

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA A
DURANTE A MATURAÇÃO GONADAL DE
FÊMEAS DE *Astyanax altiparanae*
(Characiformes: Characidae)**

Joseane da Silva

Jaboticabal, SP

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA A
DURANTE A MATURAÇÃO GONADAL DE
FÊMEAS DE *Astyanax altiparanae*
(Characiformes: Characidae)**

Joseane da Silva

Orientadora: Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira Whitton

Coorientador: Prof. Dr. Daniel de Magalhães Araujo

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP – CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre.

Jaboticabal, SP

2019

Silva, Joseane
S586s Suplementação de vitamina A durante a maturação gonadal de
fêmeas de *Astyanax altiparanae* (Characiformes: Characidae) /
Joseane da Silva. -- Jaboticabal, 2019
61 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de
Aquicultura, 2019
Orientadora: Renata Guimarães Moreira Whitton
Coorientador: Daniel de Magalhães Araujo
Banca examinadora: Renato Massaaki Honji, Taís da Silva Lopes
Bibliografia

1. Reprodução. 2. Vitamina A. 3. *Astyanax altiparanae*. I. Título. II.
Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3.043

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Jaboticabal/SP - Karina Gimenes Fernandes - CRB 8/7418

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

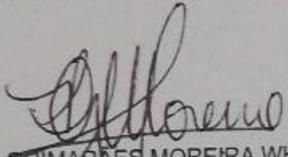
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA A DURANTE A MATURAÇÃO GONADAL DE FÊMEAS DE *Astyanax altiparanae* (Characiformes: Characidae)

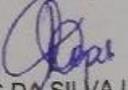
AUTORA: JOSEANE DA SILVA

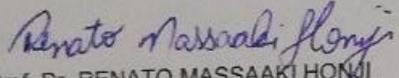
ORIENTADORA: RENATA GUIMARÃES MOREIRA WHITTON

COORIENTADOR: DANIEL DE MAGALHÃES ARAÚJO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AQUICULTURA, pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. RENATA GUIMARÃES MOREIRA WHITTON
Departamento de Fisiologia Geral / IB/USP, São Paulo-SP


Profa. Dra. TAÍS DA SILVA LOPES
Departamento de Aquicultura / Instituto Pesca, APTA, São Paulo-SP


Prof. Dr. RENATO MASSAAKI HONJI
Centro de Biologia Marinha, CBIMar / USP, São Paulo-SP

Jaboticabal, 24 de junho de 2019

Sumário

Dedicatória.....	7
Agradecimentos.....	8
Apoio financeiro.....	10
Resumo.....	11
Abstract.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. Nutrição e reprodução.....	13
1.2. As vitaminas.....	14
1.3. Vitamina A.....	15
1.4. <i>Astyanax altiparanae</i>	17
2. OBJETIVOS.....	20
2.1. Objetivo geral.....	20
2.2. Objetivos específicos.....	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1. Certificação de estudo.....	21
3.2. Dietas experimentais.....	21
3.3. Delineamento experimental.....	23
3.4. Instalações, manejo e condições experimentais.....	24
3.5. Coleta das amostras.....	25
3.6. Análise da concentração plasmática de 17 β Estradiol (E2).....	26
3.7. Índices Viscerossomático (IVS), Hepatosomático (IHS) e Gonadosomático.....	27
3.8. Análises Morfológicas.....	27
3.8.1. Histologia dos ovários.....	27
3.8.2. Cálculo da fecundidade e diâmetro dos oócitos.....	28
3.9. Análise de vitamina A.....	29
3.10. Análise da concentração plasmática de lipídios e lipoproteínas.....	30
3.11. Análise estatística.....	30
4. Resultados.....	31
4.1. Análise de vitamina A nas dietas e tecidos.....	31
4.2. Dados morfométricos, ponderais, índices corporais e E2.....	33

4.3. Fecundidade e diâmetros oocitário	36
4. 4. Análises lipídicas plasmáticas	38
4.5. Análises Histológicas dos ovários	41
DISCUSSÃO.....	47
Conclusão.....	52
Referências.....	53

Dedicatória

Ao ETERNO.

