que demonstra a importância dos PUFAs n6 também para a membrana dos espermatozóides da espécie de cecília estudada no presente trabalho. Além disso, como discutido para as fêmeas, os PUFAs também parecem estar envolvidos na esteroidogênese de machos (WADE & VAN DER KRAAK, 1993; WADE *et al.,* 1994; WANG *et al.,* 2000; WATHES *et al.,* 2007).

Alterações anuais ocorreram também nos FL do músculo, contudo foram contrárias as observadas no fígado e no testículo. Deste modo, houve um aumento de MUFAs e uma diminuição de PUFAs durante o inverno nos FL musculares. Neste caso, podemos sugerir que esses PUFAs tenham sido mobilizados dos FL do músculo para os FLs do fígado e testículo, devido a importância desses AGs nos processos reprodutivos mencionados acima para os machos (Fig 26). Além do músculo, no tecido adiposo também observamos uma intensa redução de PUFAs t, n3 e n6, durante o inverno, que podem também ter sido mobilizados para o fígado e testículo. Adicionalmente, os machos apresentaram uma diminuição de SFA no tecido adiposo nessa mesma estação, estando envolvido com o fornecimento de energia para a reprodução.

Nenhuma alteração significativa foi vista nos FLs do encéfalo de fêmeas e machos de *S. annulatus*, indicando que este tecido apresenta uma composição constante ao longo do ano, provavelmente relacionada a grande importância desse órgão na manutenção das atividades do sistema nervoso. Adicionalmente, em ambos os sexos encontramos porcentagens mais altas de DHA nos FLs do encéfalo do que nos outros tecidos. Os vertebrados, de modo geral, parecem apresentar altas concentrações de PUFAs n3, principalmente DHA, no tecido neural, estando envolvidos com a fluidez das membranas das células nervosas (BELL *et al.,* 1996).

De forma geral, na maioria dos tecidos analisados podemos observar maiores proporções de PUFAs das série n6 e n3 de cadeia longa, com exceção do tecido adiposo no qual encontramos uma maior presença de PUFAs C18 . Organismos eucarióticos possuem uma enzima dessaturase, a qual pode inserir uma dupla ligação no carbono 9 de um ácido graxo saturado. A ação desta Δ9 dessaturase em C16:0 e C18:0 produz C16:1 e C18:1 (HENDERSON *et al*., 1996). Mas, eles não possuem a Δ12 dessaturase que dessatura C18:1n9 a C18:2n6. Consequentemente, os vertebrados são incapazes de sintetizar PUFAs de precursores não-lipídicos. Como os PUFAs participam de

importantes funções celulares, eles devem ser obtidos da dieta. Mas diferenças existem entre os vertebrados em termos de seu requerimento qualitativo e quantitativo, principalmente com relação à dieta.

Peixes de água doce requerem C18:2n6 e C18:3n3 pois conseguem elongar e desaturar esses precursores em ácidos graxos de cadeias mais longas e insaturadas. Ao contrário disso, peixes marinhos têm uma dieta rica em ácidos graxos de cadeias mais longas e altamente insaturadas como, C20:5n3 e C22:6n3, e possivelmente C20:4n6 e apresentam deficiências na elongação e dessaturação das cadeias de ácidos graxos de 18 carbonos (HENDERSON *et al.*, 1996). Já os animais não-aquáticos, que possuem uma alimentação baseada em vegetais terrestres, apresentam em sua dieta ácidos graxos polinsaturados de cadeia curta (C18:2n6 e C18:3n6, principalmente), sendo assim, conseguem elongar e dessaturar aos seus metabólitos ativos de cadeia longa. Essa informação é corroborada para a espécie *S. annulatus* estudada no presente trabalho, na qual encontramos altas porcentagens de C18:2n6 no tecido adiposo, proveniente da dieta (Tab. 1), e pelos altos valores de PUFAs C20-22 encontrados nos FLs de todos os tecidos analisados, produto da elongação e dessaturação dos AGs C18.

Além disso, em todos os casos os animais do presente estudo apresentaram maiores valores de PUFAs da série n6 do que n3. De forma geral, estas observações podem estar relacionadas ao hábito alimentar da espécie, uma vez que dentro da cadeia alimentar terrestre há pouca transferência de PUFAs n3, pois encontramos nos vegetais muito PUFA da série n6 e principalmente de cadeia curta (C18n6). Adicionalmente, como já mencionado, todos os alimentos fornecidos para as cecílias em cativeiro no presente trabalho eram ricos em C18:2n6c.

5.3.4 Diferenças entre os sexos no padrão de deposição dos substratos

Diferenças sexuais no metabolismo dos substratos podem ser observadas na maioria dos vertebrados. As diferenças permanentes são estabelecidas por processos de expressão gênica sexo-específica ou podem ser diferenças temporárias que respondem a alterações nos sinais temporais como, alterações hormonais sexo-específicas ou alterações na demanda energética durante a reprodução (LACY *et al.*, 2002).

No presente trabalho encontramos algumas diferenças no padrão de deposição e utilização dos substratos entre machos e fêmeas. Durante o inverno, estação na qual ambos os sexos se apresentaram ativamente maduros, as fêmeas mostraram uma concentração de lipídios e proteínas nas gônadas maior do que nos machos (Fig. 25).

Este dado aponta uma diferença temporária entre os sexos nessa espécie, decorrente do processo reprodutivo, mais especificamente da vitelogênese.

Em geral, a reprodução é energeticamente custosa para ambos os sexos, mas a magnitude do gasto e sua relação com o sucesso reprodutivo diferem entre machos e fêmeas. Os machos alocam relativamente pouca energia para a produção de gametas e, então podem se reproduzir com sucesso com um investimento de energia menor, que é direcionado para a corte e a cópula. Em contraste, as fêmeas de muitas espécies apresentam altos custos na atividade reprodutiva independente da fecundidade (como migração, cuidado parental), e necessitam de uma reserva energética substancial antes de iniciar a atividade reprodutiva (AUBRET *et al*., 2002).

Pouco se conhece sob o comportamento reprodutivo das cecílias, principalmente no que se refere à cópula e corte de espécies terrestres (WAKE, 1995), contudo o cuidado parental parece ser realizado apenas por fêmeas. Sabe-se que os machos exibem um órgão copulador e são capazes de produzir uma secreção para transporte dos espermatozóides, uma provável adaptação ao ambiente terrestre (WAKE, 1970). Com base nessas informações podemos sugerir, que assim como para outros vertebrados, o gasto energético para os machos na reprodução parece ser menor do que para as fêmeas, que apresentam alta demanda energética para vitelogênese e cuidado parental, que no caso da presente espécie inclui a dermatofagia. Deste modo, também fica claro entender as alterações encontradas na concentração de lipídios no tecido dérmico das fêmeas, o que não foi observado para os machos. Além disso, as fêmeas apresentaram maiores porcentagens de PUFAs n3 na pele em relação aos machos durante a primavera, provavelmente relacionado também ao preparo para o comportamento de dermatofagia. Contudo, essas diferenças podem não ter isso tão pronunciadas no presente trabalho devido ao oferecimento constante de alimento no cativeiro.

A dinâmica dos substratos no corpo evidencia a base para comparar a importância de cada órgão durante a reprodução, bem como avaliar as diferenças sexuais na estratégia energética ligada a reprodução. A variação anual dos substratos energéticos nos tecidos de reserva de cecílias *Siphonops annulatus* pode nos ajudar a entender a contribuição energética destes tecidos em sua biologia reprodutiva e os problemas advindos da criação em cativeiro.

5.4 Esteróides gonadais em machos e fêmeas

A endocrinologia da reprodução em cecílias tem sido pouco estudada. Como já mencionado alguns autores descreveram a presença de um corpo lúteo durante a gestação em cecílias vivíparas e evidenciaram que a produção de progesterona esteja envolvida na manutenção da gravidez (WAKE, 1968, 1993; EXBRAYAT & COLLENOT, 1983). Além disso, Ebersole *et al.* (1998) descreveram informações preliminares sobre a produção de esteróides gonadais de *Typhlonectes natans.* Frente a esta falta de informações na literatura, as alterações dos hormônios gonadais envolvidos na reprodução foram também estudadas para fêmeas e machos de *S. annulatus* ao longo do ciclo anual. Em muitas espécies, os estrógenos, como estradiol, estimulam o comportamento sexual e a vitelogênese em fêmeas, enquanto os andrógenos, como a testosterona e a DHT, estimulam o comportamento e a espermatogênese em machos (NORRIS, 2007). Os progestágenos, como a progesterona, secretados primariamente no corpo lúteo e placenta funcionam na manutenção da gravidez em táxons vivíparos (CUSTODIA-LORA & CALLARD, 2002). De modo geral, a estrutura e função dos hormônios esteróides são conservadas entre os vertebrados (NORRIS, 2007), contudo, diferenças interespecíficas na regulação esteroidogênica da reprodução podem refletir adaptações a diferentes pressões ecológicas (WINGFIELD *et al.,* 1997).

