



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS PESQUEIRAS NOS
TRÓPICOS – PPG-CIPET

FISIOLOGIA REPRODUTIVA DAS FÊMEAS DE *Potamotrygon wallacei*
Carvalho, Rosa e Araújo (2016): GONADOTROFINAS, HORMÔNIOS
ESTEROIDES, CONDIÇÃO CORPORAL E PERFIL BIOQUÍMICO

MARIA GLAUCINEY FERNANDES MACÊDO AMAZONAS

MANAUS – AM

2019

MARIA GLAUCINEY FERNANDES MACÊDO AMAZONAS

**FISIOLOGIA REPRODUTIVA DAS FÊMEAS DE *Potamotrygon wallacei*
Carvalho, Rosa e Araújo (2016): GONADOTROFINAS, HORMÔNIOS
ESTEROIDES, CONDIÇÃO CORPORAL E PERFIL BIOQUÍMICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Pesqueiras nos Trópicos, da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Pesqueiras nos Trópicos.

Área de Concentração: Uso Sustentável de Recursos Pesqueiros Tropicais

Linha de Pesquisa: Biologia e Diversidade de Recursos Pesqueiros

Orientadora: Prof. Dra. Kedma Cristine Yamamoto

Co-orientador: Prof. Dr. Wallice Luíz Paxiúba Duncan

MANAUS – AM

2019

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

A489f Amazonas, Maria Glauciney Fernandes Macedo
Fisiologia das fêmeas de *Potamotrygon wallacei* Carvalho, Rosa e Araújo (2016): Gonadotrofinas, hormônios esteroides, condição corporal e perfil bioquímico / Maria Glauciney Fernandes Macedo Amazonas. 2019
45 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Kedma Cristine Yamamoto
Coorientador: Wallice Luíz Paxiúba Duncan
Dissertação (Mestrado em Ciências Pesqueiras nos Trópicos) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Arraia. 2. Reprodução. 3. Água doce. 4. Progesterona. 5. Hormônio. I. Yamamoto, Kedma Cristine II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

FOLHA DE APROVAÇÃO

MARIA GLAUCINEY FERNANDES MACEDO AMAZONAS

FISIOLOGIA REPRODUTIVA DAS FÊMEAS DE *POTAMOTRYGON WALLACEI* (CARVALHO, ROSA E ARAÚJO, 2016): GONADOTROFINAS, ESTERÓIDES GONADAIS, CONDIÇÃO CORPORAL E PERFIL BIOQUÍMICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Pesqueiras nos Trópicos da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Pesqueiras nos Trópicos, área de concentração em Uso Sustentável de Recursos Pesqueiros Tropicais.

Aprovado em 22 de Outubro de 2019

BANCA EXAMINADORA



Dr^a Kedma Cristine Yamamoto - Presidente
UFAM



Dr^a. Thais Billalba Carvalho - Membro
UFAM



Dr^a Gabriela Brambila de Souza - Membro
EMBRAPA

A meus pais **Graca e Regine** que sempre fizeram o impossível pra que eu realizasse meus sonhos (incluindo este), a meus filhos **Letícia e Joaquim** que foram a luz e força pra continuar nessa jornada, a meus irmãos **Gracioney e Reginey** pelo apoio incondicional, à minha cunhada **Francinete** e meu cunhado **Marco Aurélio**, às minhas **sobrinhas** e a meu esposo **Matheus**, por todo amor e paciência comigo, dedico.

AGRADECIMENTOS

A **Deus pai**, criador da vida, por me guiar e me amparar nos momentos difíceis ao longo desta caminhada.

À minha **orientadora Dra. Kedma Cristine Yamamoto**, por acreditar que conseguiríamos realizar tal pesquisa, pelo apoio imprescindível e ensinamentos.

Ao meu **co-orientador Dr. Wallice Luíz Paxiúba Duncan** que admiro muito, por me apresentar o magnífico mundo dos condríctios, por se disponibilizar a todo o momento, pelos ensinamentos em campo e em laboratório, proporcionando um grande enriquecimento profissional e pessoal.

Ao meu amigo **Eike** e ao meu **pai Reginel** que se disponibilizaram a ir buscar nitrogênio para conservar minhas amostras, dirigindo e carregando o material, ao Eike também ter sido um grande amigo, me levando a minha casa nas diversas vezes em que não conseguia andar.

Ao meu **pai Reginel** que mesmo cansado outrabalhandodisponibilizou material e até acompanhou minhas coletas em campo na nossa terra natal, teamopai!

Aos **pescadores e donos** das embarcações utilizadas em campo, principalmente o **pescador João** que sempre foi muito solícito, prestativo, seu conhecimento empírico agregou muito a esse trabalho.

À **Rúbia e a Rebeca** que se disponibilizaram dias inteiros em campo e na UFAM fazendo biometrias, coletas de sangue e análises em laboratório, sacrificando seus sábados, domingos e feriados em prol desta pesquisa.

Aos meus amigos do laboratório de Ecologia: **Chiara, Gisellen e André** que sempre se disponibilizaram a me ajudar no que eu precisasse e estivesse ao alcance deles.

Ao meu amigo **Jamerson**, que doou muito do seu tempo para me ensinar e corrigir a estatística e a escrita deste trabalho.

À **Damy** e o **Diego** que se disponibilizaram a ajudar-me com scripts e interpretação da estatística.

À minha querida amiga **Inês** que me cedeu um espaço, compreensão e acolhimento em sua sala para que pudesse trabalhar.

Aos meus pais **Graça e Reginel**, amo vocês e louvo a Deus por serem os meus pais, por acreditarem em mim e no meu potencial, assim como meus irmãos **Gracioney e Reginey**, meu cunhado e cunhada, **Francinete e Marco Aurélio**.

Aos meus amados filhos, **Letícia e Joaquim** principalmente a minha primogênita que sempre aceitou a mamãe indo pra -escola todo dia e não podendo ficar com você, perdão filha.

Ao meu **amado esposo Matheus** que não me abandonou nos momentos difíceis, logo que tivemos nosso filho e quando precisei abdicar de muitos momentos, para coletar, analisar material ou escrever.

À **Universidade Federal do Amazonas** pela estrutura, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Pesqueiras nos Trópicos – PPGCIPET e todo seu corpo docente pelo prazer em aprender com vocês.

À **CAPES** pelo financiamento da bolsa.

Às **arrais**, seres magníficos que com certeza sem elas esta pesquisa jamais teria sido realizada.

À **Eletuza** minha amiga, pela companhia e apoio, nos momentos de distração naUFAM.

Às minhas amigas do coração: **Sabrine, Michele e Amanda** pelo apoio e ajuda com o Joaquim.

Aos amigos que fiz no mestrado e vou levar pra vida toda: **Inês, Aldesandro, Aline, Sara Laurido, Franmir, Patrícia, Damy e Diego.**

Às colegas que passaram pelo laboratório que me deram força: **Joana e Ariany.**

E a todos que de alguma forma contribuíram com a realização desta pesquisa meu **MUITO OBRIGADA!**

RESUMO

Este estudo investigou durante diferentes momentos do ciclo reprodutivo, o perfil de hormônios gonadotróficos (FSH e LH) e esteroidais (T, E₂, P₄ e 11-CT), além das variáveis bioquímicas (lipídios, proteínas, glicose, sais minerais e compostos nitrogenados) no plasma e no fluido uterino de fêmeas de *Potamotrygon wallacei*. Foram coletadas 70 fêmeas de *P. wallacei* das quais 26 estavam grávidas (8 em gravidez inicial e 18 em gravidez final), 28 em pós-parto e 16 em repouso reprodutivo. Percebeu-se que a gravidez ocorre durante todo o período de vazante, enquanto o parto durante a seca e início da enchente no Rio Negro. O custo da reprodução é elevado na arraia cururu, demonstrado pelos baixos valores de fator de condição relativo (Kn – 0,93) nas fêmeas em pós-parto. Assim como o Kn, o IHS tende a diminuir gradativamente do início da gravidez (3,55%) até no momento do parto (2,75%). A gravidez pode estimular a mobilização de sais minerais materno para o embrião, em vista que os íons plasmáticos cálcio (Ca²⁺), cloreto (Cl⁻) e magnésio (Mg²⁺) estavam em baixa concentração (2,50 mM; 109,26 mM e 0,94 mM) nessa fase. Na contramão, a ureia tem um aumento (12,36mM) durante a gravidez, indicando que isso deve-se às atividades ureogênicas tanto materna, quanto embrionária. Os lipídios estão entre os mais importantes substratos envolvidos na reprodução. A correlação positiva entre o IHS e a concentração de triacilgliceróis (TGC) plasmáticos (p<0,005) reforça o papel do fígado como importante órgão de reserva energética para o período de gravidez. Observou-se que as fêmeas de *P. wallacei* com elevados teores de esteroides plasmáticos, tais como, 17β-Estradiol (E₂) e progesterona (P₄) apresentavam baixo conteúdo de lipídios (TGC e colesterol totais) plasmáticos. De maneira semelhante, tanto E₂, quanto P₄ apresentaram baixos valores durante a gravidez da arraia cururu, especialmente na fase final da gestação (2060 pg/mL e 309,70 pg/mL), porém aumentam após o parto (2679,70 pg/mL e 741,36 pg/mL) e se mantêm durante o repouso reprodutivo (2760,95 pg/mL e 458,25 pg/mL). A P₄ pode atuar na manutenção da gestação, semelhante aos mamíferos. Já os andrógenos, apenas a T variou entre os estágios reprodutivos, assumindo-se como precursor do E₂. As concentrações de FSH e LH foram quantificáveis no plasma da arraia cururu, porém, não apresentaram variação em função do estado reprodutivo. Nossos estudos revelam que a fêmea supre o feto produzindo e/ou transferindo vários compostos nutricionais. Contudo, o custo da reprodução é extremamente elevado, sugerindo que as populações da arraia cururu podem ser extremamente dependentes da qualidade ambiental.

Palavras-chave: Arraia; Reprodução; Água doce; Progesterona; Hormônio.

ABSTRACT

This study investigated during different moments of the reproductive cycle, the profile of gonadotropic (FSH and LH) and steroid (T, E₂, P₄ and 11-CT) hormones, as well as the biochemical variables (lipids, proteins, glucose, mineral salts and nitrogen compounds) in plasma and uterine fluid of *Potamotrygon wallacei* females. Seventy *P. wallacei* females were collected from which 26 were pregnant (8 in early pregnancy and 18 in late pregnancy), 28 postpartum and 16 in reproductive rest. It was noticed that pregnancy occurs during the whole period of ebb, while childbirth during drought and the beginning of the flood in Rio Negro. The cost of reproduction is high in cururu stingrays, demonstrated by the low values of relative condition factor (Kn - 0.93) in postpartum females. Like Kn, IHS tends to decrease gradually from early pregnancy (3.55%) to delivery (2.75%). Pregnancy may stimulate the mobilization of maternal mineral salts to the embryo, as the calcium (Ca²⁺), chloride (Cl⁻) and magnesium (Mg²⁺) plasma ions were in low concentration (2.50 mM, 109.26 mM and 0.94 mM) at this stage. In contrast, urea has an increase (12.36mM) during pregnancy, indicating that this is due to both maternal and embryonic ureogenic activities. Lipids are among the most important substrates involved in reproduction. The positive correlation between IHS and plasma triacylglycerol (TGC) concentration (p<0.005) reinforces the role of the liver as an important energy reserve organ for the pregnancy period. *P. wallacei* females with high levels of plasma steroids such as 17β-Estradiol (E₂) and progesterone (P₄) were found to have low plasma lipid content (TGC and total cholesterol). Similarly, both E₂ and P₄ showed low values during cururu stingray pregnancy, especially in late gestation (2060 pg/mL and 309.70 pg/mL), but increased after delivery (2679.70 pg/mL. 741.36 pg/mL) and is maintained during reproductive rest (2760.95 pg / mL and 458.25 pg / mL). P₄ can act to maintain pregnancy, similar to mammals. As for androgens, only T varied between reproductive stages, assuming as precursor of E₂. The concentrations of FSH and LH were quantifiable in the plasma of the cururu stingray, however, they did not vary according to the reproductive state. Our studies reveal that the female supplies the fetus by producing and/or transferring various nutritional compounds. However, the cost of reproduction is extremely high, suggesting that cururu stingray populations may be extremely dependent on environmental quality.

Key-words: Stingray; Reproduction; Freshwater; Progesterone; Hormone;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de localização das coletas, Médio Rio Negro, no Município de Barcelos –AM.

Figura 2. Fotografias representativas do trato reprodutivo de cada fêmea de *P. wallacei* durante diferentes fases do ciclo reprodutivo.

Figura 3. Fotografias representativas das categorias de *Potamotrygon wallacei*: [A] Fêmea em repouso; [B] Fêmea em gravidez inicial com embrião juvenil; [C] Fêmea em gravidez final com embrião a termo e [D] Fêmea em pós-parto.

Figura 4. Média e desvio padrão do [A] fator de condição corporal (Kn) e do [B] Índice hepatossomático (IHS) das fêmeas de *Potamotrygon wallacei* em diferentes estágios reprodutivos. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas.

Figura 5. Média e desvio padrão dos níveis dos esteroides gonadais em cada estágio reprodutivo das fêmeas de *Potamotrygon wallacei*. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas.

Figura 6. Média e desvio padrão dos níveis de [A] triacilgliceróis e [B] colesterol em cada estágio reprodutivo das fêmeas de *Potamotrygon wallacei*. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Biometria e número de exemplares capturados (N) das fêmeas de *P. wallacei* em diferentes fases do período reprodutivo. Os dados estão como média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas.

Tabela 2. Biometria, volume dos ovários e número de exemplares capturados (N) das fêmeas de *P. wallacei* em diferentes fases do período reprodutivo. Os dados estão como média $\pm$ desvio padrão. **L**=Largura; **C**=Comprimento; **V**=Volume; **O**=Ovário; **D**=Direito; **E**=Esquerdo.

Tabela 3. Biometria e volume dos úteros das fêmeas de *Potamotrygon wallacei* em diferentes fases da reprodução. Os dados estão como média $\pm$ desvio padrão, (N) é o número de exemplares capturados. **L**=Largura; **C**=comprimento; **V**=Volume; **O**=Ovário; **D**=Direito; **E**=Esquerdo.