Aos meus pais Odaildo e Euzinete, aos meus irmãos Joserlarne, Gerlan e Jeanderson. Vocês são as pessoas mais importantes da minha vida, eu os amo mais do que poderia expressar em gestos ou palavras.

Tudo quanto te vier à mão para fazer, faze-o conforme as tuas forças, porque na sepultura, para onde tu vais, não há obra nem projeto, nem conhecimento, nem sabedoria alguma.

Eclesiastes 9:10 5

Agradecimentos

Ao Eterno pelo dom da vida, por ter me dado forças pra chegar até aqui.

Aos meus pais e irmãos pelo amor incondicional.

À Dra. Renata Guimarães Moreira Whitton pela orientação com maestria e inspiração profissional e pessoal. Renata, muito obrigada pelas oportunidades! Sou infinitamente grata ao Eterno pela benção que foi ter te conhecido, e a honra que foi trabalhar com você!

Dr. Daniel de Magalhães Araujo pela coorientação e amizade.

Ao Dr. Sergio Ricardo Batlouni por possibilitar a execução desse trabalho cedendo toda a estrutura física necessária para isso.

Ao Dr. José Eurico Possebon Cyrino por disponibilizar toda estrutura necessária na ESALQ/USP para a confecção das dietas desse trabalho.

À FAPESP pela concessão da bolsa de mestrado no país e pela BEPE.

Ao Vagner Alberto que sempre foi muito solícito e pronto a ajudar-me sempre que necessário.

À Dra. Gabriela Brambila de Souza pelo companheirismo, amizade e toda a contribuição ofertada nesse trabalho.

Ao Dr. Bruno Cavalheiro Araújo pela orientação na execução das rações e pelo apoio pessoal e profissional.

Agradeço especialmente a Paulo de Mello pelas poucas e importantes conversas que tivemos.

Ao Bruno Tadeu Marotta Lima por me orientar sempre que necessário, seja no sentido pessoal quanto profissional.

Aos meus amigos do LAMEROA, Aline Dal'Olio Gomes, Bianca Rangel, Carlos Eduardo Tolussi, Cecilia Bertacini, Diego Brito, Fernanda Mello, Giovana Branco, João Paulo Silva Pinheiro, Kainã Fagundes, Felipe, Marcela Penuela

Muñoz, Maria Escalante Rojas, Natália Pires, Raphaela Ribeiro, Renato Honji, Vagner, Victor Marques, Valquiria de Oliveira Pereira e Victoria Frachetta. Sou grata por terem me acolhido de forma tão generosa e me mostrar um ressignificado para palavra família.

A Ethiene Fernandes, essa pessoa maravilhosa com a qual criei laços de amizade que almejo levar para o resto da vida.

Aos moradores da casa Toca do estudante pelo acolhimento, amor e carinho que me foram ofertados durante esse período, especialmente a Nathalia Guimarães, Giovana Gatti, Caroline Rios, Caroline Pimentel, Isabelle Furtado, Isabelli Ribeiro, Fernando, Victor Fuly, João, Thales, Emerson Santos, Isadora Cavalcanti, Daniele Costa, Cheila Juliana, Lilian, Jhon Alarcón Ruda, Lauro Braz, Renan Correa, e Daniel Gaspar.

A Toca comunidade cristã e seus membros, em especial ao pastor José Libério, Juliane, Evaldo, Rebeca Boldrin e meu amigo e irmão Márcio Harley Kurossu.

Aos docentes e funcionários do Programa de Pós-graduação em Aquicultura da UNESP – Jaboticabal. Aos técnicos do CAUNESP, especialmente ao Valdeci, Márcio, Luiz e Sílvia.

Aos amigos do Programa de Pós-graduação do CAUNESP pelo companheirismo e amizade, especialmente a Andressa Tellechea, Dneson Ricardo, Daiane Vaneci, Thaís Oliveira, Rafael Romaneli, e Monique Virães. Tudo seria mais difícil sem vocês.