A relação do estradiol com a vitelogenina é bem estudada em muitos trabalhos de peixes (BLÁSZQUEZ *et al.,* 1998; JOHNSON *et al.,* 1991; DEDUAL e PANKUHRST, 1992; GAZOLA *et al.,* 1996, MOREIRA *et al.*, 2002; DAHLE *et al.*, 2003), bem como em anfíbios anuros (FORTUNE, 1983; ITOH & ISHII, 1990; KWON *et al.,* 1991; MEDINA *et al.,* 2004). De modo geral, nos répteis o aumento sazonal do estradiol ocorre por 2 principais razões. Na primeira, o estradiol é o hormônio responsável por estimular o fígado a produzir a VTG (HO *et al.,* 1982), e o seu aumento está correlacionado a atividade vitelogênica em tartarugas (OTT *et al.,* 2000), jacarés (GUILLETTE *et al.,*1997), lagartos (RHEN *et al.,* 2000; RADDER *et al.,* 2001; LACY *et al.,* 2002) e serpentes (BONNET *et al.,* 1994; TAYLOR *et al.,* 2004). O segundo aumento do estradiol ocorre durante a estação de corte, pois este hormônio pode estimular a atratividade e receptividade de fêmeas de répteis (RHEN & CREWS, 2000).

No presente trabalho, podemos observar que as concentrações plasmáticas de estradiol nas fêmeas de *S. annulatus* tendem a aumentar no outono e inverno, o que correlacionaria ao período em que a vitelogênese parece ocorrer. Segundo Exbrayat (2006), antes do período reprodutivo nas cecílias, os oócitos vitelogênicos estão

altamente numerosos e as células granulosas se tornam altamente volumosas. Neste período, os hormônios estrogênicos foram detectados nas células foliculares. É possível que as concentrações de estrógeno e progesterona nesta fase alcancem seus picos permitindo a ovulação. Contudo, devido ao elevado erro padrão destes resultados, as concentrações de estradiol não apresentaram diferença estatística significativa, e esta concentração heterogênea nos animais pode estar relacionada à condição de confinamento. Além disso, as concentrações de progesterona se apresentaram inalteradas durante o inverno, período em que encontramos as fêmeas vitelogênicas e, neste caso, era esperado que a concentração deste progestágeno estivesse elevada, estimulando a ovulação. Trabalhos realizados com *Rana sculenta* demonstraram que após 24 horas de confinamento as concentrações de estradiol diminuíram significativamente nesses animais (ZERANI *et al.,* 1991), bem como a de progesterona (PAOLUCCI *et al.,* 1990).

Mesmo sem resultar em diferença significativa, os machos tendem a apresentar maiores concentrações plasmáticas de testosterona durante a primavera quando comparados aos animais coletados no inverno. Dado este muito curioso, pois este foi o período em que encontramos animais regredidos e quiescentes. Comparações feitas entre o tecido intersticial e as variações correlacionadas ao ciclo sexual de Gymnophiona sugerem que a regulação endócrina da reprodução dos machos esteja relacionada à produção de testosterona (EXBRAYAT, 2006). Mais uma vez, estas informações indicam uma desrregulação hormonal do processo reprodutivo desses animais que parece ser decorrente da condição de cativeiro. Além disso, em machos a progesterona pode estar envolvida no processo de espermiação (NORRIS, 2007), então seria esperado também que este hormônio estivesse alto no inverno, quando observamos os machos em uma espermatogênese ativa e com espermatozóides já maduros. Ao contrário disso, concentrações altas de progesterona plasmáticas foram vistas durante a primavera.

Assim como para outros vertebrados, o ciclo reprodutivo de fêmeas e machos de cecílias é fortemente correlacionado aos fatores externos que são transduzidos a sinais hormonais que controlam o desenvolvimento dos órgãos genitais. Tanto em machos quanto em fêmeas, é possível encontrar a função endócrina das gônadas influenciando no comportamento reprodutivo, gametogênese e desenvolvimento de órgãos reprodutivos e de reserva (EXBRAYAT, 2006). Devido à condição de cativeiro, os fatores externos parecem não estar sendo perceptíveis o suficiente para que os animais

apresentem um ciclo reprodutivo sazonal normalmente encontrado no ambiente natural, com as correlações entre hormônios, mobilização de reservas e desenvolvimento gonadal ideais para cada período do ciclo reprodutivo, principalmente na fase de maturação final e liberação dos gametas.

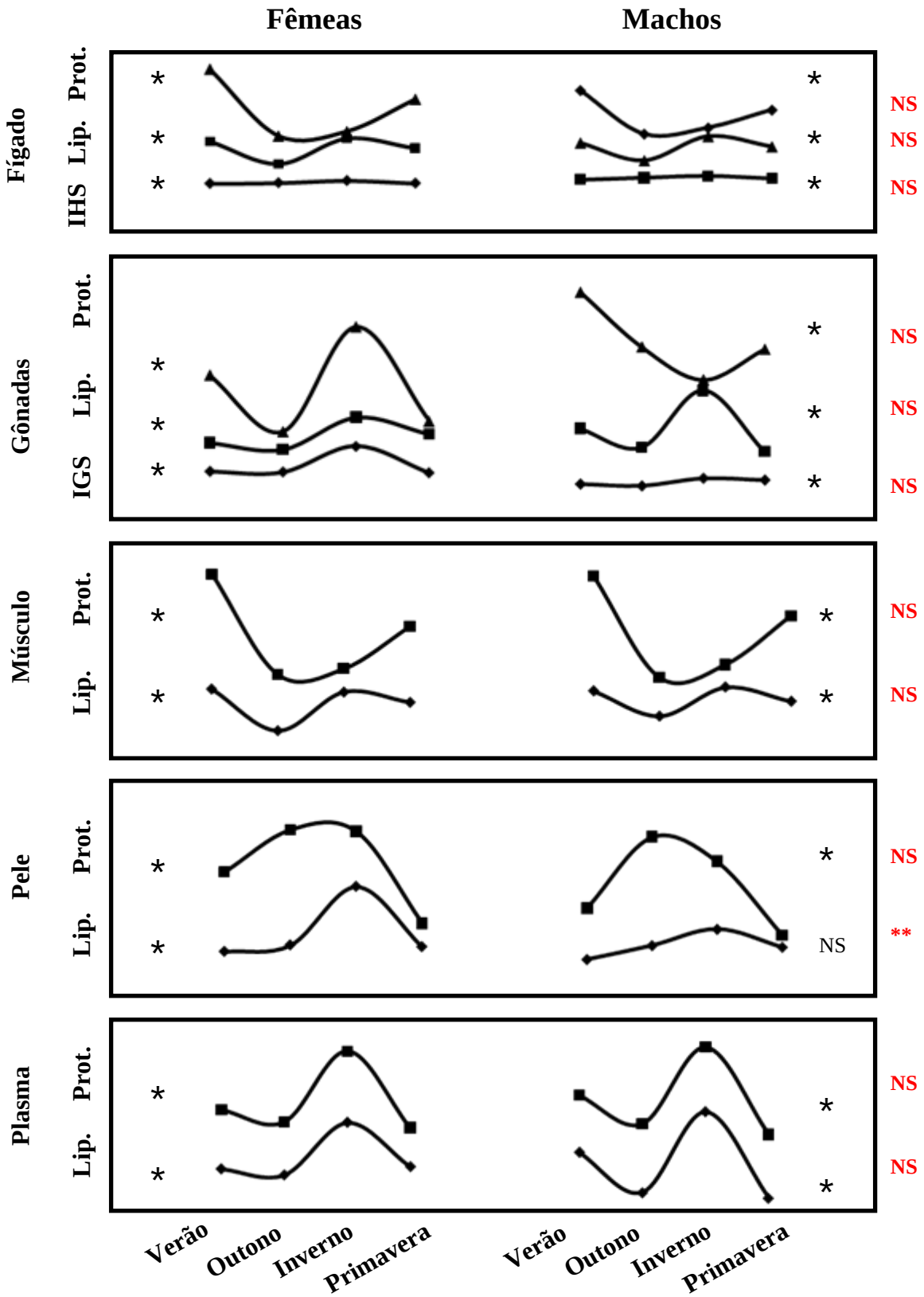


Figura 25: Representação esquemática do metabolismo de lipídios e proteínas teciduais e plasmáticos em fêmeas e machos de *S. annulatus* ao longo do ciclo reprodutivo. * dentro do quadro indica diferença estatística significativa para fêmeas (lado esquerdo) e para os machos (lado direito) ao longo do ciclo anual. ** fora do quadro indica diferença estatística significativa entre os sexos. NS indica que não houve diferença estatística significativa.