Tabela 4. Peso dos embriões, fecundidade ovariana e uterina em fêmeas de *Potamotrygon wallacei*. Os dados estão como média $\pm$ desvio padrão, (N) é o número de exemplares capturados.

Tabela 5. Concentração dos metabólitos plasmáticos das fêmeas de *Potamotrygon wallacei* em diferentes estágios reprodutivos. Os dados estão como média $\pm$ desvio padrão, (N) número de exemplares capturados.

Tabela 6. Teor dos íons no plasma de fêmeas de *Potamotrygon wallacei* em diferentes estágios reprodutivos. Os dados estão como média $\pm$ desvio padrão, (N) número de exemplares capturados.

Tabela 7. Níveis de uréia e amônia no plasma das fêmeas de *Potamotrygon wallacei* em diferentes estágios reprodutivos. Os dados estão como média $\pm$ desvio padrão, (N) número de exemplares capturados.

Tabela 8. Níveis dos hormônios FSH e LH no plasma das fêmeas de *Potamotrygon wallacei* em diferentes estágios reprodutivos. Os dados estão como média $\pm$ desvio padrão, (N) número de exemplares capturados.

Tabela 9. Concentração dos lipídios e dos metabólitos no fluido uterino das fêmeas de

Potamotrygon wallacei. Os dados estão como média $\pm$ desvio padrão, (N) número de exemplares capturados.

Tabela 10. Teor dos íons no fluido uterino de fêmeas grávidas de *Potamotrygon wallacei*. Os dados estão como média $\pm$ desvio padrão, (N) número de exemplares capturados. P=plasma e F=fluido uterino.

Tabela 11. Níveis de uréia e amônia no fluido uterino de fêmeas grávidas de *Potamotrygon wallacei*. Os dados estão como média $\pm$ desvio padrão, (N) número de exemplares capturados.

Tabela 12. Níveis dos hormônios FSH e LH no fluido uterino de fêmeas grávidas de *Potamotrygon wallacei*. Os dados estão como média $\pm$ desvio padrão, (N) número de exemplares capturados.

Tabela 13. Níveis dos hormônios esteroides (Testosterona, 17β -Estradiol, Progesterona e 11-Ceto testosterona) no fluido uterino de fêmeas grávidas de *Potamotrygon wallacei*. Os dados estão como média $\pm$ desvio padrão, (N) número de exemplares capturados.

LISTA DE ABREVIATÖES

GnRH – Hormônio Liberador das Gonadotrofinas

FSH – Hormônio Folículo Estimulante

LH – Hormônio Luteinizante

E₂ –17β-Estradiol

T – Testosterona

P₄ –Progesterona

11-CT – 11- Ceto testosterona

TGC – Triacilgliceróis

Ca²⁺ – íon Cálcio

Na⁺ – íon Sódio

K⁺ – íon Potássio

Cl⁻ – íon Cloreto

PO₄⁻ – íonFosfato

Mg⁺² – íon Magnésio

NH₃ – Amônia

N₂ – Nitrogênio líquido

G – Força G (Força Gravitacional) ou RCF (Força Centrífuga Relativa)

Kn – Fator de condição corporal

IHS – Índice hepatossomático

LD – Largura do disco

EIA – Método ELISA

CV – Coeficiente de variação

nm – Nanômetro

rho – Coeficiente de correlação de Spearman

p – Valor de probabilidade

GL – Graus de liberdade

g – Gramas

cm – Centímetros

pg/mL – Picograma pormililitro

mUI/mL – Unidade internacional de medida por mililitro

mg/dL – Miligrama pordecilitro

mM – Milimolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVO GERAL	17
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 CAPTURA, MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS E COLHEITA DE SANGUE	18
3.2 FATOR DE CONDIÇÃO RELATIVO (KN)	21
3.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS NO PLASMA E NO FLUIDO UTERINO	21
3.4 ANÁLISES DOS HORMÔNIOS REPRODUTIVOS.....	22
3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	22
4. RESULTADOS	23
4.1 TAMANHO DAS FÊMEAS	23
4.2 MORFOMETRIA OVARIANA E UTERINA	24
4.3 TAMANHO DOS EMBRIÕES E QUANTIDADE DE FOLÍCULOS	25
4.4 ÍNDICE HEPATOSSOMÁTICO (IHS) E FATOR DE CONDIÇÃO RELATIVO (KN)	25
4.5 ANÁLISE BIOQUÍMICA DO PLASMA DAS FÊMEAS – TEORES DE LIPÍDIOS E METABÓLITOS	25
4.6 CONCENTRAÇÃO DE ÍONS, URÉIA E AMÔNIA	27
4.7 GONADOTROFINAS PLASMÁTICAS (FSH E LH)	28
4.8 HORMÔNIOS ESTEROIDES PLASMÁTICOS	28
4.9 ANÁLISE BIOQUÍMICA DO FLUIDO UTERINO – TEORES DE LIPÍDIOS E METABÓLITOS 29	
4.10 CONCENTRAÇÃO DE ÍONS, URÉIA E AMÔNIA	30
4.11 GONADOTROFINAS NO FLUIDO UTERINO (FSH E LH).....	30
4.12 NÍVEIS DOS ESTEROIDES NO FLUIDO UTERINO (E ₂ , T E P ₄).....	31
5. DISCUSSÃO	32
5.1 A GESTAÇÃO E A FECUNDIDADE EM <i>P. WALLACEI</i>	32
5.2 O ELEVADO CUSTO DA REPRODUÇÃO	32
5.3 A MOBILIZAÇÃO DE NUTRIENTES PARA O EMBRIÃO	33
5.4 A CONCENTRAÇÃO DE GONADOTROFINAS NO PLASMA MATERNO.....	34
5.5 O PAPEL DOS HORMÔNIOS ESTEROIDES DURANTE AGESTAÇÃO	35
5.6 A RELAÇÃO MATERNO-FETAL: HORMÔNIOS E NUTRIENTES	37
6. CONCLUSÕES	37
6.1 IMPLICAÇÕES PARA A CONSERVAÇÃO BIOLÓGICA	38
7. REFERÊNCIAS.....	39

1. INTRODUÇÃO

Potamotrygon wallacei Carvalho, Rosa e Araújo (2016) é uma arraia de água doce Neotropical da subfamília Potamotrygoninae (Família Potamotrygonidae) (*sensu* Carvalho et al., 2016). Esta arraia é encontrada desde o médio até o baixo Rio Negro (Carvalho et al., 2016). Na região do município de Barcelos (Arquipélago de Mariuá) é conhecida como arraia "cururu". É preferencialmente encontrada nas áreas de floresta alagada (igapós) alimentando-se de insetos, pequenos peixes e crustáceos (Shibuya et al., 2009; Shibuya & Zuanon, 2013).

P. wallacei é uma espécie vivípara aplacentária e que provê nutrição fetal através do processo de histotrofia matrotrófica, onde a mucosa uterina, por meio de vilosidades chamadas trofonemas, produz proteínas e secreções ricas em lipídios que nutrem os embriões durante o seu desenvolvimento (Babel, 1967; Spieler et al., 2013; Da Silva et al., 2016). De maneira geral, os elasmobrânquios possuem baixa taxa de crescimento populacional, maturação tardia, baixa fecundidade e uma longa gestação, dependendo da espécie (Carrier et al., 2004; Charvet-Almeida et al., 2005).

A reprodução de *Potamotrygon wallacei* está estreitamente atrelada ao pulso de inundação da Bacia do Rio Negro (endêmica dessa região) (Charvet-Almeida et al., 2005), levando cerca de 2 anos para atingir seu tamanho mínimo de maturação (L50), de 17 cm (Duncan et al., 2016; Charvet-Almeida et al., 2005). Quando atinge seu L50, o pulso de inundação e as variáveis ambientais dão um sinal para que se inicie a fase reprodutiva. Segundo Charvet-Almeida et al. (2005) o repouso ocorre na enchente, a cópula na cheia (período de chuvas), a gravidez na vazante e o parto na seca/enchente.

A gestação de *Potamotrygon wallacei* dura cerca de 3 meses (Charvet-Almeida et al., 2005) e a fêmea faz um investimento materno alto transferindo ou produzindo nutrientes para o (s) filhote (s), que pode influenciar diretamente sobre seu estado de saúde e de reserva energética, principalmente na fase final da gestação onde somente ela provê nutrientes ao embrião (Wiegand, 1996). Nos elasmobrânquios, o fígado é o principal local de estoque de lipídios e conteúdo energético (Ballantyne, 2016) importantes na reprodução, sendo extremamente necessários para o desenvolvimento embrionário.

Os triacilgliceróis e o colesterol são lipídios endógenos utilizados no preparo para eventos desgastantes como migração e reprodução (Jenni-Eiermann et al., 2002; McWilliams et al., 2004). O colesterol é essencial na composição das membranas celulares, além de atuar como precursor na síntese de hormônios esteroides (Nelson e Cox, 2014), fundamentais na fisiologia reprodutiva de peixes e regulada pelo eixo

hipotálamo–hipófise–gônadas–HHG (Baldiisertoto, 2014; Nagahama, 1994).

No eixo HHG a síntese metabólica inicia quando os neurônios hipotalâmicos, modulados por estímulos ambientais (temperatura da água, fotoperíodo, regime de chuvas, reservas energéticas) e corporais (controle nervoso) sintetizam e secretam o hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH), que estimula as células gonadotróficas da hipófise a sintetizar e liberar o hormônio folículo estimulante (FSH), que via corrente sanguínea chega as camadas foliculares do ovário (tecas) e converte o colesterol a testosterona. Este andrógeno é transportado à camada granulosa, na qual é convertido em 17 β -estradiol, também sob influência do FSH (Nagahama, 1994; Amaral, 2009).

O 17 β -estradiol atua no fígado, estimulando a síntese da vitelogenina, que promove crescimento do oócito e a incorporação do vitelo. Na fase de vitelogênese ocorre um aumento do 17 β -Estradiol e da testosterona, e esse aumento inibe a síntese de FSH através de *feedback* negativo e juntamente com a ação do GnRH estimulam a secreção hipofisária do hormônio luteinizante (LH) nas fases finais da vitelogênese (Young et al., 2005; Baldisseroto et al., 2014). O LH estimula a camada granulosa e o corpo lúteo a produzir a progesterona (P₄) que é essencial para a manutenção da gravidez em vertebrados, assim como em elasmobrânquios (Mesiano et al., 2011)

Na gravidez, as fêmeas de *Potamotrygon wallacei* carregam de 1 a 5 embriões em ambos os úteros (Charvet-Almeida et al., 2005) edesde o início da gravidez, o útero esquerdo e direito estão densamente revestidos com os trofonemas (Da Silva et al., 2016). Dada a intimidade das estratégias nutricionais embrionárias maternas durante a gestação de elasmobrânquios (Murphy et al., 2006), a esteroidogênese trofonêmica local e a troca bidirecional de hormônios sexuais e metabólitos (proteínas, carboidratos, sais minerais e compostos nitrogenados) entre os compartimentos materno e uterino são prováveis. Além disso, o perfil bioquímico do plasma é também uma importante ferramenta biológica para avaliar o estresse, a dieta e a regulação iônica tangível entre os potamotrigonídeos (Brinn et al., 2012).

Lyons e Winne-Edwards (2019) estudando as concentrações de esteroides no plasma materno e no fluido uterino numa raíamarinha (*Urobatis halleri*), perceberam que os esteroides eram mais concentrados no fluido uterino do que o plasma materno, especialmente no início da gravidez, quando os embriões são dependentes de saco vitelino. A diferenciação sexual embrionária (pela presença de cláspers) coincidiu com picos de P₄, T, 17-OHP e E₂ no fluido, sugerindo uma contribuição para o seu próprio ambiente de desenvolvimento.

Considerando a lacuna para arraias de água doce sobre a fisiologia reprodutiva, mais especificamente sobre os hormônios, este estudo se propôs a investigar os

parâmetros metabólicos, bem como os hormônios envolvidos no controle endócrino da reprodução, em referência aos hormônios gonadotróficos e esteroides.

2. OBJETIVOGERAL

Diferenciar o perfil dos hormônios sexuais e das variáveis bioquímicas do plasma e fluido uterino de fêmeas de *Potamotrygon wallacei* em diferentes estágios reprodutivos, e suas relações com o fator de condição corporal e o índice hepatossomático;

2.1 Objetivos específicos

- a. Investigar se o tamanho do trato reprodutivo das fêmeas de *Potamotrygon wallacei* muda em função do estágio reprodutivo e se influenciam algum hormônio ou metabólito do fluido uterino das grávidas;
- b. Investigar se o tamanho dos embriões, a quantidade de folículos e de embriões influencia os hormônios reprodutivos e as variáveis bioquímicas no fluido uterino das arraia grávidas;
- c. Investigar se, o índice hepatossomático e o fator de condição varia entre os diferentes momentos do ciclo reprodutivo de *Potamotrygon wallacei*;
- d. Comparar o perfil bioquímico (triacilgliceróis, colesterol total, proteínas totais, albumina, globulinas, glicose, uréia, amônia e os íons: cálcio $[(Ca^{2+})]$, sódio $[(Na^{+})]$, potássio $[(K^{+})]$, cloreto $[(Cl^{-})]$, fosfato $[(PO_4^{-})]$ e magnésio $[(Mg^{+2})]$) no plasma das fêmeas de *Potamotrygon wallacei* em diferentes fases do ciclo reprodutivo e no fluido uterino das arraia grávidas;
- e. Comparar o perfil dos hormônios sexuais (Hormônio Folículo Estimulante (FSH), Hormônio Luteinizante (LH), 17β -estradiol (E_2), Testosterona (T), Progesterona (P_4) e 11-Ceto testosterona (11-CT)) no plasma das fêmeas de *Potamotrygon wallacei* em diferentes fases do ciclo reprodutivo e no fluido uterino das arraia grávidas;
- f. Investigar se há relação entre as gonadotrofinas (FSH e LH), e delas com os esteroides gonadais (E_2 , T, P_4 e 11-CT) no plasma de fêmeas de *Potamotrygon wallacei* em diferentes fases do ciclo reprodutivo e no fluido uterino das arraia grávidas;
- g. Investigar se há relação dos esteroides gonadais com as variáveis bioquímicas no plasma das fêmeas de *P. wallacei* em diferentes fases do ciclo reprodutivo e no fluido uterino das arraia grávidas;
- h. Investigar se os hormônios reprodutivos e as variáveis bioquímicas são

influenciadas pelo período reprodutivo e pelo fator de condição corporal (Kn) no plasma das fêmeas em diferentes fases do ciclo reprodutivo e no fluido uterino das arraias grávidas;

3. MATERIAL EMÉTODOS

3.1 Captura, manutenção dos animais e colheita desangue

As arraias foram coletadas em novembro/2017, fevereiro/2018, março/2018 e abril/2018 durante o período de vazante e seca respectivamente. Na região do Médio Rio Negro, provenientes de diferentes igarapés localizados no Arquipélago de Mariuá (Figura 1) na cidade de Barcelos, Amazonas, Brasil. As coletas foram autorizadas pelo Instituto Chico Mendes para Conservação da Biodiversidade (ICMBio, Licença Nº 9324-1) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa e Ciência Animal da UFAM (CEUA, Licença Nº 031/2015).