Agradeço de todo o meu coração a todos que de forma direta e/ou indireta contribuíram para a realização desse trabalho.

Muito obrigada.

Apoio financeiro

- CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Bolsa de mestrado (processo nº 131600/2017-6, 03/2017 a 12/2017)

- FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Bolsa de mestrado (processo nº 2017/14699-7, 12/2017 a 07/2019)

- FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - BEPE - Bolsa de Estágio e Pesquisa no Exterior (processo nº 2018/16584-5) 8

Resumo

Este estudo investigou a influência da suplementação de vitamina A sobre a maturação ovariana de fêmeas do lambari-do-rabo-amarelo, *Astyanax altiparanae*. 580 fêmeas adultas foram distribuídas em 10 tanques de 750 litros, compondo 5 tratamentos (duplicata). Foi formulada uma ração com baixo nível de vitamina A, as rações foram suplementadas com 0; 1.800; 3.600; 7.200 e 14.400 UI/kg de ração. Após 8 dias de ajuste às condições experimentais com dietas comerciais, os peixes receberam uma dieta sem suplementação de vitamina A durante 16 dias, para a depleção dessas reservas e em seguida os animais foram alimentados por 60 dias com os diferentes tratamentos. Indicadores de maturação gonadal como concentração plasmática de 17β -Estradiol (E2), índice gonadossomático (IGS), fecundidade e histologia ovariana foram analisados aos 30 e 60 dias. Além destes, indicadores metabólicos, como o índice hepatossomático (IHS), viscerossomático (IVS) e concentração plasmática de lipídios totais, triglicérides, colesterol total e frações também foram analisados nestes momentos. Os diferentes níveis de vitamina A alterou o padrão de deposição ovariana desta vitamina. A manutenção nas condições experimentais promoveu a maturação ovariana, avaliada pela histologia do ovário e IGS. As variáveis fisiológicas mostraram que a manutenção das fêmeas com uma dieta composta integralmente por ingredientes vegetais, reduziu a concentração plasmática de lipídio e colesterol total e o nível mais elevado de suplementação (14.400 UI/kg) reduziu ainda os níveis plasmáticos de LDL. Adicionalmente, uma concentração intermediária de suplementação (3.600 UI/kg), fornecida por 60 dias aumentou a concentração plasmática de E2, mas o mecanismo que modula esta alteração não foi estudado.

Palavras-chave: Estradiol, lambari, perfil lipídico, vitamina A.

Abstract

This study investigated the influence of vitamin A supplementation during the ovarian maturation of female *lambari-do-rabo-amarelo*, *Astyanax altiparanae*. 580 adult females were distributed in 10 tanks of 750 liters, composed by 5 treatments (duplicate). A basal diet with low level of vitamin A. The diet was supplemented with 0; 1,800; 3,600; 7,200 and 14,400 IU / kg of diet. After 8 days of adjustment to the experimental conditions with commercial diets, the fish received a diet without vitamin A supplementation for 16 days, for the depletion of these reserves and the animals were fed for 60 days with different treatments. Indicators of gonadal maturation, such as 17β -Estradiol (E2) plasma level, gonadosomatic index (GSI), fecundity and ovarian histology were analyzed at 30 and 60 days. Additionally, metabolic indicators such as hepatosomatic index (HSI), viscerosomatic index (VSI) and plasma concentration of total lipids, triglycerides, total cholesterol and fractions were also analyzed at these periods. Vitamin A supplementation levels altered the deposition levels of this vitamin in the ovaries. The maintenance in the experimental conditions promoted ovarian maturation, evaluated by ovary histology and GSI. The physiological variables evidenced that the maintenance of these females in the experiment, with a diet composed entirely of vegetable ingredients, reduced the plasma levels of total lipids and cholesterol, and the higher level of supplementation (14,400 IU / kg) reduce also LDL levels. In addition, an intermediate concentration of supplementation (3,600 IU / kg) administered for 60 days increased the plasma levels of E2, but the mechanism that modulates this alteration has not been studied.