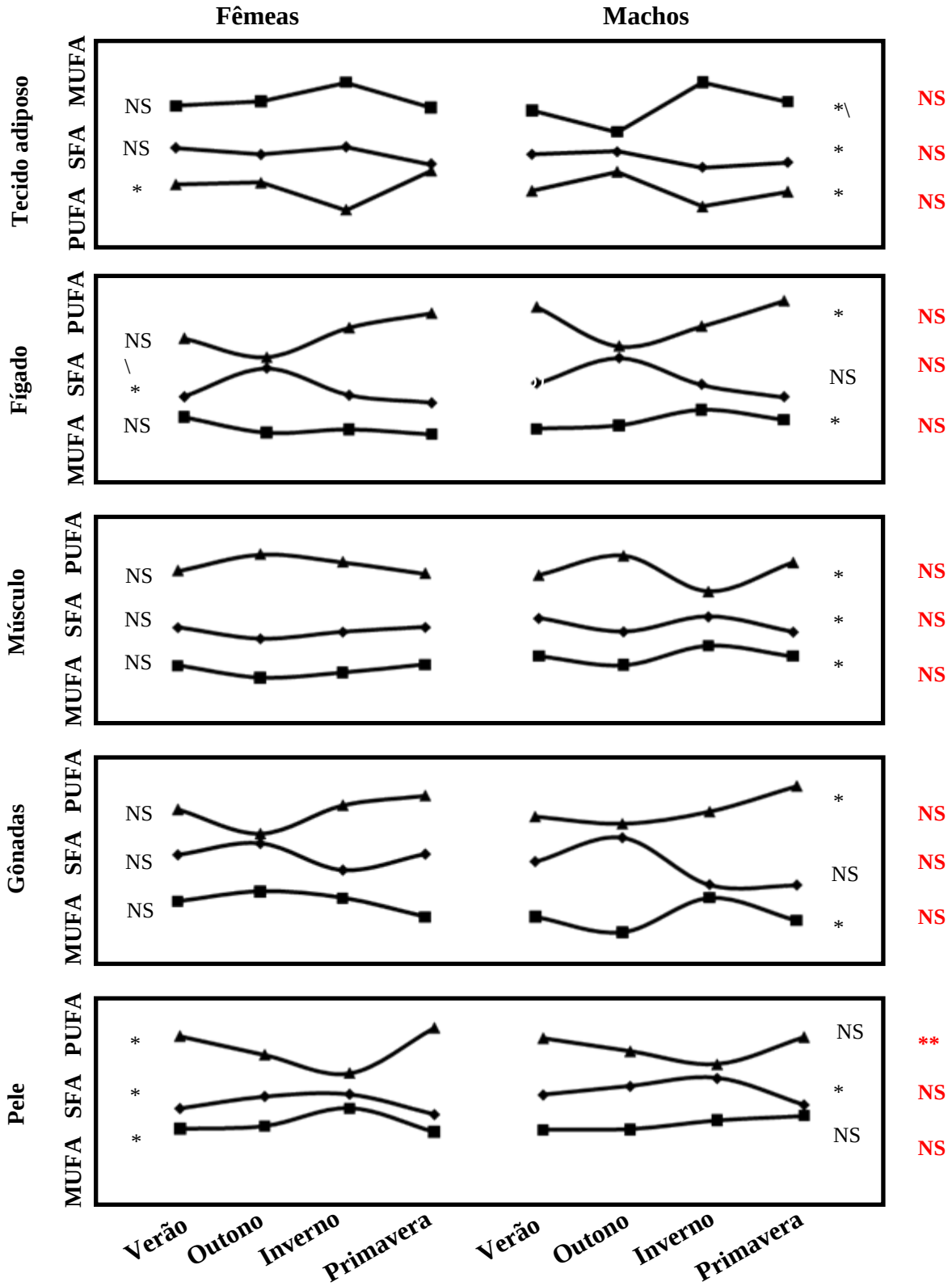


Figura 26: Representação esquemática do perfil de ácidos graxos dos fosfolipídios teciduais e plasmáticos em fêmeas e machos de *S. annulatus* ao longo do ciclo reprodutivo. * dentro do quadro indica diferença estatística significativa para fêmeas (lado esquerdo) e para os machos (lado direito) ao longo do ciclo anual. ** fora do quadro indica diferença estatística significativa entre os sexos. NS indica que não houve diferença estatística significativa.

6. Considerações Finais

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que o avanço da maturação gonadal em fêmeas e machos de *Siphonops annulatus* foi acompanhado por alterações nos valores de IGS e IHS ao longo do ciclo anual. Essas alterações foram decorrentes da mobilização de lipídios e proteínas entre os tecidos de reserva, que suportaram tanto o desenvolvimento gonadal quanto o gasto energético desse processo. Adicionalmente, as modificações encontradas no perfil de ácidos graxos entre os tecidos, principalmente fígado, gônadas e tecido adiposo, retrataram também o preparo dos animais para a reprodução. Assim, podemos sugerir que mesmo em condições de confinamento, as fêmeas e os machos de *Siphonops annulatus* sincronizaram o período reprodutivo, estando ambos preparados para a reprodução na estação de inverno, período em que são encontrados ativos na natureza (Fig. 27). Além disso, o tecido dérmico das fêmeas coletadas na primavera apresentou altas porcentagens de PUFAs n3, demonstrando o preparo da pele para a futura alimentação da prole (Fig. 27). Deste modo, sugere-se que as cecílias dermatófagas *Siphonops annulatus* estudadas no presente trabalho apresentam uma estratégia programada no preparo do vitelo e da pele que permitem a qualidade nutricional adequada para o fornecimento desses nutrientes aos filhotes em épocas diferentes.

Contudo, durante o desenvolvimento desse trabalho, não foi possível encontrar ovos e/ou filhotes obtidos de reprodução em cativeiro. Além disso, o hormônio responsável por induzir a liberação dos gametas apresentou concentrações baixas nos animais coletados durante o inverno. Com essas informações podemos concluir que mesmo as fêmeas e os machos de *S. annulatus* estando aptos à cópula no inverno, o confinamento parece interferir, de alguma forma ainda não esclarecida, no processo final de ovulação e espermiação, inibindo de forma direta ou indireta a via endócrina responsável por esse processo.

De modo geral, o equilíbrio entre o meio interno e o ambiente é mantido nos seres vivos através de vários “sinais”, que são recebidos por canais eferentes específicos, traduzidos e respondidos de forma a sincronizar eventos buscando a manutenção da espécie. Esta ação responsiva pode ocorrer de duas maneiras genéricas: 1) reação a eventos inesperados, resposta esta reativa e de curto período e 2) reação previamente embutida no aparato genético dos grupos, sendo considerada uma resposta programada, constante, que acontece de forma preditiva durante toda a vida do animal e

elaborada evolutivamente durante a seleção de espécies mais aptas (MROSOVSKY, 1990).

De acordo com essas informações, podemos sugerir que o processo reprodutivo em *S. annulatus* mantida em cativeiro envolveu um processo de reostase programada, pois mesmo não havendo condições ambientais ideais, as fêmeas e os machos apresentaram uma “memória metabólica” capaz de prepará-los para a reprodução. No entanto, o ambiente proporcionado pelo cativeiro suprimiu a ocorrência das fases finais do ciclo reprodutivo, como ovulação e cópula, mostrando um clássico conceito de reostase reativa.