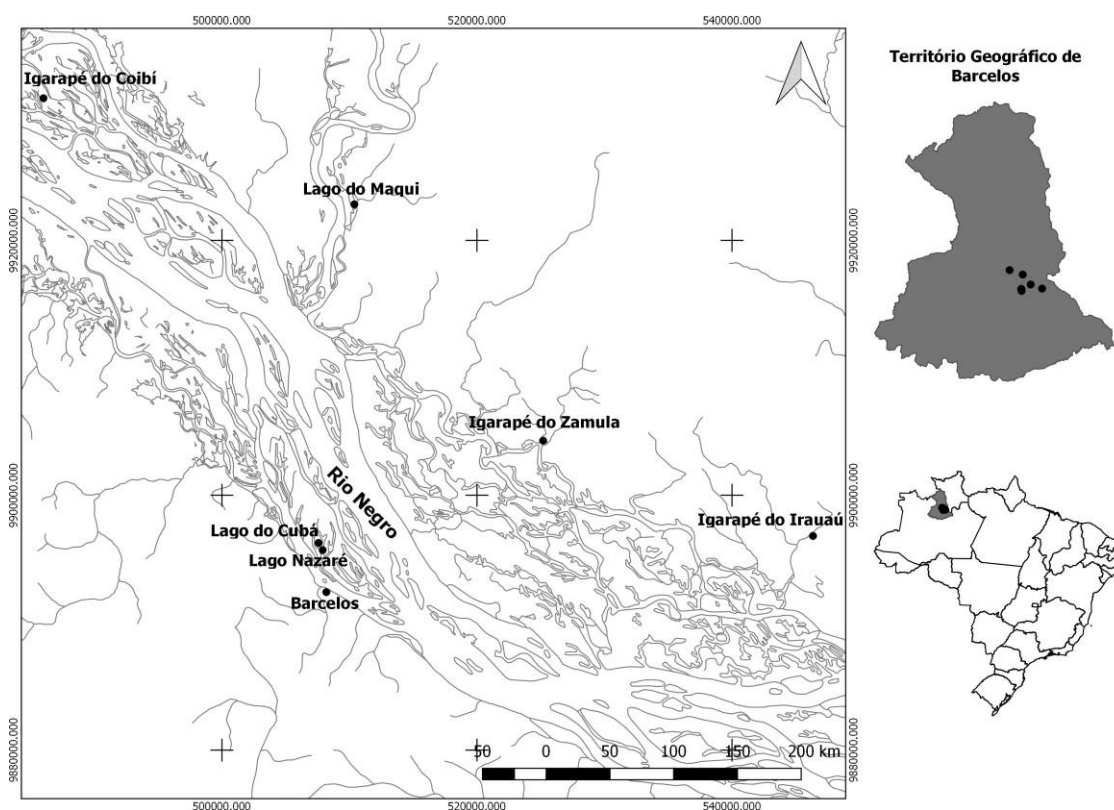


Figura 1. Mapa de localização das coletas, Médio Rio Negro, no Município de Barcelos – AM.

Os locais amostrados foram: Lago do Maki, na boca do Rio Demeni (00°42'34"S / 62°55'42,9"O), Igarapé do Irauaú (00°56'09"S/62°35'46"O), Lago do Cubá (00°56'19"S/62°55'55"O), Igarapé do Zamula (00°51'57,40"S/62°46'25"O), Sistema de lagos do Coibí (00°34'65,6"S/63°04'50,5"O) e Lago do Nazaré (00°56'37"S/62°55'44"O). As arraias foram capturadas durante o período da

noite (das 23:00h até 01:00h) nas margens dos igarapés ou lagos, por meio de busca ativa utilizando botes de madeira, lanternas de cabeça e puçás.

Após a captura na madrugada, as arraias foram mantidas em currais artesanais construídos nas margens dos lagos do próprio local de coleta para aclimatização. Logo pela manhã ($\approx$ 6 horas), as arraias foram anestesiadas com benzocaína (0,5 mg/L) e o sangue foi coletado por meio de punção cardíaca utilizando seringas com agulhas heparinizadas. O plasma foi imediatamente separado por centrifugação 7.200 xg durante 5 minutos e armazenado em N₂ líquido para posterior análise dos hormônios reprodutivos e parâmetros bioquímicos. Em seguida, procedeu-se a eutanásia dos animais utilizando concentração >1 mg/L do anestésico. Foram mensurados a biometria (peso e largura do disco) dos espécimes com balança digital e fita métrica.

Todos os animais foram fotodocumentados e um exemplar testemunho foi depositado na coleção de peixes do Laboratório de Ictiologia da Universidade Federal do Amazonas (Tombo: **UFAM-459**). Uma incisão ventral foi realizada para remoção do fígado e do trato reprodutivo. Os ovários e os úteros (direitos e esquerdos) foram pesados em balança analítica digital com acurácia de 0,001g (método de Scherle) e mensurados com paquímetro digital. Além disso, foram contabilizados o número de folículos ovarianos visíveis para se determinar a fecundidade ovariana. No caso dos úteros também foram registrados a presença de embriões, e se caso presente, alíquotas do fluido uterino foram retiradas e imediatamente congeladas em N₂ líquido. O número de embriões foi quantificado para determinar a fecundidade uterina. Os embriões foram fotodocumentados e cuidadosamente mensurados (peso e largura do disco) assim como foram notados, a presença (e tamanho) do saco vitelino para se estabelecer o período de gravidez da arraia (inicial ou final). Baseado em caracteres morfológicos das gônadas de acordo com Santander-Neto et al., 2016 o estágio reprodutivo de cada fêmea foi determinado e adaptado a essa pesquisa.

Fêmeas em repouso, divididos em 3 categorias: **I** – Ovários indiferenciados; útero fino e filiforme, com tamanhos semelhantes; **II**: Ovário esquerdo e direito pequeno e sem folículos visíveis; útero iniciando expansão da região posterior, com paredes finas; **III**: Ovário esquerdo expandindo lateralmente e com folículos vitelogênicos; útero com parede espessa pela presença dos trofonemas e estreitamento da região anterior (Figura 2, A e B);

Fêmeas grávidas: Ovário alargado e vascularizado, com folículos atrésicos, pré-vitelogênicos e sem folículos vitelogênicos visíveis; útero com ovócitos ou embriões; mucosa uterina com trofonemas espessos e bem desenvolvidos (Figura 2, C);

Fêmeas em pós-parto: Ovário com folículos pré-vitelogênicos, folículos atresícos e sem folículos vitelogênicos visíveis; úteros expandidos e flácidos, com aspecto hemorrágico sem embriões ou ovócitos (Figura 2, D).

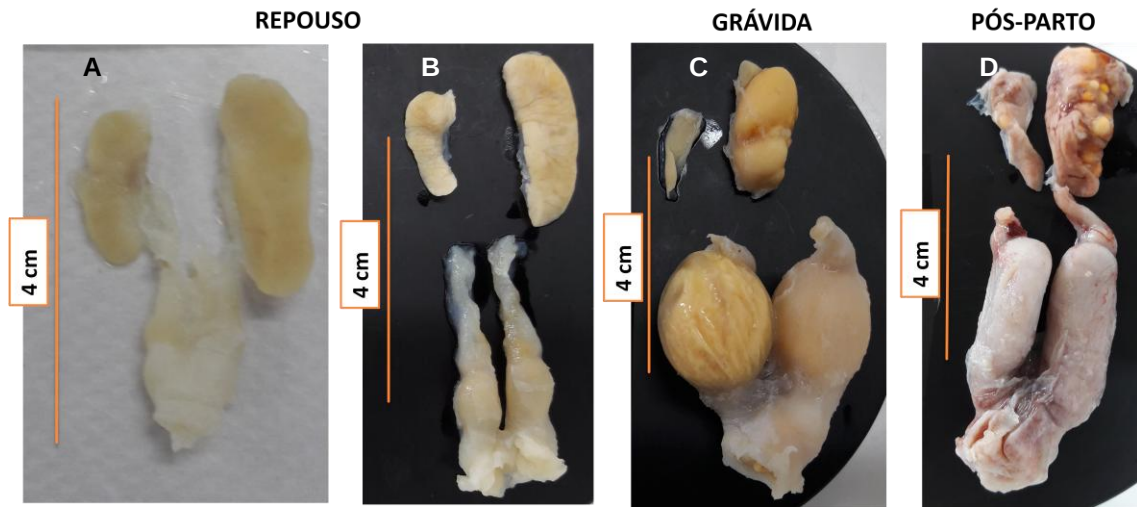


Figura 2. Fotografias representativas do trato reprodutivo de cada fêmea de *P. wallacei* durante diferentes fases do ciclo reprodutivo.

Exemplares de cada grupo estão representados na figura 3.

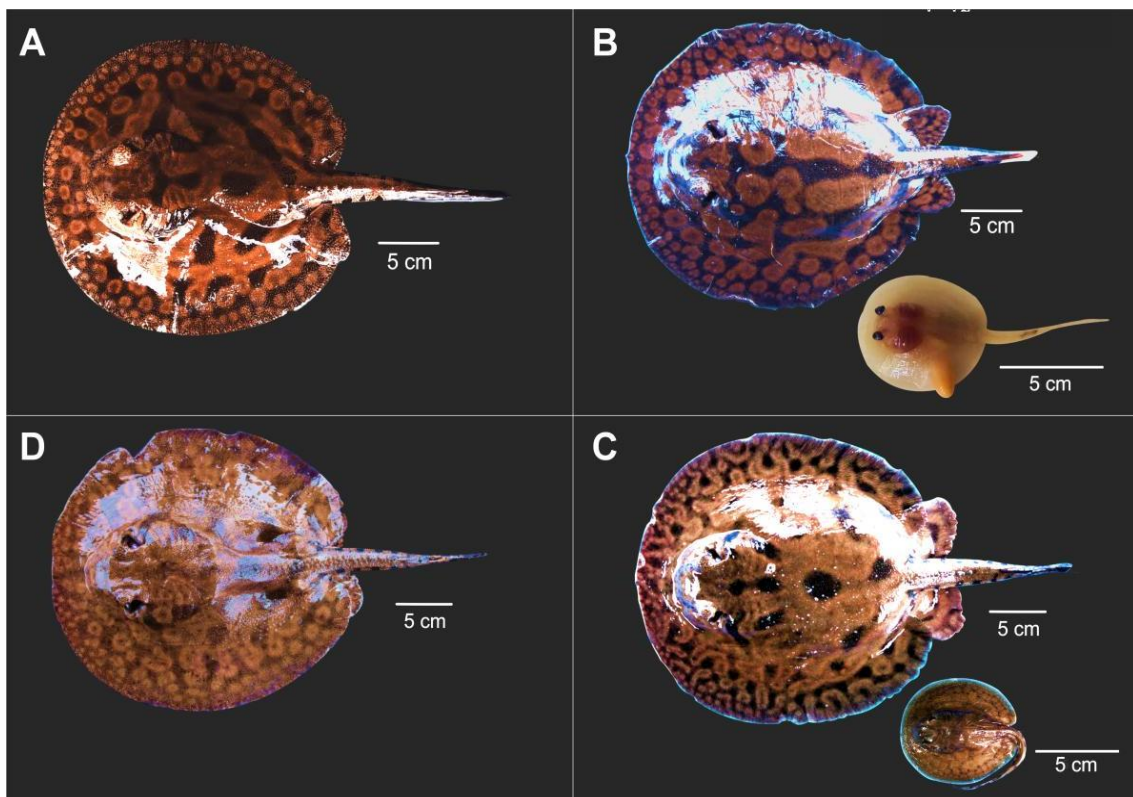


Figura 3. Fotografias representativas das categorias de *Potamotrygon wallacei*: [A] Fêmea em repouso; [B] Fêmea em gravidez inicial com embrião juvenil; [C] Fêmea em gravidez final com embrião a termo e [D] Fêmea em pós-parto.

Os dados de massa do fígado foram utilizados para obtenção do índice hepatossomático (IHS) (Wootton et al., 1978; Chellappa et al., 1995). Este índice representa o valor em percentual (%) da massa do fígado em relação à massa corporal da arraia e é calculado pela fórmula:

$$\text{IHS} = \frac{\text{Peso úmido do fígado} \times 100}{\text{Peso da arraia}}$$

3.2 Fator de condição relativo (Kn)

Para avaliação da saúde das arraias nos diferentes estágios reprodutivos, foi determinado individualmente, o valor do fator de condição relativo do peso ($Kn = W_t/W_e$), através do quociente entre o peso empiricamente registrado (W_t) e o peso teoricamente esperado (W_e) para um dado comprimento (Le Cren, 1951; Andrade-Talmeli et al., 1999). Devido às mutilações na cauda da arraia, foi utilizado a largura do disco (LD) como medida de comprimento. Através do método dos mínimos quadrados e após a transformação logarítmica ($\log_{10}$) dos valores da curva da relação peso/largura do disco foram estimados os valores dos coeficientes “a” e “b” que, por sua vez, foram utilizados no cálculo dos valores teoricamente esperados de peso total (W_e) para um dado valor de LD, através da equação: $W_e = aLD^b$ (Froese, 2006) e aplicado na fórmula do Kn.