Key words: Estradiol, lambari, lipid profile, vitamin A.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Nutrição e reprodução

O desenvolvimento gonadal dos peixes é influenciado pela qualidade nutricional dos alimentos ingeridos, desta forma o adequado atendimento das necessidades nutricionais das espécies, durante a maturação dos oócitos é determinante para a qualidade de ovos e larvas, podendo impactar no desenvolvimento dos animais até a fase adulta. Tendo em vista que as exigências metabólicas das espécies são mais específicas durante o período reprodutivo, as dietas devem ser balanceadas para atender às necessidades básicas de manutenção dos animais, mas também assegurar a oferta de nutrientes e a energia para a reprodução (Furuita et al., 2001).

Sabendo-se da influência da dieta sobre o desempenho reprodutivo dos peixes, a escolha e o balanceamento de nutrientes mais adequados aos processos metabólicos devem ser específicos para esta fase de desenvolvimento. Esta adequação é essencial para a obtenção de melhores índices reprodutivos, aumentando a disponibilidade de ovos, larvas e juvenis de melhor qualidade, contribuindo para uma produção economicamente viável (Navarro et al., 2010).

Alguns estudos são conduzidos com peixes tropicais com objetivo de aumentar o potencial de produção, mas poucos relacionam nutrição e parâmetros reprodutivos, mesmo sendo evidente que na gametogênese ocorre a transferência de nutrientes dos órgãos de reserva de substratos energéticos para os gametas (Izquierdo et al., 2001).

A reprodução em peixes, assim como nos demais vertebrados é modulada pelo eixo Hipotálamo - Hipófise – Gônadas (H-H-G). Neurônios hipotalâmicos sintetizam e liberam o hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH), hormônio inibidor de gonadotropinas (GnIH) e a dopamina, dentre os principais neuro-hormônios, que modulam a produção de gonadotropinas hipofisárias (hormônio folículo-estimulante, FSH e hormônio luteinizante, LH) que, por sua vez, modulam a síntese dos esteroides gonadais (estrógenos, progestágenos e andrógenos) (Zohar et al., 2010; Levavi-Sivan et al., 2010). Esse processo ocorre naturalmente e paralelamente ao desenvolvimento das gônadas, maturação, liberação e

fertilização dos gametas, 11 sendo que, em geral, nos teleósteos, a desova e a fertilização ocorrem no ambiente externo (Rocha & Rocha, 2006).

Os ovos fertilizados originam embriões e posteriormente larvas, que crescem e se tornam adultos, dando continuidade ao ciclo de vida. No eixo H-H-G, células especializadas dos testículos e folículos ovarianos sintetizam (sob modulação hipofisária) os hormônios esteroides, que são sintetizados a partir do colesterol. Os esteroides sintetizados nas gônadas pertencem a três classes, estrógenos, andrógenos e progestágenos. A concentração de andrógenos é em geral mais elevada nos machos, enquanto os níveis plasmáticos de estrógenos são mais elevados nas fêmeas. No entanto as três classes de esteroides estão presentes nos dois sexos, uma vez que a esteroidogênese é constituída por uma série de vias interdependentes. A via esteroidogênica é conservada em vertebrados, mas rotas complementares ocorrerem nos teleósteos, resultando em esteroides diferenciais. (Lubzens et al., 2010).

Dentre os esteroides, o 17 β -estradiol (E2) é um estrógeno de grande importância no processo de vitelogênese em teleósteos. O E2 estimula a síntese de vitelogenina (Vtg) hepática, uma glicolipofosfoproteína que é transportada no plasma e incorporada aos oócitos por endocitose. Já nos oócitos, a molécula é clivada em proteínas de vitelo, sendo que na maioria dos vertebrados, estas proteínas são a lipovitelina (Lv) e a fosvitina (Pv) (Reading et al., 2017). Desta forma, a qualidade e quantidade de substratos energéticos presentes nos tecidos de reserva das fêmeas é de grande importância na formação de gametas de qualidade, e assim a disponibilidade de alimentos é uma variável que pode influenciar significativamente a capacidade dos animais de reproduzir (Bromage et al., 2001).