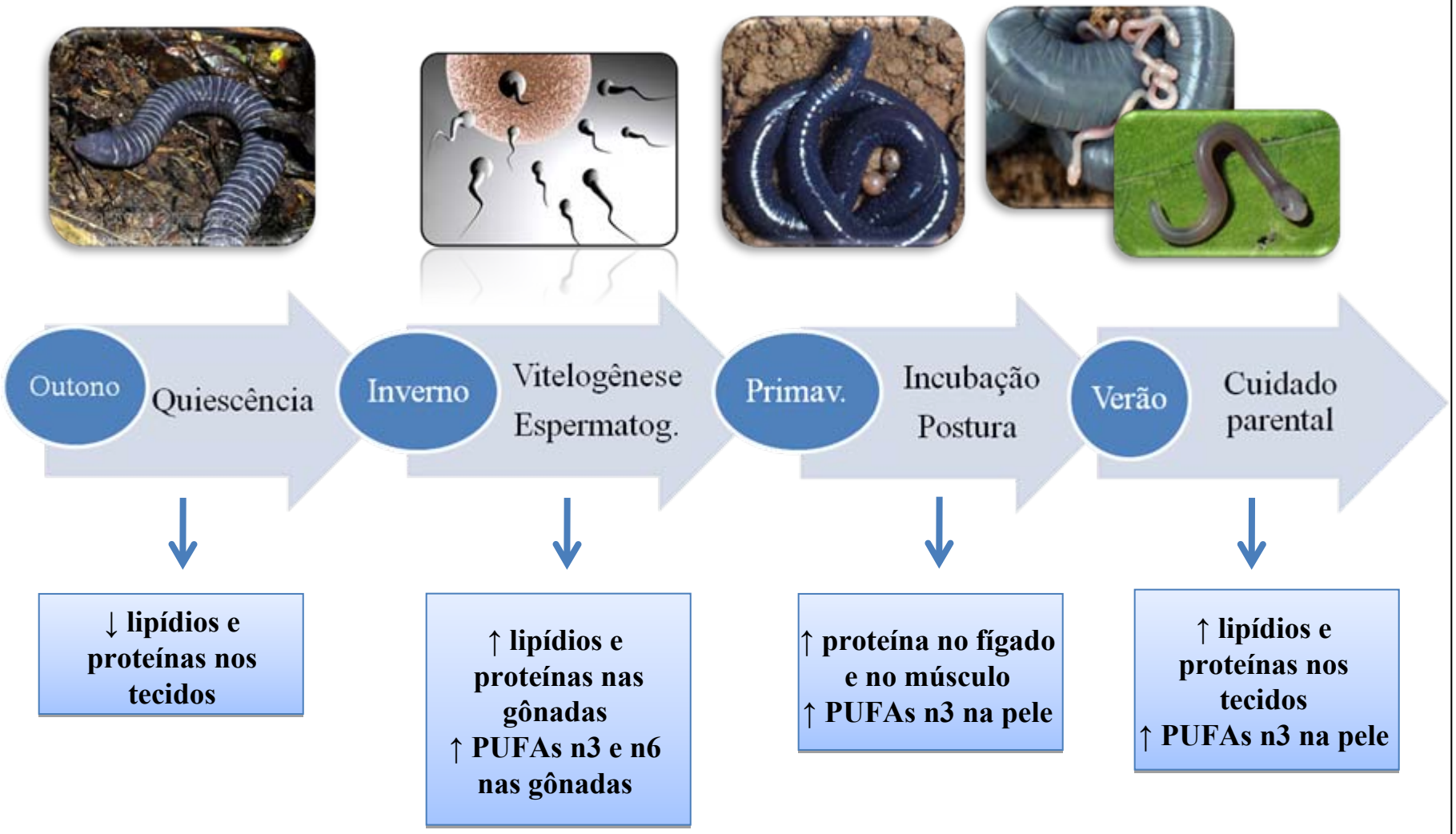


Figura 27: Esquema do ciclo reprodutivo de *Siphonops annulatus* mostrando as principais alterações dos substratos ocorridas em cada estação.

7. Referências bibliográficas

ANJUBAULT, E. & EXBRAYAT, J.M. Cycle annuel des cellules du tissu interstitial des testicules chez *Typhlonectes compressicaudus*, Amphibien Gymnophione. *Bulletin de la Société Zoologique de France,* 125:133, 2000.

ANJUBAULT, E. & EXBRAYAT, J.M. Contribution à la connaissance de l'appareil génital de *Typhlonectes compressicauda* (Duméril et Bibron, 1841), Amphibien Gymnophione. II. Croissance des gonades et maturité sexuelle des mâles. *Bulletin Mensuel de la Société Linnéenne de Lyon*, 73:393-405, 2004.

AUBRET, F.; BONNET, X.; SHINE, R. & LOURDAS, O. Fat is sexy for females but not males: the influence of body reserves on reproduction in snakes (*Vipera aspis*). *Hormone and Behavior*, 42:135-147, 2002.

BEHMER, O.A.; TOLOSA, E.M.C. & NETO, A.G.F. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. EDART, São Paulo, Livraria Editora Ltda., 239p., 1976.

BELL, M.V.; HENDERSON, R.J. & SARGENT, J.R. The role of polyunsaturated fatty acids in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 83B(4):711-719, 1986.

BELL, M.V.; DICK, J.R.; THRUSH, M. & NAVARRO, J.C. Decreased 20:4n-6/20:5n-3 ratio in sperm from cultured sea bass, *Dicentrarchus labrax,* broodstock compared with wild fish. *Aquaculture*, 144:189-199, 1996.

BEROIS, N. & DE SA, R. Histology of the ovaries and fat bodies of *Chthonerpeton indistinctum*. *Journal of Herpetology*, 22:146-151, 1988.

BEYO, R.S.; SREEJITH, P.; DIVYAL, L.; OOMMEN, O.V. & AKBARSHA, M.A. Assembly of ovarian follicles in the caecilians *Ichthyophis tricolor* and *Gegeneophis ramaswamii*: light and transmission electron microscopic study. *Zygote,* 15:199–213, 2007a.

BEYO, R.S.; SREEJITH, P.; DIVYAL, L.; OOMMEN, O.V. & AKBARSHA, M.A. Ultrastructural observations of previtellogenic ovarian follicles of the caecilians *Ichthyophis tricolor* and *Gegeneophis ramaswamii. Journal of Morphology,* 268:329–342, 2007b.

BEYO, R.S.; DIVYAL, L.; MATHEW, S.; OOMMEN, O.V. & AKBARSHA, M.A. Stages in follicle cell/oocyte interface during vitellogenesis in caecilians *Ichthyophis tricolor* and *Gegeneophis ramaswamii*: a transmission electron-microscopic study. *Cell and Tissue Research,* 331:519-528, 2008a.

BEYO, R.S.; DIVYAL, L.; OOMMEN, O.V. & AKBARSHA, M.A. Accumulation of yolk in a caecilian (*Gegeneophis ramaswamii*) oocyte: a light and transmission electron microscopic study. *Journal of Morphology,* 269:1412-1424, 2008b.

BLANCHARD, G.; DRUART, X. & KESTEMONT, P. 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*, 66:73-85, 2005.

BLÁZQUEZ, M.; BOSMA, P.T.; FRASER, E.J.; VAN LOOK, K.J.W. & TRUDEAU, V.L. Fish as models for the neuroendocrine regulation of reproduction and growth. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 119C:345-364, 1998.

BONNET, X.; NAULLEAU, G. & MAUGET, R. The influence of body condition on 17-B estradiol levels in relationship to vitellogenesis in female *Vipera aspis* (Reptilia, Viperidae). *General and Comparative Endocrinology*, 93:424-437, 1994.

CABADA, M.O.; SANCHEZ RIERA, A.N.; GENTA, H.D.; SANCHEZ, S.S. & BARISONE, G.A. Vitelline envelope formation during oogenesis in *Bufo arenarum*. *Biocell,* 20:77–86, 1996.

CALDERON, M.L.; DE PEREZ, G.R. & RAMIREZ-PINILLA, M.P. Morphology of the ovary of *Caiman crocodilus* (Crocodylia:Alligatoridae). *Annals. of. Anatomy,* 186:13–24, 2004.

CANOSA, L.F.; POZZI, A.G.; ROSEMBLIT, C. & CEBALLOS, N.R. Steroid production in toads. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology,* 85:227-233, 2003.

CARVALHO, J.E.; GOMES, F.R. & NAVAS, C.A. Energy substrate utilization during nightly vocal activity in tree species of *Scinax* (Anura, Hylidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 178B:447-456, 2008.

CANERVALI, O. & MOSCONI, G. *In vitro* induction of vitellogenin synthesis in *Rana sculenta*: role of the pituitary. *General and Comparative Endocrinology,* 86:352-358, 1992.

CHRISTIE, W.W. *Gas chromatography and lipids.* The Oily Press, Scotland, 307 p., 1992.

CHRISTIE, W.W. *Lipids Analysis*. The Oily Press, Bridgwater, UK, 2003.

COX, R.M.; BUTLER, M.A. & JOHN-ALDER, H.B. The evolution of sexual size dimorphism in reptiles. *In:* FAIRBAIRN, D.J.; BLANCKENHORN, W.U. & SZEKELY, T. (eds.). *Sex, Size and Gender Roles: evolutionary studies of sexual size dimorphism.* Oxford University Press, Oxford, pp.38-49, 2007.

CUSTODIA-LORA, N. & CALLARD, I.P. Progesterone and progesterone receptors in reptiles. *General and Comparative Endocrinology,* 127:1–7, 2002.

DAHLEA, R.; TARANGERB, G.L.; KARLSENA, O.; KJESBUC, O.S. & NORBERGA, B. Gonadal development and associated changes in liver size and sexual steroids during the reproductive cycle of captive male and female Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology,* 136A:641–653, 2003.

DAVIS, L.K.; HIRAMATSU, N.; HIRAMATSU, K.; READING, B.J.; MATSUBARA, T.; HARA, A.; SULLIVAN, C.V.; PIERCE, A.L.; HIRANO, T. & GRAU, E.G. Induction of three vitellogenins by 17β-estradiol with concurrent inhibition of the growth hormone-insulin-like growth factor-I axis in a euryhaline teleost, the tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Biology of Reproduction,* 77:614–625, 2007.

DE OLIVEIRA, C. & SANTOS, L.R.S. Histological characterization of cellular types during *Scinax fuscivarius* oogenesis (Lutz) (Anura, Hylidae). *Revista Brasileira de Zoologia,* 21(4):919-923, 2004.