3.3 Análises bioquímicas no plasma e no fluido uterino

O plasma das arraias de todos os grupos e fluido uterino das fêmeas grávidas foi usado para quantificar os níveis de triacilgliceróis, colesterol total, proteínas totais, albumina, globulinas, glicose, uréia, amônia, íons cálcio ($[Ca^{2+}]$), magnésio ($[Mg^{+2}]$), cloreto ($[Cl^-]$), fosfato inorgânico ($[PO_4^{3-}]$), sódio ($[Na^+]$) e potássio ($[K^+]$). A glicose foi analisada por ensaio colorimétrico, pela enzima glucose oxidase e um espectrofotômetro para medir a absorbância a 510 nm. Triacilgliceróis foram analisados usando glicerol-3-fosfato oxidase e a absorbância foi medida a 510 nm. O colesterol total também foi determinado pelo ensaio colorimétrico, que utiliza a enzima colesterol oxidase e mede a absorbância a 510 nm. Todos os ensaios bioquímicos descritos acima foram realizados utilizando kit comercial da Doles Company (Goiânia, Brasil). A proteína total foi determinada pelo ensaio de proteína de Bradford (Bradford, 1976), que usa o corante Azul de Coomassie G-250 (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, EUA) e mede a absorbância a 595 nm, refletindo proporcionalmente a concentração de proteína. O método colorimétrico de verde de bromocresol foi utilizado para determinar a albumina a 630 nm. O método da urease foi usado para determinar a concentração de uréia, a 600 nm. O método utilizado para determinação da amônia foi

o método colorimétrico de Nessler. O método colorimétrico da cresoltaleína a 570 nm foi utilizado para determinar a concentração de cálcio $[(Ca^{2+})]$. O método colorimétrico do magon-sulfonado, a 505 nm foi utilizado para determinar a concentração de magnésio $[(Mg^{+2})]$. A metodologia de tiocianato de mercúrio foi utilizado para determinar a concentração de cloreto $[(Cl^-)]$ a 450 nm. O método colorimétrico de molibdênio foi utilizado para determinar o fosfato inorgânico $[(PO_4^{3-})]$ a 650 nm, todos os ensaios acima foram realizados utilizando kit comercial LABTEST – Sistema Diagnóstico Ltda (Lagoa Santa, MG). Os íons sódio $[(Na^+)]$ e potássio $[(K^+)]$ foram determinados por fotometria de chama (DigimedDM-61).

3.4 Análises dos hormônios reprodutivos

Os níveis de plasma e fluido uterino de 17β -estradiol (E_2), testosterona (T), Progesterona (P_4), 11-Ceto testosterona (11-CT) e as gonadotrofinas (Hormônio Folículo Estimulante-FSH e Luteinizante-LH) foram quantificadas por ensaio imunoenzimático (ELISA) com kits comerciais da Cayman Chemicals® (EUA). O método de extração e os protocolos de ensaio foram realizados de acordo com procedimentos recomendados pelos fabricantes, EIA-Estradiol (catálogo #582251), EIA-testosterona (catálogo #582701), EIA-Progesterona (Catalogo #582601), EIA-11-Cetotestosterona (catálogo #582751), EIA-FSH (catálogo #500710) e EIA-LH (catálogo #500720). As medições de absorbância foram realizadas em um leitor de microplacas (ThermoScientific).

O E_2 (limite inferior de detecção 15 pg/ml; CV intra-ensaio=10,24%), T (limite inferior de detecção 6pg/ml; CV inter-ensaio= 8,23%; CV intra-ensaio=10,77%), P_4 (limite inferior de detecção 10 pg/ml; CV inter-ensaio=9,87%; CV intra-ensaio=6,98%) e 11-CT (limite inferior de detecção 1,3 pg/ml; CV inter-ensaio= 9,0%; CV intra-ensaio=5,6%), foram determinados a 412 nm de comprimento. As gonadotrofinas, FSH (limite inferior de detecção 0,6 mIU/ml; CV inter-ensaio=10,8%; CV intra-ensaio=8,83%) e LH (limite inferior de detecção 0,5 mIU/ml; CV inter-ensaio≤7,91%; CV intra-ensaio≤9,21%), foram determinadas a 450nm.

3.5 Análises estatísticas

Para verificar a normalidade dos dados foi realizado o teste de Shapiro-Wilk (Zar, 2009), e para testar a homogeneidade das variâncias foi feito o teste de Levene (Zar, 2009). Uma Análise de Variância (ANOVA)(Zar, 2009) foi aplicada para verificar os contrastes estatísticos entre os grupos de fêmeas (Repouso, Gravidez inicial, Gravidez final e Pós-parto) para cada variável obtida: biometria (peso e largura do disco), Kn, IHS, hormônios sexuais (gonadotrofinas e esteróides), lipídios

(triacilgliceróis e colesterol), metabólitos (proteínas totais, albumina, globulinas, glicose), sais minerais (íons Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , Mg^{+2} e PO_4^-) e compostos nitrogenados (uréia e NH_3). Onde houve diferença estatística o teste a post-hoc de Tukey-Kramer (Zar, 2009) foi aplicado.

Para amostras que não tiveram distribuição normal foi feito o teste de Kruskal-Wallis e o teste a post-hoc de Dunn (Dunn, 1964; Zar, 2009). As possíveis relações entre as gonadotrofinas (FSH ou LH) e esteroides plasmáticos (17 β -estradiol, testosterona, progesterona e 11-Ceto testosterona), e entre esteroides e metabólitos no plasma foram previamente avaliadas por meio de correlações de Spearman (Zar, 2009). Como o fator de condição corporal (Kn) pode afetar a fisiologia do animal, análises de covariâncias multivariadas (MANCOVA's) (Zar, 2009) foram usadas para avaliar os efeitos do período reprodutivo (fatores) e do Kn (como covariável) sobre o perfil hormonal e bioquímico do plasma. Em todos os casos, o $\alpha=0,05$ e o software utilizado foi o R versão 3.6.0.

4. RESULTADOS

4.1 Tamanho das fêmeas

Foram capturadas 70 fêmeas de *Potamotrygon wallacei* das quais 26 estavam grávidas (8 em gravidez inicial e 18 em gravidez final), 28 em pós-parto e 16 em repouso reprodutivo. A amplitude de largura do disco das fêmeas foi de 14,8 cm até 28,6 cm e o total em peso foi de 35.949 kg, os dados biométricos estão representados na tabela 1.

Tabela 1. Biometria e número de exemplares capturados (N) das fêmeas de *P. wallacei* em diferentes fases do período reprodutivo. Os dados estão com média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas.

	Estágio reprodutivo			
	Repouso	Gravidez inicial	Gravidez final	Pós-parto
Peso (g)	389,25 $\pm$ 167,23 (16)	583 $\pm$ 191,56 (8)	477,33 $\pm$ 147,52 (18)	541,04 $\pm$ 214,21 (28)
Largura do disco, LD (cm)	20,01 $\pm$ 2,90 (16) a	22,46 $\pm$ 2,38 (8) ab	21,13 $\pm$ 1,98 (18) ab	23,11 $\pm$ 3,64 (28) b

As fêmeas em repouso foram menores em largura de disco, que as fêmeas em pós-parto (ANOVA-GL=3; F=3,12; p<0,05). Contudo, através da MANCOVA foi observado que o tamanho ou peso não influenciam nenhuma variável fisiológica estudada.

4.2 Morfometria ovariana e uterina

Contrariando Da Silva et al., 2017 que demonstrou haver assimetria ovariana em fêmeas de *P. wallacei*, nossos dados não demonstraram ter diferenças significativas do tamanho dos ovários de *P. wallacei* (tabela 2).

Tabela 2. Biometria, volume dos ovários e número de exemplares capturados (N) das fêmeas de *P. wallacei* em diferentes fases do período reprodutivo. Os dados estão com média $\pm$ desvio padrão. L=Largura; C=comprimento; V=Volume; O=Ovário; D=Direito; E=Esquerdo.

	Estágio reprodutivo			
	Repouso	Gravidez inicial	Gravidez final	Pós-parto
LOD (mm)	8,20 $\pm$ 2,55 (17)	7,72 $\pm$ 1,79 (8)	7,66 $\pm$ 1,78 (18)	8,51 $\pm$ 2,59 (26)
LOE (mm)	11,22 $\pm$ 3,73 (17)	13,19 $\pm$ 4,83 (8)	11,68 $\pm$ 5,83 (18)	10,43 $\pm$ 1,92 (26)
COD (mm)	16,33 $\pm$ 4,17 (17)	20 $\pm$ 5,58 8	18,16 $\pm$ 4,37 (18)	17,63 $\pm$ 4,74 (26)
COE (mm)	26,36 $\pm$ 5,86 (17)	31,21 $\pm$ 5,37 (8)	25,61 $\pm$ 9,76 (18)	27,07 $\pm$ 5 (26)
VOD (g)	0,27 $\pm$ 0,18 (5)	0,16 $\pm$ 0,06 (3)	0,19 $\pm$ 0,11 (13)	0,28 $\pm$ 0,24 (16)
VOE (g)	1,37 $\pm$ 0,94 (5)	0,92 $\pm$ 0,10 (3)	0,77 $\pm$ 0,35 (13)	1,06 $\pm$ 0,45 (16)

A largura e o comprimento dos úteros das fêmeas em repouso foram estatisticamente menores (DUNN-GL=3; $p<0,001$) que os das fêmeas grávidas e após o parto, os dados biométricos estão na tabela 3. O volume do útero esquerdo foi significativamente menor que o das fêmeas grávidas (Dunn-GL=3; $p<0,05$).

Tabela 3. Biometria e volume dos úteros de fêmeas de *Potamotrygon wallacei* em diferentes fases da reprodução. Os dados estão como média $\pm$ desvio padrão, (N) é o número de exemplares capturados. L=Largura; C=comprimento; V=Volume; O=Ovário; D=Direito; E=Esquerdo.

	Estágio reprodutivo			
	Repouso	Gravidez inicial	Gravidez final	Pós-parto
LUD (cm)	7,15 $\pm$ 2,42 (17) a	14,47 $\pm$ 6,20 (8) b	14,65 $\pm$ 7,85 (18) b	11,59 $\pm$ 3,95 (26) b
LUE (cm)	8,42 $\pm$ 3,23 (17) a	18,08 $\pm$ 9,15 (8) b	21,75 $\pm$ 9,60 (18) b	14,51 $\pm$ 3,78 (26) b
CUD (cm)	10,10 $\pm$ 3,45 (17) a	18,85 $\pm$ 7,93 (8) b	18,19 $\pm$ 8,85 (18) b	18,24 $\pm$ 6,35 (26) b
CUE (cm)	11,36 $\pm$ 4,14 (17) a	25,04 $\pm$ 12,90 (8) b	26,37 $\pm$ 10,27 (18) b	21,34 $\pm$ 3,98 (26) b
VUD (g)	2,01 $\pm$ 1,20 (5)	4,42 $\pm$ 0,54 (3)	3,27 $\pm$ 2,57 (13)	2,86 $\pm$ 1,38 (16)
VUE (g)	2,16 $\pm$ 1,26 (5) a	6 $\pm$ 1,11 (3) b	4,99 $\pm$ 2,76 (13) b	3,66 $\pm$ 1,05 (16) ab

4.3 Tamanho dos embriões e quantidade de folículos

A largura do disco dos embriões teve amplitude de 2,40 cm até 10 cm e o peso variou de 1,90g até 43,50g (Tabela 4).

Tabela 4. Peso dos embriões, fecundidade ovariana e uterina em fêmeas de *Potamotrygon wallacei*. Os dados estão com média $\pm$ desvio, (N) é o número de exemplares capturados.

Medidas	Estágio reprodutivo	
	Gravidez inicial	Gravidez final
Peso (g)	12,01 $\pm$ 4,20(27)	22,88 $\pm$ 7,35 (31)
LD (cm)	5,99 $\pm$ 1,27 (27)	7,98 $\pm$ 0,70 (32)
N de folículos	8-22 (8)	1-18 (18)

4.4 Índice Hepatosomático(IHS) e Fator de Condição Relativo (Kn)

O período reprodutivo influencia significativamente (MANOVA; Wilks=0,586; F=6,55; gl=128; p<0,001) o Kn e o IHS das fêmeas de *P. wallacei*. Fêmeas no final da gravidez apresentaram um Kn maior que as fêmeas em pós-parto (Figura 4-A). O IHS não variou em função do estágio reprodutivo das fêmeas (Figura 4-B). Contudo, observou-se que o Kn está positivamente relacionado ao IHS ($\rho=0,3480681$; p<0,05).

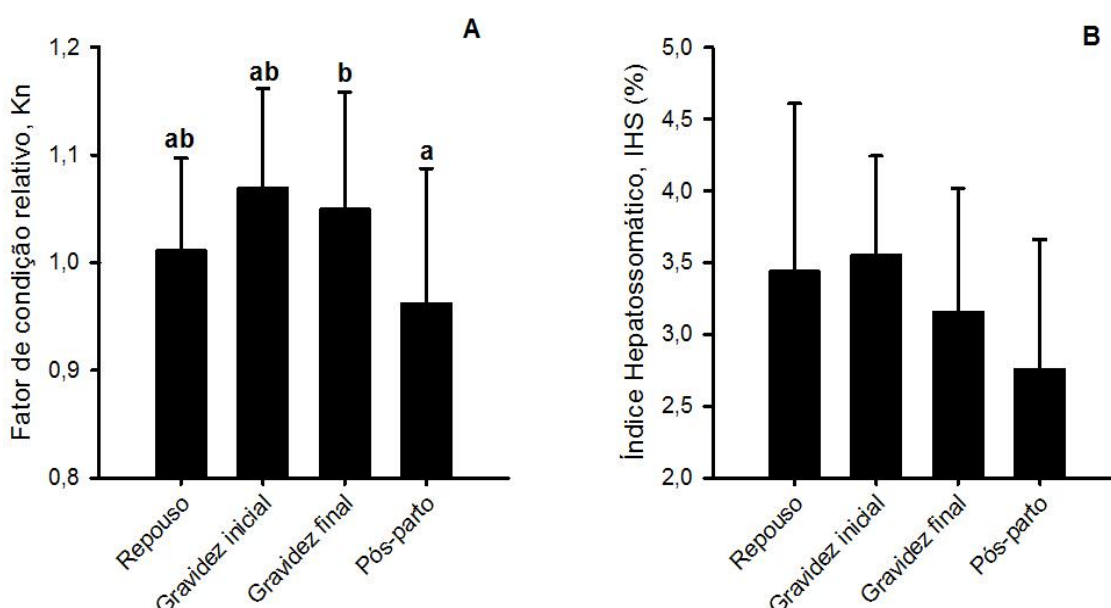


Figura 4. Médias e desvio padrão do [A] fator de condição corporal (Kn) e do [B] Índice hepatossomático (IHS) das fêmeas de *Potamotrygon wallacei* em diferentes estágios reprodutivos. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas.