1.2. As vitaminas

As vitaminas são nutrientes essenciais, pois não são produzidas pelo organismo e precisam ser ofertadas nas dietas. Elas são divididas em duas classes: as hidrossolúveis e as lipossolúveis. As hidrossolúveis são representadas pelas vitaminas do complexo B e a vitamina C, enquanto as 12 lipossolúveis são as

vitaminas A, D, E e K, sendo que A e D são precursoras de hormônios (Nelson & Cox, 2014). Ainda de acordo com estes autores a vitamina D3, também chamada de colecalciferol, é a única que, em seres humanos, é produzida na pele através de reações fotoquímicas catalisadas pelo componente UV da luz solar.

A vitamina D3 não é biologicamente ativa, porém é convertida por uma enzima no fígado transformando se em calcitriol, hormônio que faz a regulação de captação de cálcio. De forma geral, as vitaminas lipossolúveis são absorvidas no intestino conjuntamente com os lipídios da dieta e armazenadas no organismo e, quando ingeridas em quantidades superiores às necessidades metabólicas são armazenadas nos tecidos (Borba et al., 2012). As vitaminas são considerados compostos orgânicos essenciais, pois participam de processos biocatalíticos das células e são ingeridas em baixas quantidades (Moraes & Almeida, 2014).

Adicionalmente, as vitaminas apresentam funções importantes no metabolismo animal, visto que os níveis ideais nas dietas garantem o incremento corporal e a resistência às doenças (Peil et al., 2007). Como relatado até aqui, as vitaminas são componentes importantes no fornecimento de energia e atuam diretamente nos processos celulares. Considerando-se a demanda energética do processo reprodutivo, o conhecimento das exigências nutricionais dos reprodutores em termos de energia e vitaminas lipossolúveis é um fator de grande importância, com impacto na gametogênese, fecundidade, qualidade dos ovos e no desenvolvimento larval (Izquierdo et al., 2001).

1.3. Vitamina A

Dentre os compostos mobilizados durante a oogênese em teleósteos, encontram-se as vitaminas, dentre estas, a vitamina A. Esta vitamina é recrutada de tecidos periféricos e da musculatura, transportada por lipoproteínas, armazenada no fígado, sendo presente ainda no tecido adiposo dos animais, assim como em outros órgãos que armazenam lipídios, como os ovários (Irie & Seki, 2002), e depois serão incorporadas nos ovos.

A vitamina A é importante na regulação da transcrição de cerca de 500 genes envolvidos em vários processos biológicos, dentre eles o desenvolvimento folicular e embrionário em vertebrados 13 (Blomhoff & Blomhoff, 2006). A deficiência em vitamina A causa alterações no comportamento em peixes como, inquietação, nado errático e letárgico, anorexia, além de deformidades ósseas e hemorragias na pele e na base das nadadeiras, exoftalmia, anemia, além de déficit de crescimento e susceptibilidade a doenças (Hernandez et al., 2007, Saleh et al., 1995; Guimarães et al, 2013; Mohamed et al., 2003; Zhang et al., 2017).

A hipervitaminose de vitamina A ocasiona deformidades ósseas nas vértebras de peixes e retardo do crescimento, além de palidez e fragilidade nos tecidos hepáticos (Takeuchi et al., 1998, Dedi et al., 1995, Ørnsrud et al., 2002, Liu et al., 2016). Em reprodutores a carência dessa vitamina pode acarretar ainda problemas reprodutivos como infertilidade enquanto o excesso ocasiona má formação da prole (Clagett-Dame & DeLuca, 2002).

A vitamina A é uma denominação geral para compostos esterificados de retinol que desempenham atividades biológicas em três formas químicas: álcool (retinol), aldeído (retinal), e ácido (ácido retinoico) (Borba et al., 2012; Battisti et al., 2017). Como os peixes não são capazes de sintetizar a vitamina A, eles necessitam obtê-la na dieta, não só na concentração exigida, mas também na forma química adequada (Fernández & Gisbert, 2011). Esta vitamina é necessária para o crescimento, manutenção dos tecidos epiteliais, reprodução e desenvolvimento embrionário de peixes, sendo a quantidade presente no ovo um fator determinante para o desempenho reprodutivo (Palace & Werner, 2006).