DEDUAL, M. & PANKURST, N.W. Plasm steroid hormone concentrations in relation to the reproductive cycle of the sweep *Scorpus lineolatus* caught from the wild. *Australian Journal of Marine & Freshwater Research,* 43:753-763, 1992.

DELÊTRE, M. & MEASEY, G.J. Sexual selection vs ecological causation in a sexually dimorphic caecilian, *Schistometopum thomense* (Amphibia, Gymnophiona, Caeciliidae). *Ethology, Ecology & Evolution,* 16:243-253, 2004.

DERICKSON, W.K. Lipid storage and utilization in reptiles. *American Zoology*, 16: 711-723, 1976.

DHILLON, J.K.; SU, X. & LIU, Z. Effects of RU486 on cyclooxygenase-2 gene expression, prostaglandin F2α synthesis and ovulation in *Xenopus laevis. General and Comparative Endocrinology,* 165:78-82, 2010.

DUELLMAN, W.E. & TRUEB L. *Biology of amphibians*. McGraw-Hill, Baltimore, London, 1994.

DUMONT, J.N. & BRUMMET, A.R. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). V. Relationships between developing oocytes and their developing follicular tissues. *Journal of Morphology,* 155:73–98, 1978.

DUPLUS, E.; GLORIAN, M. & FOREST, C. Fatty acid regulation of gene transcription. *Journal of Biology Chemistry*, 275:30749-30752, 2000.

EBERSOLE, T.J. & Boyd, S. Immunocytochemical localization of gonadotropin releasing hormones in the brain of a viviparous Caecilian Amphibian, *Typhlonectes natans* (Amphibia: Gymnophiona). *Brain Behavior Evolution,* 55:14-25, 2000.

EBERSOLE, T. J.; GOETZ, F.W. & BOYD, S.K. Gonadal steroid production in the viviparous caecilian amphibian *Typhlonectes natans. American Zoologist*, 38:21A, 1998.

EL-SAYED, M.M.; EZZAT, A.A.; KANDEEL, K.M. & SHABAN, F.A. Biochemical studies on the lipid content of *Oreochromis nilotica* and *Sparus auratus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 79B(4):589-594, 1984.

EOM, J.; JUNG, Y.R. & PARK, D. F-series prostaglandin function as sex pheromones in the Korean salamander, *Hynobius leechii. Comparative Biochemistry and Physilogy,* 154A:61-69, 2009.

EXBRAYAT, J.M. Premiéres observations sur le cycle annuel de l'ovaire de *Typhlonectes compressicaudus* (Duméril et Bribron, 1841), Amphibien Apode. *Comptes Rendus des Séances de l'Académie des Sciences de Paris*, 296:493-498, 1983.

EXBRAYAT, J.M. Cycle des canaux de Müller chez le mâle adulte de *Typhlonectes compressicaudus* (Duméril et Bibron, 1841), Amphibien Apode. *Comptes Rendus des Séances de l'Académie des Sciences de Paris*, 301:507-512, 1985.

EXBRAYAT, J.M. Le testicule de *Typhlonectes compressicaudus*: Structure, ultrastructure, croissance et cycle de reproduction. *Mémoires de la Société Zoologique de France,* 43:121-132, 1986.

EXBRAYAT, J.M. Variations pondérales des organes de reserve (corpus adipeux et foie) chez *Typhlonectes compressicaudus*, Amphibien Apode vivipare au cours des alternances saisonniéres et des cycles de reproduction. *Annales des Sciences Naturalles, Zoologie*, 13éme série, 9:45-53, 1988.

EXBRAYAT, J.M. Appareils génitaux et reproduction chez les Amphibiens Gymnophiones. *Bulletin de la Société Zoologique de France*, 117:291-296, 1992.

EXBRAYAT, J.M. Oogenesis and Folliculogenesis. *In*: EXBRAYAT, J. M. (ed.). *Reproductive biology and phylogeny of gymnophiona (Caecilians),* Vol. 5. Science Publishers, New Hampshire, pp. 275-290, 2006.

EXBRAYAT, J.M. & SENTIS, P. Homogeneite du testicule et cycle annual chez *Typhlonectes compressicuadus. Academic Science of Paris*, 292:417-420. 1982.

EXBRAYAT, J.M. & COLLENOT, G. Quelques aspects de l'évolution de l'ovaire de *Typhlonectes compressicaudus* (Duméril et Bibron, 1841), Batracien Apode vivipare. Etude quantitative et histochimique des corps jaunes. *Reproduction Nutrition Development*., 23:889-898, 1983.

EXBRAYAT, J.M. & DELSOL, M. Reproduction and growth of *Typhlonectes compressicaudus*, a viviparous Gymnophione. *Copeia*, 1985:950-955, 1985.

EXBRAYAT, J.M. & LAURENT, M.T.. Quelques observations sur la reproduction en élevage de *Typhlonectes compressicaudus*, Amphibien Apode vivipare. Possibilité de rythmes endogènes. *Bulletin de la Société Herpétologique de France*, 40:52-62, 1986.

EXBRAYAT, J.M. & DANSARD, C. Ultrastructure des cellules de Sertoli chez *Typhlonectes compressicaudus*, Amphibien *Gymnophione. Bulletin de la Société Zoologique de France*, 117:166-167, 1992.

EXBRAYAT, J.M. & DANSARD, C. An ultrastructural study of the evolution of Sertoli cells in a Gymnophionan Amphibia. *Biology of the Cell,* 79: 90, 1993.

EXBRAYAT, J.M. & DANSARD, C. Apports de techniques complémentaires à la connaissance de l'histologie du testicule d'un Amphibien Gymnophione. *Revue Française d'Histotechnologie*, 7:19-26, 1994.

EXBRAYAT, J.M. & ESTABEL, J. Anatomy with particular reference to the reproductive system. *In*: EXBRAYAT, J. M. (ed.). *Reproductive biology and phylogeny of gymnophiona (Caecilians),* Vol. 5. Science Publishers, New Hampshire, pp. 275-290, 2006.

FAIRBAIRN, D.J. Introduction: the enigma of sexual size dimorphism. *In:* FAIRBAIRN, D.J.; BLANCKENHORN, W.U. & SZEKELY, T. (eds.). *Sex, Size and Gender Roles: evolutionary studies of sexual size dimorphism.* Oxford University Press, Oxford, pp.1-12, 2007.

FOLCH, J.; LESS, M. & STANLEY, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226:497-503, 1957.

FORTUNE, J.E. Steroid production by *Xenopus* ovarian follicules at different developmental stages. *Developmental of Biology*, 99:502–509, 1983.

FRINGS, C.S.; FENDLY, T.W.; DUNN, R.T. & QUENN, C.A. Improved determination of total lipids by the sulpho-phospho-vanilin reaction. *Clinical Chemistry*, 18:673-674, 1972.

FROST, D.R. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.3 (12 February, 2009). Eletronic Database accessible at http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/American Museum of Natural history. New York, USA.

GALLIEN, L. Endocrine basis for reproductive adaptations in amphibia, *In:* GORBMAN, A. (ed). *Comparative Endocrinology.* New York, Wiley, pp. 479-487, 1959.

GANS, C. Tetrapod limblessness: evolution and functional corollaries. *American Zoologist,* 15:455–67, 1975.

GAZOLA, R.; BORELLA, M.I.; DONALDSON, E.M.; VAL-SELLA, M.V.; SUKUMASAWIN, N.; FAVA-DE-MORAES, F. & BERNARDINO, G. Plasma steroid and corticisteroid levels in female pacu Piaractus mesopotamicus. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 29(5):659-664, 1996.

GOWER, D.J. & WILKNSON, M. Caecilians (Gymnophiona). *In:* HEDGES, S.B. & KUMAR, S. (eds). *The Timetree of Life.* Oxford University Press, pp. 369-372, 2009.

GRAFE, T.U.; SCHMUK, R. & LINSENMAIR, K.E. Reproductive energetic of the African reed frogs, *Hyperolius viridiflavus* and *Hyperolius marmoratus. Physiology and Zoology,* 65:153-171, 1992.

GUILLETTE, Jr.L.J.; WOODWARD, A.R.; CRAIN, D.A.; MASSON, G.R.; PALMER, B.D.; COX, M.C.; YOU-XIANG, Q. & ORLANDO, E.F. The reproductive cycle of the female American Alligator (*Alligator mississippiensis*). *General and Comparative Endocrinology*, 108:87–101, 1997.

GURR, M.I. & HARWOOD, J.L. *Lipid biochemisty: An introdution.* 4 ed. London: Chapman & Hall, 406 p., 1991.

HENDERSON, R.J.; TILLMANS, M.M. & SARGENT J. R. The lipid composition of two species of Serrasalmid fish in relation to dietary polyunsaturated fatty acids. *Journal of Fish Biology*, 48:522-538, 1996.

HEYER, R.W. Ecological interactions of frog larvae at a seasonal tropical location in Thailand. *Journal of Herpetology,* 7:337-361, 1973.