4.5 Análise bioquímica do plasma das fêmeas – Teores de lipídios e metabólitos

O período reprodutivo influencia significativamente tanto os triacilgliceróis (MANCOVA; F=9,80; gl=3; p<0,001) quanto o colesterol (MANCOVA; F=7,18; gl=3; p<0,001) das fêmeas de *P. wallacei*. As fêmeas grávidas (inicial e final) tiveram maior

concentração de TGC que as fêmeas em repouso e pós-parto (ANOVA – gl=3; $p<0,001$) (Figura 5-A). Foi observado que os níveis de TGC estão positivamente correlacionados (Regressão múltipla - $F=6,32$; $p<0,005$) ao índice hepatossomático (IHS).

As fêmeas em gravidez final tiveram maior concentração do colesterol que as demais fêmeas de *P. wallacei* (ANOVA – gl=3; $p<0,05$). Foi observado que os teores de colesterol totais estavam inversamente relacionados (Regressão múltipla - $F=11,69$; gl=1;38 e $p<0,05$) às concentrações de progesterona (Figura5-B).

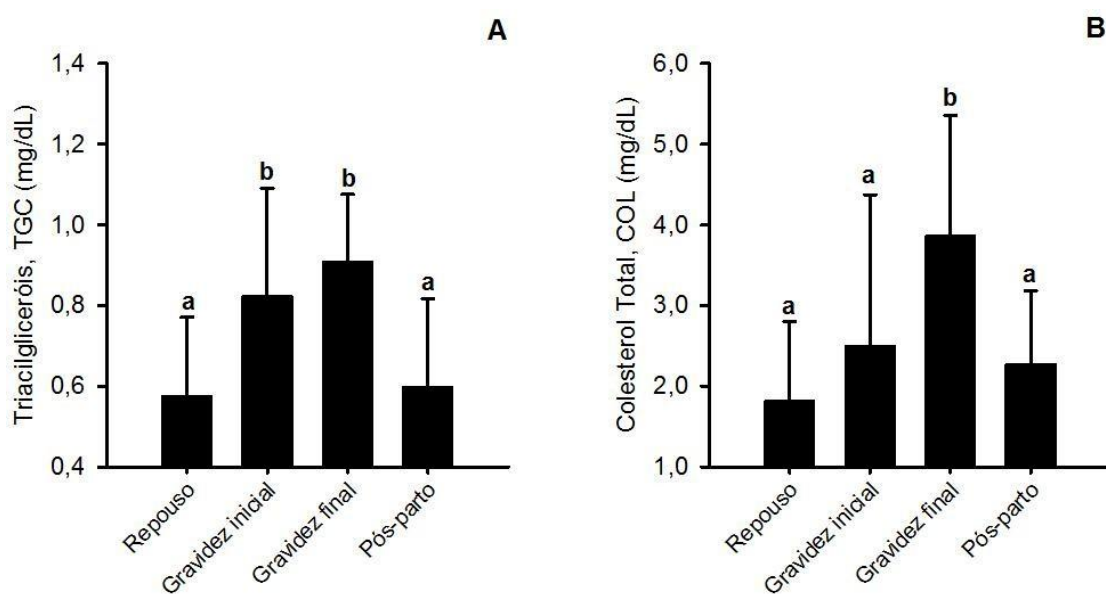


Figura 5. Média e desvio padrão dos níveis de [A] triacilgliceróis e [B] colesterol em cada estágio reprodutivo das fêmeas de *Potamotrygon wallacei*. Letras diferentes indicam diferença estatística.

As proteínas totais, a albumina, as globulinas e a glicose não apresentaram diferenças entre os estágios reprodutivos (Tabela 5). Além disso, nenhum dos metabólitos plasmáticos foram afetados pelo Kn.

Tabela 5. Concentração dos metabólitos plasmáticos de fêmeas de *Potamotrygon wallacei* em diferentes estágios reprodutivos. Os dados estão com média $\pm$ desviopadrão, (N) número de exemplares capturados.

Metabólitos	Estágio reprodutivo			
	Repouso	Gravidez inicial	Gravidez final	Pós-parto
Proteínas totais (g/dL)	3,04 $\pm$ 0,50 (11)	2,25 $\pm$ 0,56 (5)	2,74 $\pm$ 0,57 (13)	2,88 $\pm$ 0,58 (25)
Albumina (g/dL)	0,79 $\pm$ 0,50 (11)	0,55 $\pm$ 0,17 (5)	0,58 $\pm$ 0,22 (12)	0,66 $\pm$ 0,29 (25)
Globulinas (g/dL)	2,24 $\pm$ 0,75 (11)	1,70 $\pm$ 0,46 (5)	2,12 $\pm$ 0,43 (12)	2,21 $\pm$ 0,64 (25)
Glicose (mmoles/L)	0,17 $\pm$ 0,08 (8)	0,12 $\pm$ 0,02 (2)	0,16 $\pm$ 0,05 (9)	0,22 $\pm$ 0,07 (20)

4.6 Concentração de íons, uréia e amônia

Devido à insuficiência de amostras, as fêmeas em gravidez inicial e final foram consideradas como um único grupo para estas análises. As fêmeas grávidas tiveram menor nível de Ca^{2+} (Kruskal-wallis-N=47; gl=2 e $p<0,001$) do que as fêmeas das demais fases reprodutivas. O Na^+ e K^+ não foram diferentes entre os estágios reprodutivos. As fêmeas grávidas tiveram menor concentração de Cl^- (ANOVA-N=38; gl=2;35; $F=5,329$; $p<0,05$) do que as fêmeas em repouso e em pós-parto. As fêmeas grávidas também tiveram menor nível de Mg^{+2} (Kruskal-wallis-N=38; gl=2 e $p<0,001$) em comparação com as demais fêmeas. O PO_4^- não foi diferente entre os estágios reprodutivos (Tabela 6).

Tabela 6. Teor dos íons no plasma de fêmeas de *Potamotrygon wallacei* em diferentes estágios reprodutivos. Os dados estão com média $\pm$ desvio padrão, (N) número de exemplares capturados.

Íons (mM)	Estágio reprodutivo		
	Repouso	Grávidas	Pós-parto
Ca^{2+}	3,88 $\pm$ 0,54 (9) a	2,50 $\pm$ 1,02 (14) b	3,77 $\pm$ 0,69 (23) a
Na^+	145 $\pm$ 21,56 (9)	161,50 $\pm$ 39,47 (8)	172,58 $\pm$ 60,16 (19)
K^+	4,29 $\pm$ 0,51 (9)	4,30 $\pm$ 0,51 (8)	4,54 $\pm$ 0,76 (19)
Cl^-	133,52 $\pm$ 20,59 (7) a	109,26 $\pm$ 15,90 (11) b	131,88 $\pm$ 21,28 (20) a
Mg^{2+}	0,92 $\pm$ 0,09 (7) a	0,62 $\pm$ 0,04 (11) b	0,88 $\pm$ 0,09 (20) a
PO_4^-	0,93 $\pm$ 0,51 (11)	0,94 $\pm$ 0,28 (15)	0,90 $\pm$ 0,39 (24)

O Ca^+ e o Mg^{+2} se correlacionam de forma positiva, ($\rho=0,36$ e $p<0,05$) assim

como o Na^+ e o K^+ ($\rho=0,62$ e $p<0,05$). Os valores médios dos íons plasmáticos não são afetados pelo fator de condição das fêmeas.

As fêmeas grávidas tiveram maior concentração de uréia que as fêmeas em repouso e pós-parto (Kruskal-wallis – $N=38$; $GL=2$ e $p<0,001$). A NH_3 não apresentou variação (Tabela 7).

Tabela 7. Níveis de uréia e amônia no plasma de fêmeas de *Potamotrygon wallacei* em diferentes estágios reprodutivos. Os dados estão com média $\pm$ desvio padrão, (N) número de exemplares capturados.

Nitrogênio (mM)	Estágio reprodutivo		
	Repouso	Grávidas	Pós-parto
Uréia	4,21 $\pm$ 2,81 (7) ^a	12,36 $\pm$ 1,85 (11) ^b	5,28 $\pm$ 3,61 (20) ^a
Amônia	1,31 $\pm$ 0,63 (7)	1,54 $\pm$ 0,95 (11)	1,82 $\pm$ 1,01 (20)

4.7 Gonadotrofinas plasmáticas (FSH e LH)

As concentrações do hormônio folículo estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH) não variaram entre os estágios reprodutivos (Tabela 8). As gonadotrofinas não foram afetadas pelo fator de condição das fêmeas. Contudo, os níveis de FSH e LH estão positivamente correlacionados ($\rho=0,61$ e $p<0,001$) (Tabela 8).

Tabela8. Níveis dos hormônios FSH e LH do plasma de fêmeas de *Potamotrygon wallacei* em diferentes estágios reprodutivos. Os dados estão com média $\pm$ desvio padrão, (N) número de exemplares capturados.

Gonadotrofinas (mUI/mL)	Estágio reprodutivo			
	Repouso	Gravidez inicial	Gravidez final	Pós-parto
FSH	8,62 $\pm$ 1,22 (7)	8,90 $\pm$ 2,31 (3)	7,93 $\pm$ 1,44 (12)	8,46 $\pm$ 2,27 (22)
LH	0,67 $\pm$ 0,04 (8)	0,64 $\pm$ 0,02 (3)	0,63 $\pm$ 0,03 (12)	0,63 $\pm$ 0,11 (21)

4.8 Hormônios esteroidesplasmáticos

Os níveis de testosterona (ANOVA- $N=46$; $GL=3$; $F=3,171$ e $p<0,05$) foram menores nas fêmeas em gravidez final do que em repouso (Figura 6-A). O E_2 não foi diferente entre os estágios reprodutivos (Figura 6-B). A progesterona (Kruskal-wallis- $N=55$, $GL=3$ e $p<0,001$) teve um menor nível nas fêmeas em gravidez final que nas demais fêmeas (Figura 6-C). O 11-Ceto testosterona não apresentou diferenças entre os estágios reprodutivos (Figura 6-D).

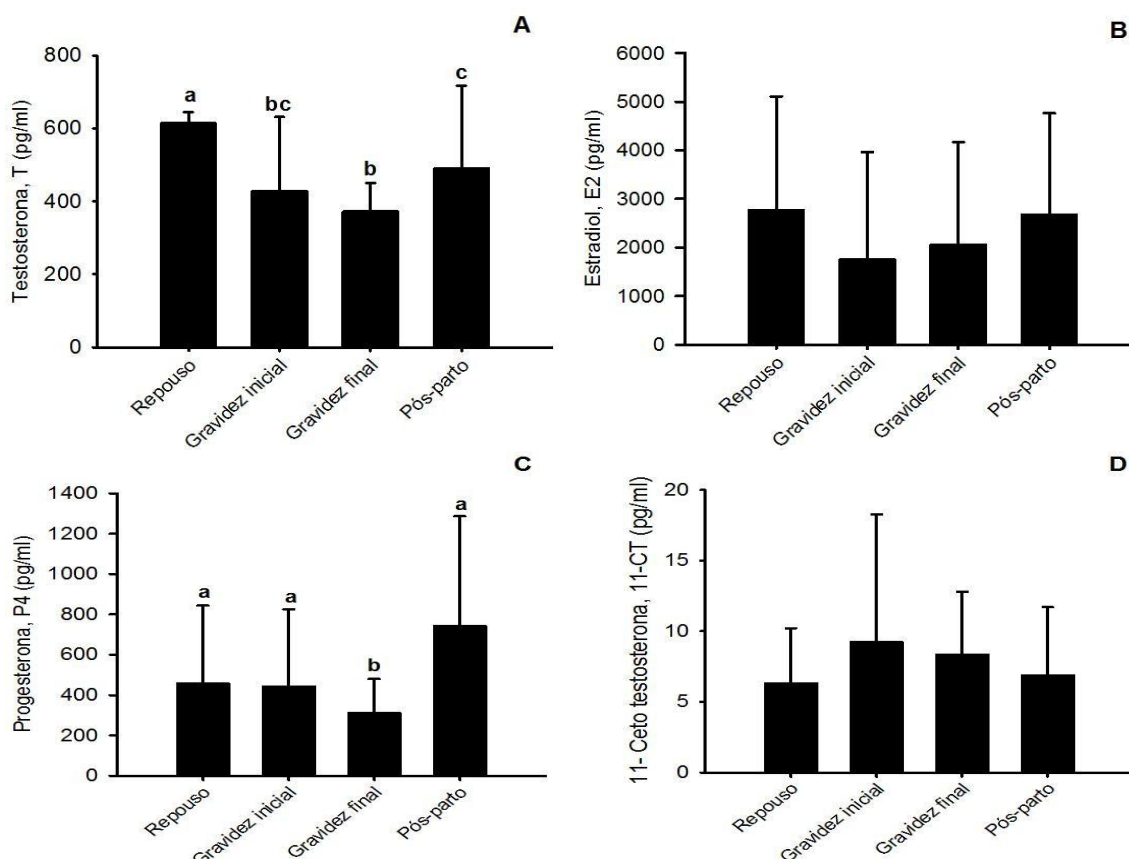


Figura 6. Média e desvio padrão dos níveis dos esteroides gonadais em cada estágio reprodutivo das fêmeas de *Potamotrygon wallacei*. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas.

4.9 Análise Bioquímica do Fluido Uterino – Teores de lipídios e metabólitos

Os lipídios (TGC e colesterol), as proteínas, a albumina, as globulinas e a glicose não variaram nos diferentes momentos da gravidez (Tabela 9).

Tabela 9. Concentração dos lipídios e dos metabólitos no fluido uterino de fêmeas de *Potamotrygon wallacei*. Os dados estão com média $\pm$ desvio padrão, (N) número de exemplares capturados.

Metabólitos	Estágio reprodutivo	
	Gravidez inicial	Gravidez final
TGC (mg/dL)	0,75 $\pm$ 0,60 (4)	0,86 $\pm$ 0,97 (9)
Colesterol total (mg/dL)	1,74 $\pm$ 1,07 (4)	2,73 $\pm$ 2,56 (10)
Proteínas totais (g/dL)	1,87 $\pm$ 0,19 (6)	1,75 $\pm$ 0,26 (16)
Albumina (g/dL)	0,53 $\pm$ 0,26 (6)	0,55 $\pm$ 0,18 (16)
Glicose (mM)	0,06 $\pm$ 0 (6)	0,06 $\pm$ 0,01 (15)

4.10 Concentração de íons, uréia e amônia

O Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , Mg^{+2} e o PO_4^{4-} não foram diferentes durante a gravidez (Tabela 10). A relação P:F representa o quociente entre as concentrações de cada íon entre o plasma e o fluido, em referência ao valor central de 1. Quanto menor e mais distante de 1, maior a concentração no fluido; e quanto maior e mais próximo de 1, maior concentração no plasma das fêmeas.

Tabela 10. Teor dos íons no fluido uterino de fêmeas grávidas de *Potamotrygon wallacei*. Os dados estão com média $\pm$ desvio padrão, (N) número de exemplares capturados. P=plasma e F=fluido uterino.

Íons (mM)	Gravidez inicial		Gravidez final	
	Fluido uterino	Razão P:F	Fluido uterino	Razão P:F
Ca^{2+}	$3,07 \pm 0,37$ (5)	$0,65 \pm 0,41$ (3)	$3,21 \pm 0,82$ (17)	$2,27 \pm 4,22$ (13)
Na^+	$142,50 \pm 91,28$ (6)	$1,47 \pm 0,19$ (2)	$135,77 \pm 72,41$ (13)	$3,19 \pm 3,87$ (9)
K^+	$4,05 \pm 0,52$ (6)	$1,21 \pm 0,09$ (2)	$4,01 \pm 1,03$ (13)	$2,31 \pm 3,34$ (9)
Cl^-	$106,11 \pm 11,53$ (5)	$1,35 \pm 0$ (1)	$112,48 \pm 14,91$ (16)	$1,82 \pm 3,21$ (12)
Mg^{+2}	$0,74 \pm 0,07$ (5)	$0,90 \pm 0$ (1)	$0,74 \pm 0,07$ (16)	$1,69 \pm 3,25$ (12)
PO_4^{4-}	$0,78 \pm 0,17$ (5)	$1,45 \pm 0,62$ (3)	$0,76 \pm 0,41$ (17)	$2,66 \pm 4,19$ (14)

Os níveis de uréia e a NH_3 não variaram estatisticamente no fluido uterino das fêmeas grávidas de *Potamotrygon wallacei* (Tabela 11).

Tabela 11. Níveis de uréia e amônia no fluido uterino de fêmeas grávidas de *Potamotrygon wallacei*. Os dados estão com média $\pm$ desvio padrão, (N) número de exemplares capturados.

Nitrogênio(mM)	Gravidez inicial	Razão P:F	Gravidez final	Razão P:F
Uréia	$15,69 \pm 4,61$ (6)	$0,88 \pm 0,44$ (6)	$13,20 \pm 4,11$ (15)	$0,91 \pm 0,42$ (15)
NH_3	$1,57 \pm 0,62$ (6)	$1,04 \pm 2,03$ (6)	$1,39 \pm 0,45$ (15)	$1,09 \pm 2,13$ (15)

4.11 Gonadotrofinas no fluido uterino (FSH e LH)

Os níveis de gonadotrofinas não foram diferentes no fluido uterino assim como no plasma (Tabela 12). O FSH e o LH não tiveram relação com os esteroides e nem com os metabólitos.

Tabela 12. Níveis dos hormônios FSH e LH no fluido uterino de fêmeas grávidas de *Potamotrygon wallacei*. Os dados estão com média $\pm$ desvio padrão, (N) número de exemplares capturados.

Gonadotrofinas (mUI/mL)	Estágio reprodutivo	
	Gravidez inicial	Gravidez final
FSH	2,99 $\pm$ 0,79 (6)	3,09 $\pm$ 0,62 (17)
LH	0,21 $\pm$ 0,03 (6)	0,20 $\pm$ 0,05 (16)

4.12 Níveis dos esteroides no fluido uterino (E₂, T e P₄)

Os hormônios esteróides não foram diferentes no fluido uterino das fêmeas em gravidez inicial e nem final. (Tabela 13). Os esteróides não influenciam os níveis das variáveis bioquímicas do fluido uterino.

Tabela 13. Níveis dos hormônios esteróides (Testosterona, 17 β -Estradiol, Progesterona e 11-Ceto testosterona) no fluido uterino de fêmeas grávidas de *Potamotrygon wallacei*. Os dados estão com média $\pm$ desvio padrão, (N) número de exemplares capturados.

Esteroides (pg/mL)	Estágio reprodutivo	
	Gravidez inicial	Gravidez final
E ₂	1792,88 $\pm$ 1159,60 (5)	2007,29 $\pm$ 1330,38 (16)
T	715,89 $\pm$ 113,51 (4)	836,11 $\pm$ 153,52 (17)
P ₄	476,39 $\pm$ 468,32 (4)	389,22 $\pm$ 294,41 (9)

5. DISCUSSÃO

5.1 A gestação e a fecundidade em *P.wallacei*

As coletas foram realizadas entre o final da vazante (novembro/2017) e início da enchente (abril/2018) no Arquipélago de Mariuá (médio Rio Negro). A captura de fêmeas grávidas nesse período corrobora os resultados de Charvet-Almeida et al. (2005). O período gestacional de *Potamotrygon wallacei* deve ocorrer durante a vazante-seca do Rio Negro (agosto – abril), enquanto o parto pode ocorrer durante seca e início da enchente (dezembro – abril). Nosso estudo demonstrou também que 76% (54 das 71) das fêmeas capturadas estavam grávidas ou pós-parto. Todas estas observações também são consistentes com os resultados relatados por Duncan et al. (2016). Estes autores também reportaram que 90% das fêmeas capturadas durante o período de seca estavam grávidas. Portanto, a gravidez ocorre durante todo o período de vazante, enquanto o parto durante a seca e início da enchente no Rio Negro.

Observamos também que a fecundidade uterina aumenta com o tamanho da arraia. A fêmea grávida com menor tamanho tinha 17 cm de largura de disco (LD) e pesava 288 g e a gravidez múltipla só ocorre nas fêmeas com LD >20 cm (peso >440 g). A gravidez com quatro embriões (fecundidade uterina máxima) só foi registrado nas fêmeas com LD >23 cm (peso >500 g). Por outro lado, espécies como *Potamotrygon motoro* e *P. scobina* são mais fecundas. Nestas espécies, a fecundidade uterina pode chegar a 11 a 16, respectivamente (Charvet-Almeida et al., 2005). Estas espécies são de maiores porte e podem chegar a >60 cm de LD. Como a arraia cururu é um potamotrigonídeo de pequeno porte (Charvet-Almeida et al., 2005; Shibuya et al., 2009; Carvalho, Rosa e Araújo, 2016; Duncan et al., 2016), pode ser que a baixa fecundidade (1-4 embriões) deve-se ao limitado espaço celômico.

5.2 O elevado custo da reprodução

O custo da reprodução é elevado em elasmobrânquios (Lyons e Winne-Edwards, 2019). Na arraia cururu, a massa embrionária total chega a ser >10% que o peso da fêmea grávida com fetos a termo. Nas espécies de grande porte, tais como *Paratrygon aiereba*, *Potamotrygon motoro* e *Plesiotrygon iwamae*, a massa total dos embriões a termo é < 5% do peso da fêmea (dados não publicados). Além do mais, o neonato da arraia cururu é proporcionalmente grande (equivalente a 45% da LD materna). É mais que o dobro da proporção observada nas outras espécies de potamotrigonídeos, tais como *Paratrygon aiereba* (%LD=18), *Plesiotrygon iwamae* (%LD=21) e *Potamotrygon motoro* (%LD=19) (Duncan et al., 2016). O maior tamanho do neonato pode aumentar a taxa de sobrevivência, e, portanto, o sucesso reprodutivo

da espécie (Maruska & Gelsleichter, 2011). Assim sendo, o custo da reprodução na arraia cururu deve ser extremamente elevado, especialmente se considerarmos apenas três meses de gravidez, segundo Charvet-Almeida et al. (2005).

O custo da reprodução pode ser avaliado pelos baixos valores de fator de condição relativo (Kn) observados nas fêmeas pós-parto. Como o Kn não variou ao longo da gravidez, isto sugere que estes animais mantiveram uma intensa atividade de forrageio durante este período. O Kn tem sido usado como um bom indicador da quantidade de energia armazenada ou do estado de saúde que o animal se encontra (Chellapa et al., 1995). Este índice sugere que, animais que armazenaram mais energia podem estar em melhores condições corporais (Pope & Kruse, 2001). O índice hepatossomático é outro importante indicador do custo da reprodução. Assim como o Kn, o IHS tende a diminuir gradativamente do início da gravidez até no momento do parto. O fígado é um importante órgão que armazena nutrientes e os mobiliza para as estruturas reprodutivas (Ranzi, 1935; Acevedo et al., 2015). Quanto mais o feto cresce, aumenta a demanda e a mobilização de substratos energéticos e estruturais a partir do fígado. O baixo IHS no pós-parto pode ser o resultado do esgotamento das reservas energéticas hepáticas. Contudo, se a gestação da arraia cururu ocorre durante a vazante/seca e o parto na seca/início da enchente; então, as fêmeas pós-parto passam por período transitório de restrição alimentar. É provável que durante a seca possa existir menor oferta de alimento, uma vez que o espaço físico dos igarapés encontra-se reduzido. Somam-se a isso, os custos energéticos para a escolha das áreas de parto, bem como o provável cuidado parental do neonato (Duncan et al., 2016).

5.3 A mobilização de nutrientes para o embrião

Os constituintes bioquímicos do plasma de *P. wallacei*, tais como proteínas totais, albumina, globulinas totais e glicose não são afetados pelo estado reprodutivo das fêmeas. Mesmo a glicose, que para os peixes teleósteos é um importante substrato energético (Da Silveira et al., 2009; Deck et al., 2016), não foi afetada pelo estado reprodutivo das arraias cururu. Contudo, os teores de glicose são mais facilmente influenciados pelo estresse (Mazeaud e Mazeaud, 1981; Morgan e Iwama, 1997; Wendelaar Bonga, 1997), bem como pela dieta do animal (Deck et al., 2016). Além disso, a baixa concentração plasmática de glicose ($<0,25$ mmol/L) nas arraias de água doce neotropicais concorda com os achados de Griffith et al. (1973), que relatou que a glicose pode ter um papel limitado como substrato energético neste elasmobrânquio. Por outro lado, a gravidez parece estimular a mobilização de sais

minerais materno para o embrião. Apesar dos valores de Kn sugerir que as fêmeas grávidas possam estar embomestado nutricional, a mobilização de elementos minerais para a formação decartilagem e outros tecidos do feto aumentou durante este período. Os íons plasmáticos, especialmente cálcio (Ca^{2+}), cloreto (Cl^-) e magnésio (Mg^{2+}) estão em baixa concentração nas fêmeas grávidas. Estas características também são semelhantes às observadas em mamíferos (Cormick et al., 2018). Na contramão, a ureia pode ter um papel importante durante a gravidez da arraia cururu. Embora os potamotrigonídeos sejam amoniotéticos (e não ureotéticos como nas formas marinhas), têm-se sugerido que a retenção de ureia nos fluidos corporais das arraias de água doce possa ajudar a regular algumas propriedades biológicas do corpo destes animais, como o fluxo ureogênico da espécie em formação (Duncan et al., 2009). Portanto, o aumento na concentração da ureia no plasma das fêmeas grávidas deve-se às atividades ureogênicas tanto materna, quanto embrionária.

Os lipídios estão entre os mais importantes substratos envolvidos na reprodução. Especialmente devido ao seu papel estrutural e como fonte de energia como para o desenvolvimento embrionário (Nelson e Cox, 2014). A correlação positiva entre o IHS e a concentração de triacilgliceróis (TGC) plasmáticos reforça o papel do fígado como importante órgão de reserva de energia para o período de gravidez. Diferente dos peixes teleósteos, elasmobrânquios não armazenam lipídeos na cavidade visceral, nem na musculatura (Sheridan, 1988). Portanto, o fígado passa a ser o principal tecido de reserva lipídica nas arraias. Nossos dados sugerem que a mobilização de lipídeos (TGC e colesterol totais) a partir do fígado para os úteros aumenta significativamente no final da gravidez. Como as arraias de água doce Neotropicais apresentam histotrofia matrotrofica (Del Mar Pedreros-Sierra et al., 2016; Da Silva et al., 2016), os substratos provenientes das células de nutrição nos trofonemas devem suprir o embrião, uma vez que nesta fase o saco vitelínico residual já não possui reserva energética o suficiente para o desenvolvimento do feto (Babel, 1967; Spieler et al., 2013).

TGC é a principal classe de lipídios neutros em peixes (Sheridan, 1988). Em peixes teleósteos, ocorre uma intensa mobilização de TGC hepático durante a fase de desenvolvimento gonadal (Sharpe & MacLatchy, 2007). Na arraia cururu, o desenvolvimento embrionário exigiu uma intensa mobilização de lipídios a partir do fígado, conseqüentemente ocorreu uma redução significativa da massa hepática após o parto.