HICKMAN, C.P.; ROBERTS, L.S. & LARSON, A. *Princípios integrais de Zoologia*. Rio de Janeiro, 847p., 2004.

HIMSTEDT, W. Die Blindwühlen. Neue Brehm Bücherei Bd. 630. Magdeburg:Westarp, 1996.

HO, S.M.; KLEIS, S.; MCPHERSON, R.; HEISERMANN, J. & CALLARD, I.P. Regulation of vitellogenesis in reptiles. *Herpetologica,* 38:40–50, 1982.

HUANG, C.; LIANG, M. & KAM, Y. The fatty acid composition of oophagous tadpoles (*Chirixalus eiffingei*) fed conspecific or chicken egg yolk. *Comparative Biochemistry and Physiology,* 135B:329-336, 2003.

HULBERT, A.J. & ELSE, P.L. Mechanisms underlying the cost of living in animals. *Annual Review of Physiology,* 62:207–235, 2000.

ITOH, M. & ISHII, S. Changes in plasma levels of gonadotropins and sex steroids in the toad, *Bufo japonicus*, in association with behavior during the breeding season. *General and Comparative Endocrinology,* 80:451–464, 1990.

IZQUIERDO, M.S.; FERNÁNDEZ-PALACIOS, H. & TACON, A.G.J. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture*, 197:25-4, 2001.

JALABERT, B. Particularities of reproduction and oogenesis in teleost fish compared to mammals. *Reproduction Nutricional and DevelopmenT,* 45:261-279, 2005.

JARED, C. & ANTONIAZZI, M.M. A contribution to the natural history of *Siphonops annulatus* (Amphibia, Gymnophiona, Caeciliidae). 5th. World Congress of Herpetology, 2005.

JARED, C.; NAVAS, C.A. & TOLEDO, R.C. An appreciation of the physiology and morphology of the Caecilians (Amphibian: Gymnophiona). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 123:313-328, 1999.

JOHNSON, L.L.; CASILLAS, E.; MYERS, M.S.; RHODES, L.D. & OLSON, O.P. Patterns of oocyte development and related changes in plasm 17β-estradiol, vitellogenin, and plasma chemistry in English sole *Parophrys vetulus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology,* 152:161-185, 1991.

JORGENSEN, C.B. Growth and reproduction. *In*: FEDER, M.E. & BURGREN, W.W. (eds). *Environmental physiology of the amphibians*. University of Chicago Press, Chicago, pp. 439-466, 1992.

JUNQUEIRA**,** L.C.U. & CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 10ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2004.

JUNQUEIRA, L.C.U.; JARED, C. & ANTONIAZZI, M.M. Structure of the caecilian *Siphonops annulatus* (Amphibian, Gymnophiona): general aspect of the body, disposition of the organs and structure of the mouth, oesophagus and stomach. *Acta Zoologica*, 80:75-84, 1999.

KELSO, K.A.; CEROLINI, S.; NOBLE, R.C.; SPARKS, N.H.C. & SPEAKE, B.K. The effects of dietary supplementation with docosahexaenoic acid on the phospholipid fatty acids composition of avian spermatozoa. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 118B:65-69, 1997.

KUPFER, A. Sexual size dimorphism in caecilian amphibians: analysis, review and directions for future research. *Zoology*, 112:362-369, 2009.

KUPFER, A.; NABHITABHATA, J. & HIMSTEDT, W. Reproductive ecology of female caecilian amphibians (genus *Ichthyophis*): a baseline study. *Biological Journal of the Linnean Society*, 83:207-217, 2004.

KUPFER, A.; KRAMER, A.; HIMSTEDT, W. & GREVEN, H. Copulation and egg retention in an oviparous caecilian. *Zoologischer Anzeiger*, 244:223-228, 2006a.

KUPFER, A.; MÜLLER, H.; ANTONIAZZI, M.A.; JARED, C.; GREVEN, H.; NUSSBAUM, R.A. & WILKINSON, M. Parental investment by skin feeding in a caecilian amphibian. *Nature*, 440:926-929, 2006b.

KWON, H.B. & AHN, R.S. Relative roles of theca and granulose cells in ovarian follicular steroidogenesis in the amphibian, *Rana nigromaculata*. *General and Comparative Endocrinology*, 94:207–214, 1994.

KWON, H.B.; CHOI, H.; AHN, R.S. & YOON, Y.D. Steroid production by amphibian (*Rana nigromaculata*) ovarian follicules at different developmental stages. *Journal of Experimental Zoology,* 260:66–73, 1991.

LACY, E.L.; SHERIDAN, M.A. & MOORE, M.C. Sex differences in lipid metabolism during reproduction in free-living tree lizards (*Urosaurus ornatus*). *General and Comparative Endocrinology,* 128:180-192, 2002.

LAM, T.K.T.; SCHWARTZ, G.J. & ROSSETI, L. Hypothalamic sensing of fatty acids. *Nature neuroscience,* 8(5):579-584, 2005.

LICHT, P. & PORTER, D.A. Role of gonadotropin-releasing hormone in regulation of gonadotropin secretion from amphibian and reptilian pituitaries. *In:* NORRIS, D.O. & JONES, R.E. (eds.), *Hormones and Reproduction in Fishes, Amphibians, and Reptiles*. Plenum Press, New York, pp. 61–85, 1987.

LIND, C.M.; HUSAK, J.F.; EIKENAAR, C.; MOORE, I.T. & TAYLOR, E.N. The relationship between plasma steroid hormone concentrations and the reproductive cycle in the Northern Pacific rattlesnake, *Crotalus oreganus. General and Comparative Endocrinology*, doi:10.1016/j.ygcen.2010.01.026, 2010.

LOFT, B. Reproduction. *In:* LOFT, B. (ed). *Physiology of the amphibia*, vol.II. Academic Press, New York, London, 1974.

LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry,* 193:265-275, 1951.

MAHMOUD, I.Y.; BA-OMAR, T. & ALKINDI, A. Partial development of the steroidogenic ultra structural features in degenerative corpora lutea after a single injection of pituitary extract in the Western painted turtle (*Chrysemys picta*). *Tissue Cell,* 38:171–176, 2006.

MARINA, P.; SALVATORE, V.; MAURIZIO, R.; LOREDANA, R.; ANNAMARIA, L.; VINCENZA, L.; ERMELINDA, L. & PIERO, A. Ovarian follicle cells in *Torpedo marmorata* synthesize vitellogenin. *Molecular Reproduction and Development,* 67:424–429, 2004.

MASOOD-PARVEEZ, U. Some aspects of reproduction in the female Apodan Amphibian *Ichthyophis*. PhD., Karnatak University, Dharwad, India, 1987.

MASOOD-PARVEEZ, U. & NADKARNI, V.B. The ovarian cycle in an oviparous gymnophione amphibian, *Ichthyophis beddomei* (Peters). *Journal of Herpetology*, 27:59-63, 1993.

MEASEY, J.G.; SMITA, M.; BEYO, R.S. & OOMMEN, O.V. Year-round activity in an oviparous subterranean caecilian *Boulegerula taitanus* (Amphibia, Gymnophiona, Caeciilidae). *Tropical Zoology,* 21:109-122, 2008.

MEDINA, M.F.; RAMOS, I.; CRESPO, C.A.; GONÇALEZ-CALVAR, S. & FERNANDEZ, S. Changes in serum sex steroid levels throughout the reproductive cycle of Bufo arenarum females. *General and Comparative Endocrinology,* 136:143-151, 2004.

MERAYO, C.R. Seasonal changes in the biochemical composition of the muscle and liver of bib *(Trisopterus luscus* L.) from the Catabrian Sea (N Spain). *Science Marine,* 60(4):489-495, 1996.

MERCURE, F. & VAN DER KRAAK, G. Inhibition of gonadotropin-stimulated ovarian steroid production by polyunsaturated fatty acids in teleost fish. *Lipids*, 30:547–554, 1995.

MILLIGAN, C.L. & GIRARD , S.S. Lactate metabolism in rainbow trout.. *Journal of Experimental Biology*, 180:175-193, 1993.

MIRANDA, L.A.; PAZ, D.A.; AFFANNI, J.M. & SOMOZA, G.M. Identification and neuroanatomical distribution of immunoreactivity for mammalian gonadotropin-releasing hormone (mGnRH) in the brain and neural hypophyseal lobe of the toad *Bufo arenarum. Cell and Tissue Research,* 293:419–425, 1998.

MOREIRA, R.G.; VENTURIERI, R.L.L. & Mimura, O.M. Lipid and protein alteration in the liver and plasma of the migratory teleost *Salminus brasiliensis* during the reproductive cycle. *Journal of Aquatic Tropical,* 17(3):209-219, 2002.

MORTON, M.L. Seasonal changes in total body lipid and liver weight in the yosemite toad. *Copeia,* 1:234-238, 1981.

MROSOVSKY, N. *Rheostasis: The Physiology of Change.* Oxford University Press, Oxford, 1990.