5.4 A concentração de gonadotrofinas no plasma materno

Como nos demais vertebrados, a reprodução nos condríctios é regulada pelo

eixo HHG (hipotálamo-hipófise-gônadas). Contudo, diferente dos demais vertebrados, elasmobrânquios não possuem uma conexão direta (neural ou sangue portal) entre o hipotálamo e o lobo ventral da hipófise (Forlano et al., 2000). Isto sugere que a síntese e liberação das gonadotrofinas (GTHs), hormônios folículo estimulante (FHS) e luteinizante (LH) sejam reguladas pela concentração sistêmica de hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH) (Moeller & Meredith, 1998). Métodos imunohistoquímicos têm revelado a presença de GTHs (gonadotrofinas) no lobo ventral da hipófise de elasmobrânquios (Mellinger & DuBois, 1973). Contudo, foi demonstrado que a hipofisectomia experimental não suprime completamente a gametogênese ou esteroidogênese em elasmobrânquios (Dobson & Dodd, 1977). Portanto, aumenta o debate de uma provável conexão direta hipotálamo-gônada por meio do GnRH (Demski et al., 1997). Isto pode ser especialmente importante nos Rajiformes, uma vez que o lobo ventral da hipófise é pouco desenvolvido. Em nosso estudo, concentrações de GTHs foram quantificáveis no plasma da arraia cururu. Porém, os níveis de FSH e LH não variaram em função do estado reprodutivo das fêmeas. Além disso, não conseguimos mostrar uma relação clara entre as concentrações GTHs circulantes e os níveis de esteroides plasmáticos de *P. wallacei*. Alguns autores têm mostrado apenas um papel discreto das GTHs na esteroidogênese e gametogênese de elasmobrânquios (Dobson & Dodd, 1977). Além do mais, até o presente momento nenhum receptor de GTHs foi isolado em elasmobrânquios (Maruska e Gelsleichter, 2010).

5.5 O papel dos hormônios esteroides durante agestação

Vários estudos têm demonstrado que os hormônios esteroides reprodutivos afetam o metabolismo dos lipídios (Palmisano et al., 2017). Em nosso estudo, observamos que as fêmeas de *P. wallacei* com elevados teores dos hormônios esteroides plasmáticos 17β -Estradiol (E_2) e progesterona (P_4) apresentavam baixo conteúdo de lipídeos (TGC e colesterol totais) plasmáticos. Como o nível de E_2 plasmático não foi afetado pelo período de gestação, uma explicação para esta ação pode ser baseada em estudos recentes. Por exemplo, o 17β -estradiol (E_2) estimula a expressão de receptores de LDL (LDLR) hepático contribuindo com a diminuição de colesterol plasmático (Palmisano et al., 2017). Além disso, o E_2 inibe a expressão da apolipoproteína APOB (Concha et al., 2014), consequentemente reduzindo o transporte das frações lipídicas VLDL, IDL e LDL, especialmente ricas em colesterol e triacilgliceróis (Walldius, 2012). Acredita-se também que os progestágenos também desempenham um papel semelhante (Wang et al., 2009). O padrão encontrado na arraia cururu difere dos relatos descritos para peixes teleósteos. Por exemplo, fêmeas

de *Carassius auratus* submetidas ao tratamento com E₂ apresentam um aumento de TGC e colesterol plasmático (Sharpe & MacLatchy, 2007).

Assim como nos demais vertebrados, esteroides sexuais incluindo o E₂, testosterona (T) e P₄ são produzidos por vários tipos celulares, tais como células da granulosa, células da teca e *corpus luteum* de elasmobrânquios (Maruska & Gelsleichter, 2011). Estudos *in vitro* com células da granulosa e da teca de batoides marinhos demonstraram intensa atividade esteroidogênica com síntese de E₂ (Lutton et al., 2005). Porém, a T em fêmeas pode ser sintetizada pelas células foliculares e da teca (Callard et al., 1993), enquanto o *corpus luteum* é a fonte primária de P₄ (Callard et al., 1992).

Sugere-se que o pico de E₂ em elasmobrânquios vivíparos ocorre durante o desenvolvimento folicular, possivelmente regulando a síntese da vitelogenina (Kikuyama, & Carnevali, 2004). Após a fase de crescimento folicular, os níveis circulantes de E₂ caem logo após a ovulação e/ou início da gravidez e permanecem baixos ao longo da gravidez em algumas espécies de elasmobrânquios, tais como nos tubarões *Squalus acanthias* e *Sphyrna tiburo* e na arraia marinha *Dasyatis sabina* (Koob & Callard, 1999). Na maioria dos elasmobrânquios marinhos, os níveis de P₄ só aumentam próximo à ovulação (Mull et al., 2010). Um estudo mais detalhado com *Dasyatis sabina* revelou que o pico de E₂ e P₄ só ocorre próximo à ovulação e no momento do parto (Tricas et al., 2000). Em outras palavras, os níveis de estes esteroides permanecem baixos durante a gravidez. De maneira semelhante, tanto E₂, quanto P₄ apresentaram baixos valores durante a gravidez da arraia cururu, especialmente na fase final da gestação, porém aumentam após o parto e se mantem constante durante a fase de repouso reprodutivo. Mais recentemente, este mesmo padrão também foi demonstrado para a arraia *Urobatis halleri*, outra espécie marinha que também apresenta histotrofia matrotrófica (Lyons & Wynne-Edwards, 2019). Concentrações maiores de E₂ e P₄ nas fêmeas pós-parto sugerem que estes esteroides podem estar relacionados à preparação do útero para o parto, uma vez que podem atuar em conjunto com a relaxina relaxando a parede uterina e facilitar a passagem do embrião durante o parto em mamíferos (Winn et al., 1994).

Vários andrógenos, tais como a testosterona (T), 11-cetotestosterona (11-CT) e 5 α -dihidrotestosterona (DHT) foram estudados em elasmobrânquios. As hipóteses mais comuns para a ação destes esteroides incluem modulação do comportamento de cópula e agressividade em fêmeas (Rasmussen et al., 1999). Ainda não está muito claro o papel da T e do 11-CT nos elasmobrânquios (Maruska & Gelsleichter, 2011). No caso da T, assume-se como sendo o precursor do E₂; enquanto o 11-CT é o principal hormônio androgênico funcional em peixes teleósteos, mas também está

profundamente relacionado à modulação do comportamento agressivo (Soranganba & Singh, 2019).

5.6 A relação materno-fetal: hormônios e nutrientes

Uma análise concomitante da composição do plasma e do fluido uterino pode ser um excelente indicador do metabolismo materno e sua relação com o desenvolvimento embrionário. Por exemplo, os níveis de GTHs (FSH e LH) no plasma materno circulam em concentrações três vezes mais elevadas que o fluido uterino. Mas a presença de GTHs no fluido uterino sugere que estes hormônios podem atravessar a barreira útero-fluido e possivelmente atuar sobre o desenvolvimento embrionário. Infelizmente, até o presente momento não existem dados na literatura sobre registro de GTHs no fluido uterino de elasmobrânquios. Por outro lado, a concentração dos hormônios esteroides no fluido uterino está ligeiramente maior que no plasma. Isto sugere que estes esteroides podem acumular neste líquido e atuar diretamente nos trofonemas estimulando a suprimimento de nutrientes para o feto. Por exemplo, a concentração de componentes minerais plasmáticos, tais como Ca^{2+} e Mg^{2+} são significativamente menores que no fluido uterino das fêmeas no início da gravidez, mas não na fase mais tardia da gestação. Isto significa que a mobilização dos componentes minerais da cartilagem ocorre mais intensamente no começo da gestação. Nossos estudos corroboram os trabalhos já relatados para espécies que apresentam histotrofia matrotrofica. O embrião recebe suprimento adicional de nutrientes materno, com isso ganha peso seco. Por outro lado, espécies lecitotróficas (a fonte nutricional para o desenvolvimento do embrião deriva do vitelo) o embrião tende a perder cerca de 20% peso seco durante o período de gestação (Hamlett et al., 2005).

6. CONCLUSÕES

A fecundidade uterina aumenta com o tamanho da arraia, ou seja, quanto maior a mãe mais embriões ela pode comportar.

As fêmeas em pós-parto estão extremamente debilitadas, demonstrado pelo seu baixo valor de condição corporal (Kn), massa hepática (IHS) e lipídios.

Como o fígado nas arraias sintetiza e armazena lipídios seu menor tamanho após o parto se deve ao elevado custo reprodutivo, observado pelos baixos valores de TGC e colesterol.

A mobilização de sais minerais na gravidez, para a formação de estruturas embrionárias são prováveis, uma vez que o cálcio e o magnésio estavam baixos nesse período.

Dos compostos nitrogenados, a uréia teve maior concentração na gestação de *P. wallacei*, sugerindo que este metabólito possa estar atuando sob atividades ureogênicas.

As gonadotrofinas apesar de detectadas no plasma e fluido uterino não apresentaram variação ao longo dos estágios reprodutivos das fêmeas.

Observamos que as fêmeas com baixas concentrações de E_2 e P_4 tinham elevados níveis de TGC e colesterol, explicando a correlação inversa entre P_4 e colesterol.

Dos hormônios esteróides apenas a testosterona e a progesterona variaram em função do estágio reprodutivo, o andrógeno é o precursor do estradiol e o progestágeno pode estar atuando na manutenção da gravidez e preparo ao parto.

O período reprodutivo influenciou os valores de Kn e IHS, bem como os níveis de triacilgliceróis e colesterol total no plasma das fêmeas.

6.1 Implicações para a conservação biológica

Historicamente, a arraia cururu tem sido explorada como peixe ornamental para o mercado internacional (Araújo, 1998). Acredita-se que no período de dez anos (1998 a 2008), quase 200 mil exemplares foram removidos dos seus habitats (Duncan et al., 2016). Estima-se que a venda desta espécie pode ter gerado uma receita de US\$ 20 milhões para os exportadores locais. Após a crise mundial de 2008 e o crescimento do setor de pesca ornamental nos mercados asiáticos, a captura de arraia cururu para finalidade ornamental tornou-se mais restrita (Duncan et al., 2016). Atualmente, ainda se encontra regulamentada por um sistema de cotas estabelecidas pelo MPA e sua pesca é mais esporádica. Mas algumas práticas perversas foram adotadas nas áreas de pesca para aumentar o esforço de captura, tais como os abortos induzidos mecanicamente.

Nossos estudos baseados na fisiologia hormonal revelam aspectos frágeis da biologia reprodutiva da arraia cururu. Devido ao modo de reprodução do tipo histotrofia matrotrofica, a fêmea supre o feto produzindo e/ou transferindo vários compostos nutricionais. Dessa forma, esta arraia promove um elevado investimento na produção de poucos neonatos. Portanto, o custo da reprodução é extremamente elevado, se comparado aos potamotrigonídeos de grande porte. O alto investimento reprodutivo sugere que as populações da arraia cururu podem ser extremamente dependentes da qualidade ambiental. Portanto, a pesca negativa (captura ou morte do animal sem uso racional do recurso), a pesca dirigida sobre as fêmeas podem representar os principais perigos para a conservação desta espécie.

7. REFERÊNCIAS

- Acevedo, K., Bohórquez-Herrera, J., Moreno, F., Moreno, C., Molina, E., Grijalba-Bendeck, M. & Gómez-Canchong, P. 2007. Tiburones y rayas (subclase Elasmobranchii) descartados por la flota de arrastre camaronero en el Caribe de Colombia. *Acta Biologica Colombiana* 12, 7–81.
- Amaral, J.S. 2009. Esteróides gonadais e metabolismo lipídico ao longo do ciclo reprodutivo de *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) em ambiente natural. Dissertação de mestrado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.
- Andrade-Talmeli, E.F. Fenerich-Verani, N. & Verani, R.J. 1998/1999. Fator de condição relativo (Kn): Um critério para selecionar fêmeas de Piabanha, *Brycon insignis* (Steidachner, 1876) (Pisces: Bryconidae) para indução reprodutiva. *Boletim do Instituto de Pesca. São Paulo*. 25(único):95-99.
- Araújo, M.L.G. 1998. Biologia Reprodutiva e Pesca de *Potamotrygon* sp. C (Chondrichthyes—Potamotrygonidae), no Médio Rio Negro, Amazonas. Unpublished M. Sc. Thesis. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia & Universidade do Amazonas, Manaus, 171 pp.
- Babel, J.S., 1967. Reproduction, life history, and ecology of the round stingray, *Urolophus halleri* Cooper. *Fish Bull.* 1–104.
- Baldisserotto, B.; Cyrino, J. & Urbinati, E. 2014. Biologia e Fisiologia de Peixes Neotropicais de Água Doce. Ed. FUNEP, Jaboticabal.
- Ballantyne, J.S. 2016. Jaws II: metabolism of elasmobranchs. In: Shadwick, R.E., Farrell, A.P., Brauner, C.J. (eds) *Physiology of elasmobranch fishes: internal processes*, 1st ed. Academic Press, United States, pp 395–456.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72 (1-2), 248-254.
- Callard, I.P., Fileti, L.A., Perez, L.E., Sorbera, L.A., Giannoukous, G., Klosterman, L.L., Tsang, P., McCracken, J.A., 1992. Role of *Corpus luteum* and progesterone in the evolution of vertebrate viviparity. *Am. Zool.* 32, 264–275.
- Callard, G.V., Fileti, L.A., Koob, T.J., 1993. Ovarian steroid synthesis and the

- hormonal control of the elasmobranch reproductive tract. *Environ. Biol. Fishes* 38, 175– 185.
- Carrier, J., Aubin, C. E., Villemure, I., & Labelle, H. 2004. Biomechanical modelling of growth modulation following rib shortening or lengthening in adolescent idiopathic scoliosis. *Medical and biological engineering and computing*, 42(4), 541-548.
- Carvalho, M.D., Rosa, R.S., & Araújo, M.L. 2016. A new species of Neotropical freshwater stingray (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) from the Rio Negro, Amazonas, Brazil: the smallest species of *Potamotrygon*. *Zootaxa*, 4107(4), 566- 586.
- Carvalho, M. R., Loboda, T. S., Silva, J. P. C. B., 2016. A new subfamily, Styracurinae, and new genus, Styracura, for *Himantura schmardae* (Werner, 1904) and *Himantura pacifica* (Beebe & Tee-Van, 1941)(Chondrichthyes: Myliobatiformes). *Zootaxa* 4175(3), 201-221.
- Charvet-Almeida P., Araujo M.L.G., & Almeida M.P. 2005. Reproductive aspects of freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) in the Brazilian Amazon Basin. *J Northw Atlan Fish Sci* 35: 165–171.
- Chellappa, R., Wilson, C. L., & Sirohey, S. 1995. Human and machine recognition of faces: A survey. *Proceedings of the IEEE*, 83(5), 705-740.
- Cormick, G., Betrán, A. P., Romero, I. B., Lombardo, C. F., Gülmezoglu, A. M., Ciapponi, A., & Belizán, J. M. (2019). Global inequities in dietary calcium intake during pregnancy: a systematic review and meta-analysis. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 126 (4), 444-456.
- Da Silva, M.I.; Oliveira, M.I.B.; Costa, O.T.F. & Duncan, W.L.P. 2017. Morphology and Morphometry of the Ovaries and Uteri of the Amazonian Freshwater Stingrays (Potamotrygonidae: Elasmobranchii). *The Anatomical Record*, 300(2): p. 265-276.
- Da Silveira, U. S., Logato, P. V. R., & da Conceição Pontes, E. 2009. Utilização e metabolismo dos carboidratos em peixes. *Revista Eletrônica Nutritime*, 6(1), 817- 836.
- Deck, C. A., LeMoine, C. M., & Walsh, P. J. 2016. Phylogenetic analysis and tissue distribution of elasmobranch glucose transporters and their

- response to feeding. *Biology open*, 5(3),256-261.
- Dehart, A. 2004 Species Selection and Compatibility. In: SMITH, M.; WARMOLTS, D.; THONEY, D.; HUETER, R. The Elasmobranch Husbandry Manual: Captive Care of Sharks, Rays and their Relatives. Ohio Biological Survey: Columbus. p. 15-23.
- Del Mar Pedreros-Sierra, T., Arrieta-Prieto, D. M., & Mejía-Falla, P. A. 2016. Reproductive system of females of the Magdalena river endemic stingray *Potamotrygon magdalenae*: Anatomical and functional aspects. *Journal of morphology*, 277(5), 680-697.
- Demski, L. S., Beaver, J. A., Sudberry, J. J., & Custis, J. R., 1997. GnRH systems in cartilaginous fishes. In I. S. Parhar, & Y. Sakuma (Eds.), *GnRH Neurons: Gene to Behavior*, (pp. 123-143), Tokyo, Japan.
- Dinesh, B., M. Ramesh & R.K. Poopal, 2013. Effect of ammonia on the electrolyte status of an Indian major carp *Catla catla*. *Aquaculture Research* 44:1677–1684.
- Dobson, S.; Dodd, J.M. 1977. Endocrine control of the testis in the dogfish *Scylliorhinus canicula* L. I. Effects of partial hypophysectomy on gravimetric, hormonal and biochemical aspects of testis function. *Gen. Comp. Endocrinol.* 32, 41–52.
- Duncan, W.L.; Shibuya, A.; Araújo, M.L.G. 2016. *Biologia e História Natural de Potamotrygon wallacei* (Carvalho, Rosa e Araújo, 2016) na Bacia do Rio Negro, Amazônia Central, Brasil. In: Lasso C.A.; Rosa R.S.; Morales-Betancourt, M.A.; Garrone-Neto, D. Y Carvalho, M., editors. Bogota: Instituto de Investigacion de los Recursos Biologicos Alexander von Humboldt. p 39–47. XV. Rayas de Agua Dulce (Potamotrygonidae) de Suramérica. Parte II: Colombia, Brasil, Perú, Bolivia, Paraguay, Uruguay y Argentina. Bogotá: Instituto de Investigacion de los Recursos Biologicos Alexander von Humboldt. p. 289-301.
- Duncan, W.P., Costa, O.T.F., Araújo, M.L.G., & Fernandes, M.N. 2009. Ionic regulation and Na⁺/K⁺-ATPase activity in gills and kidney of the freshwater stingray *Paratrygon aiareba* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) living in white and blackwaters in the Amazon basin. *J Fish Biol*, 74, 956-960.
- Dunn, O. J. 1964. Multiple comparisons using rank sums. *Technometrics*, 6(3),

241- 252.

- Forlano, P.M., Maruska, K.P., Sower, S.A., King, J.A., Tricas, T.C., 2000. Differential distribution of gonadotropin-releasing hormone-immunoreactive neurons in the stingray brain: functional and evolutionary considerations. *Gen. Comp. Endocrinol.* 118, 226–248.
- Froese, R. 2006. Cube law, condition factor and weight–length relationships: history, metaanalysis and recommendations. *Journal of Applied Ichthyology*, 22(4):241-253.
- Griffith, R. W., Pang, P. K., Srivastava, A. K., & Pickford, G. E. 1973. Serum composition of freshwater stringrays (Potamotrygonidae) adapted to fresh and dilute sea water. *The Biological Bulletin*, 144(2),304-320.
- Hamlett, W. C., Kormanik, G., Storrie, M., Stevens, B., & Walker, T. I. 2005. Chondrichthyan parity, lecithotrophy and matrotrophy. *Reproductive biology and phylogeny of Chondrichthyes: sharks, batoids and chimaeras*, 3, 395-434.
- Jenni-Eiermann, S., Jenni, L., Piersma, T. 2002. Plasma metabolites reflect seasonally changing metabolic processes in a long-distance migrant shorebird (*Calidris canutus*). *Zoology*, 105(3): 239-246.
- Koob, T.J., Callard, I.P., 1999. Reproductive endocrinology of female elasmobranchs: lessons from the little skate (*Raja erinacea*) and spiny dogfish (*Squalus acanthias*). *J. Exp. Zool.* 284, 557–574.
- Le Cren, E. D. 1951. The length-weight relationship and seasonal cycle in gonadal weight and condition in the perch (*Perca fluviatilis*). *J. Anim. Ecol.*, 20: 201-219.
- Lutton, B.V., George, J.S., Murrin, C.R., Fileti, L.A., Callard, I.P., 2005. The elasmobranch ovary. In: Hamlett, W. (Ed.), *Reproductive Biology and Phylogeny of Chondrichthyes: Sharks, Batoids, and Chimaeras*. Science Publisher Inc., Einfeld, NH, pp. 237–281.
- Lyons, K. & Wynne-Edwards, K.E. 2019. Steroid concentrations in maternal serum and uterine histotroph in round stingrays (*Urolophus halleri*). *General and Comparative Endocrinology*. 274: 8-16.
- Maruska, K. P., & Gelsleichter, J. 2010. Hormones and reproduction in

chondrichthyan fishes. Hormones and reproduction of vertebrates, 1, 209-37.

McPherson R.A. Proteínases específicas. In: Henry JB. Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais. 18a ed. São Paulo: Manole; 1999. p.245-60

McWilliams, S.R., Guglielmo, C., Pierce, B., Klaassen, M. 2004. Flying, fasting, and feeding in birds during migration: a nutritional and physiological ecology perspective. *Journal of Avian Biology*, 35 (5):377-393.

Mellinger, J., & MP, D. 1973. Confirmation, par l'immunofluorescence, de la fonction corticotrope du lobe rostral et de la fonction gonadotrope du lobe ventral de l'hypophyse d'un poisson cartilagineux, la torpille marbrée (*Torpedo marmorata*).

Melvin, J. C., Seth, D., Holmberg, L., Garmo, H., Hammar, N., Jungner, I., ...& Van Hemelrijck, M. (2012). Lipid profiles and risk of breast and ovarian cancer in the Swedish AMORIS study. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 21(8), 1381-1384.

Moeller, J. F., & Meredith, M. 1998. Increase in gonadotropin-releasing hormone (GnRH) levels in CSF after stimulation of the nervus terminalis in Atlantic stingray, *Dasyatis sabina*. *Brain research*, 806 (1), 104-107.

Mull, C.G., Lowe, C.G., Young, K.A., 2010. Seasonal reproduction of female round stingrays (*Urobatis halleri*): steroid hormone profiles and assessing reproductive state. *Gen. Comp. Endocrinol.* 166, 379–387.

Murphy, V.E., Smith, R., Giles, W.B., Clifton, V.L., 2006. Endocrine regulation of human fetal growth: the role of the mother, placenta, and fetus. *Endocr. Rev.* 27, 141–169.

Nagahama, Y. & M. Yamashita. 2008. Regulation of oocyte maturation in fish. *Developmental Growth and Differentiation* 50: 195-219.

Nelson, D.L., Cox, M.M. 2014. Princípios de bioquímica de Lehninger. Artmed Editora.

Palmisano, B. T., Zhu, L., & Stafford, J. M. 2017. Role of estrogens in the regulation of liver lipid metabolism. In *Sex and gender factors affecting*

- metabolic homeostasis, diabetes and obesity (pp. 227-256).Springer, Cham.
- Pope, K.L. & Kruse, C.G. 2001.Assessment of fish condition data. Pp. 51-56, In: C. Guy & M. Brown (eds.). Statistical analyses of freshwater fisheries data. American Fisheries Society Publication, North Bethesda, MD. 74p.
- Ranzi, S. 1935. Risultati di ricerche su varie forme di gestazione.Bolletino di Zoologia 6, 153–157.
- Rasmussen, L.E.L., Hess, D.L., Luer, C.A., 1999. Alterations in serum steroid concentrations in the clearnose skate, *Raja eglanteria*: correlations with season and reproductive status. J. Exp. Zool. 284, 575–585.
- Santander-Neto, J. Araújo, M.L.A. & Lessa, R.P. 2016. Reproductive biology of *Urotrygon microphthalmum* (Batoidea: Urotrygonidae) from north-eastern Brazil, tropical west Atlantic Ocean. Journal of Fish Biology (2016) 89, 1026–1042.
- Scherle W - A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. Mikroskopie 1970; 26: 57-63.
- Sharpe, R. L., & MacLatchy, D. L. 2007. Lipid dynamics in goldfish (*Carassius auratus*) during a period of gonadal recrudescence: effects of β -sitosterol and 17 β -estradiol exposure. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 145(4), 507-517.
- Sheridan, M. A. 1988. Lipid dynamics in fish: aspects of absorption, transportation, deposition and mobilization. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 90(4), 679-690.
- Shibuya, A. 2009.Morfologia funcional dos mecanismos de alimentação em raias Myliobatoidei, com ênfase em espécies de Potamotrygonidae do médio rio Negro.
- Shibuya, A., & Zuanon, J. 2013. Catfishes as prey items of Potamotrygonid stingrays in the Solimões and Negro rivers, Brazilian Amazon.Biota Neotropica, 13(1), 376- 379.
- Soranganba, N & Singh. 2019. Role of Some Steroidogenic Hormones in Fish Reproduction.

- Concha, M. I., Smith, V. J., Castro, K., Bastías, A., Romero, A., & Amthauer, R. J. 2004. Apolipoproteins A-I and A-II are potentially important effectors of innate immunity in the teleost fish *Cyprinus carpio*. *European journal of biochemistry*, 271(14), 2984-2990.
- Seth, D., Garmo, H., Wigertz, A., Holmberg, L., Hammar, N., Jungner, I., ...& Van Hemelrijck, M. (2012). Lipid profiles and the risk of endometrial cancer in the Swedish AMORIS study. *International journal of molecular epidemiology and genetics*, 3(2), 122.
- Souza, M.H.L. & Elias, D.O. 2006. Capítulo 7. Fisiologia da água e dos eletrólitos. In: Souza, M.H.L. & Elias, D.O. 2006. *Fundamentos da Circulação Extracorpórea – Cirurgia Cardíaca Pediátrica*. 2 ed. Centro Editorial Alfa Rio. P. 139-147.
- Spieler, R.E., Fahy, D.P., Sherman, R.L., Sulikowski, J.A., Quinn, T.P., 2013. The Yellow Stingray, *Urobatis jamaicensis* (Chondrichthyes: Urotrygonidae): a synoptic review. 47. pp. 67–97
- Stevenson, R.D., Woods Jr, W.A. 2006. Condition indices for conservation: new uses for evolving tools. *Integrative and Comparative Biology*, 46: 1169-1190.
- Tricas, T.C., Maruska, K.P., Rasmussen, L.E.L., 2000. Annual cycles of steroid hormone production, gonad development, and reproductive behavior in the Atlantic stingray. *Gen. Comp. Endocrinol.* 118, 209–225.
- Wang, X., Magkos, F., & Mittendorfer, B. 2011. Sex differences in lipid and lipoprotein metabolism: it's not just about sex hormones. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 96(4), 885-893.
- Wiegand, M. D. 1996. Composition, accumulation and utilization of yolk lipids in teleost fish. *Reviews in fish biology and fisheries*, 6(3), 259-286.
- Winn, R J; Baker, M D e Sherwood, O D. 1994. Individual and combined effects of relaxin, estrogen, and progesterone in ovariectomized gilts. I. Effects on the growth, softening, and histological properties of the cervix. *Endocrinology*, Volume 135, Issue 3, 1 September 1994, Pages 1241–1249,

- Wood, C. M., Matsuo, A. Y., Gonzalez, R. J., Wilson, R. W., Patrick, M. L., & Val, A. L. 2002. Mechanisms of ion transport in *Potamotrygon*, a stenohaline freshwater elasmobranch native to the ion-poor blackwaters of the Rio Negro. *Journal of Experimental Biology*, 205(19), 3039-3054.
- Young, G., Kusakabe, M., Nakamura, I., Lokman, P.M., Goetz, F.W. 2005. Gonadal Steroidogenesis in Teleost Fish. In: *Hormones and their Receptors in Fish Reproduction*. Melamed, P., Sherwood, N., World Scientific Publishing Co. Pte. Ltda. 1° ed. Singapore. p.155-223.
- Zar, J.H. 2009. *Bioestatistical Analysis*. Fifth Edition, EUA. Prentice Hall Editor. 944 p.