NELSON, D.L. & COX, M.M. *Lehninger: Principles of biochemistry*. Freeman, New York, EUA, 1119 p., 2005.

NOBLE, G. K. *The Biology of the Amphibia*. McGraw-Hill, New York, 1931.

NOR ALIZA, A.R.; BEDICK, J.C.; RANA, R.L.; TUNAZ, H.; HOBACK, W.W. & STANLEY, D.W.. Arachidonic and eicosapentaenoic acids in tissues of the firefly, *Photinus pyralis* (Insecta: Coleoptera). *Comparative Biochemistry and Physiology,* 128A:251–257, 2001.

NORRIS, D.O. *Vertebrate Endocrinology.* Academic Press, San Diego, CA, 2007.

NUSSBAUM, R.A. Systematics of caecilians (Amphibia, Gymnophiona) of the family Scolecomorphidae. *Occasional Papers of the Museum of Zoology University of Michigan*, 713:1-49, 1985.

OLIVEIRA, C. & VICENTINI, C.A. Descrição anatômica dos testículos e corpos adiposos de *Scinax fuscovarius* (Anura, Hylidae). *Biociências,* 6(1):79-88, 1998.

OLSEN, Y. Lipids and essential fatty acids in aquatic food webs: what can freshwater ecologist learn from mariculture?. *In*: ARTS, M.T. & WAINMAN, B.C. (eds.). *Lipids in freshwater ecosystems*. Springer (Publ.), New York, EUA, pp.161-202, 1999.

OPRESKO L. & WILEY, H.S. Receptor-mediated endocytosis in *Xenopus* oocytes. Evidence for two novel mechanisms of hormonal regulation. The *Journal Biological of Chemistry,* 262:4116–4123, 1987.

OTT, J.A.; MENDONÇA, M.T.; GUYER, C. & MICHENER, W.K. Seasonal changes in sex and adrenal steroid hormones of gopher tortoises (*Gopherus polyphemus*). *General and Comparative Endocrinology,* 117:299–312, 2000.

PANCHARATNA, M. & SAIDAPUR, S.K. Ovarian cycle in the frog *Rana cyanophlyctis*: a quantitative study of follicular kinetics in relation to body mass, oviduct and fat body cycles. *Journal of Morphology,* 186:136-147, 1985.

PANIAGUA, R.; FRAILE, B. & SAEZ, F.J. Effects of photoperiod and temperature on testicular functions in amphibians. *Histology and Histopathology,* 5:365-378, 1990.

PAOLUCCI, M.; ESPOSITO, V.; DI FIORE, M.M. & BOTTE, V. Effects of short postcapture confinement on plasma in *Rana escultenta* during the sexual cycle. *Zootecnia,* 57:253-259, 1990.

PASANEN, S. & KOSKELA, P. Seasonal and age variation in the metabolism of the common frog *Rana temporaria* in northern Finland. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 47A:37-340, 1974.

PATINO, R.; YOSHIZAKI, G.; THOMAS, P. & KAGAWA, H. Gonadotrophic control of ovarian follicular maturation: the two-step concept and its mechanisms. *Comparative Biochemistry and Physiology,* 129:427–39, 2001.

PENHOS, J.C. Rôle des corpus adipeux du *Bufo arenarum*. *Comptes rendus de La Société de Biologie*, 47:1095-1096, 1953.

PÉREZ, M.J.; RODRÍGUEZ, C.; CÉJAS, J.R.; MARTINS, M.V.; JEREZ, S. & LORENZO, A. Lipid and fatty acid content in wild White seabream (*Diplodus sargus*) broodstock at different stages of the reproductive cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 146B:187-196, 2007.

POUGH, F.H.; JANIS, C.M & HEISER, J.B. *A vida dos vertebrados*. São Paulo. Atheneu, 699p., 2003.

POUGH, F.H.; ANDREWS, R.M.; CADLE, J.E.; CRUMP, M.L.; SAVITZKY, A.H. & WELLS, K.D. *Herpetology*. New Jersey. Prentice Hall, 577p., 1998.

RADDER, R.S.; SHANBHAG, B.A. & SAIDAPUR, S.K. Pattern of sex steroid hormone levels during reproductive cycles of male and female tropical lizard, *Calotes versicolor*. *General and Comparative Endocrinology,* 124:285–292, 2001.

RASTOGI, R.K.; MEYER, D.L.; PINELLI, C.; FIORENTINO, M. & DANIELLO, B. Comparative analysis of GnRH neuronal systems in the amphibian brain. *General and Comporative Endocrinology*, 112:330–345, 1998.

RHEN, T. & CREWS, D. Organization and activation of sexual and agonistic behavior in the leopard gecko, *Eublepharis macularius. Neuroendocrinology*, 71:252–261, 2000.

RHEN, T.; SAKATA, J. T.; ZELLER, M. & CREWS, D. Sex steroid levels across the reproductive cycle of female leopard geckos, *Eublepharis macularius,* from different incubation temperatures. *General and Comparative Endocrinology,* 118:322–331, 2000.

RIZZO, A.M.; GORNATI, R.; ROSSI, G.; BERNARDINI, G. & BERRA, B. Effect of maternal diet on the distribution of phospholipids and their fatty acid composition in *Xenopus laevis* embryos. *Journal of Nutritional Biochemistyry,* 10:44-48, 1999.

ROCA, A.; MAURICE, B.; BRAU, J.; MAUGET, C. & CAMBAR, R. Etude des lipides de corpus adipeux de *Rana esculenta*. *Comptes Rendus des Séances de l'Académie des Sciences de Paris*, 270:1278-1281, 1970.

RUSSELL, L.D.; ETTLIN, R.A.; HIKIM, A.P.S. & CLEGG, E.D. Mammalian spermatogenesesis. *In:* RUSSELL, L.D.; ETTLIN, R.A.; HIKIM, A.P.S. & CLEGG, E.D. (eds.). *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. Clearwater: Cache River Press, pp. 1-40, 1990.

RYAN, M.J.; BARTHOLOMEW, G.A. & RAND, A.S. Energetics of reproduction in a Neotropical frog, *Physalaemus pustulosus. Ecology,* 64:1456-1462, 1983.

SAIDAPUR, S.K. Reproductive cycles of amphibians. *In:* SAIDAPUR, S.K (ed.). *The Reproductive Cycles of Indian Vertebrates*, New Delhi, Allied Publishers. pp. 166–224, 1989.

SANCHEZ, S. & VILLECCO, E.I. Oogenesis. *In:* JAMIESON, B.G.M (ed). *Biology and Phylogeny of Anura*, Vol. 2, Enfield, New Hampshire: Science, pp.27-71, 2003.

SANTOS, L.R.S. & OLIVEIRA, C. Histological aspects and structural characteristics of the testes of *Dendropsophus minutus* (Anura, Hylidae). *Micron*, 39:1266-1270, 2008.

SANTOS, X. & LLORENTE, G.A. Lipid dynamics in the viperine sanke, *Natriz maura,* from the Ebro Delta. *Oikos*, 105:132-104, 2004.

SARASIN, P. & SARASIN, F. Ergebnisse naturwissenschaftlicher Forschungen auf Ceylon in den Jahren 1884-1886. Band II: Zur Entwicklungsgeschichte und Anatomie der ceylonesischen Blindwuhle *Ichthyophis glutinosus* L. Wiesbaden: C. W. Kreidel Verlag, 1887-1890.

SARGENT, J.R. Origins and functions of egg lipids: nutritional implications. *In:* BROMAGE, N.R. & ROBERTS, R.J. (eds.) *Brodstock management and egg and larval quality*. *1°ed.* Blackwell Sciences Ltd, Oxford, pp.353-372, 1995.

SARGENT, J.R.; TOCHER, D.R. & BELL, J.G. The lipids. *In*: HALVER, J.E. & HARDY, R.W. (eds.). *Fish Nutrition*, 3rd ed., Academic Press, San Diego,VA, USA, pp.181-257, 2002.

SAWAYA, P. Sobre o veneno das glândulas cutâneas, a secreção e o coração de *Siphonops annulatus. Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências, Letras, Zoologia,* 4:207-270, 1940.

SAYER, M.D.; GIBSON, R.R. & ATKINSON, R.J.A. Growth, diet and condition of goldsinny on the west coast of Scotland. *Journal of Fish Biology*, 46:317-340, 1995.

SCHENEIDER, J.E. Energy balance and reproduction. *Physioloy & Behavior*, 81:289-317, 2004.

SCOTT, D.E.; FISCHER, R.U.; CONGDON, J.D. & BUSA, S.A. Whole body lipid dynamics and reproduction in the eastern cottonmouth *Agkistrodon piscivorus*. *Herpetologica,* 51:472-487, 1995.

SESHACHAR, B.R. The spermatogenesis of *Ichthyophis glutinosus* (Linn). II. The meiotic divisions. *Z. Zellforsch Mirk anatomie*, 27:33-158, 1936.

SESHACHAR, B.R.; BALAKRISHNA, T.A.; SHAKUNTALA, K. & GUNDAPPA, K.R. Some unique feature of egg laying and reproduction in *Ichthyophis malabarensis* (Taylor) (Apoda; Amphibia). *Current Science,* 51:32-34, 1982.

SEYMOUR, R.S. Energy metabolism of dormant spadefoot toads (*Scaphiopus). Copeia,* 1973:435-445, 1973.

SHERIDAN, M.A. Lipids dynamics in fish: aspects of absorption, transportation, deposition and mobilization. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 90B(4):679-690, 1988.

SHERIDAN, M.A. Regulation of lipid metabolism in poikilothermic vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 107:495-508, 1994.

SHINE, R. Sexual size dimorphism in snakes revisited. *Copeia,* 1994:326-346, 1994.

SMITA, M.; JANCY, M.G.; AKBARSHA, M.A. & OOMMEN, O.V. Ameboid cells in spermatogenic cysts of caecilian testis. *Journal of Morphology*, 263:340-355, 2003.

SMITA, M.; OOMMEN, O.V.; JANCY, M.G. & AKBARSHA, M.A. Stages in spermatogenesis of two species of caecilians, *Ichthyophis tricolor* and *Uraeotyphlus cf. narayani* (Amphibia: Gymnophiona): light and electron microscopic study. *Journal of Morphology,* 261:92-104, 2004.

SMITA, M.; OOMMEN, O.V.; GEORGE, J.M. & AKBARSHA, M.A. Sertoli cells in the testis of caecilians *Ichthyophis tricolor* e *Uraeotyphlus narayani* (Amphibia: Gymnophiona): light and electron microscopic perspective. *Journal of Morphology*, 258:317-326, 2005.

SMITA, M.; JANCY, M.G.; AKBARSHA, M.A.; OOMMEN, O.V. & EXBRAYAT, J.M. Caecilian Spermatogenesis. *In:* EXBRAYAT, J.M. (ed.). *Reproductive biology and phylogeny of Gymnophiona (Caecilians)* vol.5, Science Publisher, New Hampshire, pp. 231-246, 2006.

SMITH, C.L. Seasonal changes in blood sugar, fat body, liver glycogen and gonads in the common frog *Rana temporaria*. *Journal of Experimental Biology,* 26:412-429, 1950.

SORBERA, L.A.; ASTUARINO, J.F.; CARRILLO, M. & ZANUY, S. Effects of polyunsaturated fatty acids and prostaglandins on oocytes maturation in a marine teleost, the european sea bass (*Dicentrarchus labrax). Biology of Reproduction*, 64:382-389, 2001.

SPEAKE, B.K.; SURAI, P.F. & BORTOLOTTI, G.R. Fatty acids profiles of yolk lipids of 5 species of wild ducks (Anatidae) differing in dietary preference. *Journal of Zoology London,* 257:533-538, 2002.

SPENGEL, J. W. Das Urogenital system der amphibian. 1. Theil, Der anatomishe Baú dês Urogenitalsystem. *Arbeiten aus dem Zoologzootom Inst im Wurzburg,* 3:51-114, 1876.

SPIELER, M. & LINSENMAIR, K.E. Choice of optimal oviposition site by *Hoplobatrachus occipitalis* (Anura, Ranidae) in an unpredictable and patchy environment. *Oecologia*, 109:184-199, 1997.

STAMPER, D.L. & LICHT, P. Further studies on the influence of GnRH on the biosynthesis of gonadotropins in female frogs (*Rana pipiens*). *General and Comparative Endocrinology,* 92:104–112, 1993.

TAYLOR, E.N. & SCHUETT, G.W. Effects of storage time and temperature on the stability of steroid hormones in blood samples from a squamate reptile. *Herpetology Review*, 35:14–17, 2004.

THOMPSON, M.B. & SPEAKE, B.K. A review of the evolution of viviparity in lizards: structure, function an physiology of the placenta. *Journal of Comparatve Physiology*, 176:179-189, 2006.

TONUTTI, E. Beitrag zur Kenntnis der Gymnophionen. XV. Das Genital-system. *Morphologisches Jahrbuch*, 68:151-292, 1931.

URIBE, M.C.A. & GUILLETTE, L.J. Jr. Oogenesis and ovarian histology of the American alligator *Alligator mississippiensis*. *Journal of. Morphology,* 245:225–40, 2000.

URIBE, M.C.A. Reproductive biology and phylogeny of Urodela. *In:* JAMIESON, B.G.M. & SEVER D.M. (eds.). *Ovary and Oogenesis*, Enfield, New Hampshire: Science, pp.135-150, 2003.

VAN OORDT, P.G.W. Regulation of spermatogenic cycle in common frog (*Rana temporaria*). Thesis, Utrecht University, G.W. Van-der Weil and Company, 116 p, 1956.

VILLECCO, E.I.; GENTA, S.B.; S´ANCHEZ RIERA, A.N. & S´ANCHEZ, S.S. Ultrastructural characteristics of the follicle cell–oocyte interface in the oogenesis of *Ceratophrys cranwelli*. *Zygote,* 10:163–73, 2002.

VON DER DECKEN, A.; OLIN, T. & BERGQVIST, P.A. Physiological properties of liver, gonads and muscle during maturation of female Atlantic salmon, *Salmo salar.* Comparision between a control and xenobiotics containing fish feed. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 101:525-529, 1992.

WADE, M.G.; VAN DER KRAAK, G.; GERRITS, M.F. & BALLANTYNE, J.S. Release and steroidogenic actions of polyunsaturated fatty acids in the goldfish testis. *Biology of reproduction*, 51:131-139, 1994.

WAKE, M.H. Evolutionary morphology of the caecilian urogenital system: the gonads and the fat bodies. *Journal of Morphology*, 126:291-332, 1968.

WAKE, M.H. Evolutionary morphology of the caecilian urogenital system. Part II. The kidneys and urogenital ducts. *Acta Anatomic,* 75:21-358, 1970.

WAKE, M. H. Reproduction, growth, and population structure of the Central American caecilian *Dermophis mexicanus*. *Herpetologica*, 36:244-256, 1980.

WAKE, M. H. The evolution of oviductal gestation in amphibians. *Journal of Experimental Zoology*, 266:394-413, 1993.

WAKE, M.H. The spermatogenic cycle of *Dermophis mexicanus* (Amphibia:Gymnophiona). *Journal of Herpetology*, 29:119-122, 1995.

WANG, X.; WALSH, L.P.; REINHART, A.J. & STOCCO, M.D. The role of arachidonic acid in steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory (StAR) gene

and protein expression. *The Journal of Biological Chemistry,* 275(26):20204–20209, 2000.

WATHES, D.C.; ABAYASEKARA D.R.E. & AITKEN, R.J. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. *Biology of Reproduction*, 77:190–201, 2007.

WELLS, K.D. *The ecology and behavior of amphibians*. The University of Chicago Press, Chicago, 1148p., 2007.

WILEY, H.S & WALLACE, R.A. The structure of vitellogenin. Multiple vitellogenins in *Xenopus laevis* give rise to multiple form of the yolk proteins. *Journal of Biochemistry,* 258:8626-8634, 1981.

WILKINSON, M.; KUPFER, A.; MARQUES-PORTO, R.; JEFFKINS, H.; ANTONIAZZI, M.A. & JARED, C. One hundred million years of skin feeding? Extended parental care in a Neotropical caecilian (Amphibia: Gymnophiona). *Biological Letters,* 4:358-361. 2008.

WINGFIELD, J.C.; JACOBS, J. & HILLGART, N. Ecological constraints and the evolution of hormone behavior interrelationships. *Annual of New York Academic Science,* 807:22-41, 1997.

WOOTTON, R.J. Energy costs of egg production and environmental determinants of fecundity in teleost fishes. *Symposium of the Zoological Society of London*, 44:133-159, 1979.

WU, B.J.; ELSE, P.L.; STORLIEN, L.H. & HULBERT, A.J. Molecular activity of Na+/K+-ATPase from different sources is related to the packing of membrane lipids. *The Journal of Experimental Biology,* 204:4271–4280, 2001.

YANG, Z. Development of a gas chromatographic method for profiling neutral lipids in marine samples. MSc Thesis. Memorial University of Newfoundland St. John's, 1995.

YARON, Z. & SIVAN, B. Reproduction. *In :* EVANS, D.H. & CLAIBORNE, J.B. (eds). *The physiology of fishes.* CRC Taylor & Francis Group, 3ºed, New York, EUA, pp. 245-250, 2006.

ZERANI, M.; AMABILI, F.; MOSCONI, G. & GOBBETTI, A. Effects of captivity stress on plasma steroid levels in the green frog, *Rana sculenta*, during the annual reproductive cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology,* 98A:491-496, 1991.

ZOHAR, Y.; MUNOZ-CUETO, J, A.; ELIZUR, A. & KAH, O. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165:438–455, 2010.