O ácido retinóico é o metabólito ativo do retinol e age no núcleo onde se liga aos receptores específicos e participa da regulação da transcrição gênica (Lubzens et al., 2003). Além disso, o ácido retinóico regula uma variedade de funções biológicas incluindo diferenciação celular, proliferação e morfogênese (Haga et al., 2002). No processo da gametogênese, foi identificado um importante papel da vitamina A em desencadear a meiose em teleósteos (Li et al., 2016). Conforme avança a fase de maturação gonadal, aumenta a síntese de E2 pelos ovários, que é acompanhada por uma elevação da concentração plasmática de vitamina A e

depleção desta vitamina nos órgãos de estoque, devido ao transporte desta para os ovários (Palace & Werner, 2006).

A baixa disponibilidade da vitamina A pode causar retardamento no desenvolvimento gonadal, diminuição da taxa de fertilização dos oócitos e baixa taxa de eclosão larval em peixes. Em ambiente natural, durante as fases larvais, os peixes obtêm a vitamina A pela ingestão de caroteno (pró-vitamina A) contido no plâncton (fito e zooplâncton). Durante as fases juvenil e adulta existe outra forma de obtenção da vitamina A, que é o retinol, presente nos componentes da dieta (fitoplâncton, macrófitas e gorduras animais), conforme o hábito alimentar de cada espécie (Steffens, 1987).

Apesar de sua importância em sistemas biológicos, poucos estudos examinaram os efeitos da vitamina A em peixes e dentre os teleósteos nativos, os estudos se limitam à poucas espécies como *Rhamdia quelen* (Peil et al., 2007; Battisti et al., 2017), *Rhamdia voulezi* (Pessini et al., 2014), *Piaracatus mesopotamicus* (Signor et al., 2013; 2018) e *Salminus brasiliensis* (Koch et al., 2018). Considerando-se os efeitos da vitamina A nos processos reprodutivos de peixes, os estudos são ainda mais escassos, limitando-se também a poucas espécies, como *Danio rerio* (Alsop et al., 2008, Pradhan & Olsson 2015), *Oncorhynchus mykiss* (Fontagné-Dicharry et al., 2010), *Aristichthys nobilis* (Santiago & Gonzal, 2000) *Paralichthys olivaceus* (Furuita et al., 2001), sem informações até o momento para teleósteos nativos.

Desta forma, os estudos em relação às exigências nutricionais de vitamina A para reprodutores e sua influência sobre a qualidade dos gametas são limitados (Bobe & Labbé, 2010; Navarro et al., 2010).

1.4. *Astyanax altiparanae*

Dentre as espécies de peixes passíveis de cultivo em que os conhecimentos sobre a relação entre nutrição e reprodução são incipientes, pode-se incluir o lambari-do-rabo-amarelo, *Astyanax altiparanae* (Fig.1). O termo lambari é utilizado para designar uma gama de espécies do gênero *Astyanax*. Já foram descritas 258

espécies do gênero *Astyanax* (Eschmeyer, 2013), sendo no Brasil, o lambari-do-rabo-vermelho (*Astyanax fasciatus*) e o lambari-do-rabo-amarelo (*A. altiparanae*) as espécies de distribuição mais amplas (Araújo & Simoni, 1997).



Fig. 1. *Astyanax altiparanae* – fêmea adulta (15 cm)

O lambari-do-rabo-amarelo ou piaba, como é conhecido no nordeste brasileiro, foi anteriormente classificado como *Astyanax bimaculatus*, e pertence à família Characidae. Recebeu a nova nomenclatura de *Astyanax altiparanae* após revisão realizada por Garutti & Britski (2000).

Uma proposta está sendo feita para uma alteração do nome da espécie para *Astyanax lacustris* (Lucena & Soares, 2016). Como as questões relacionadas à sistemática do gênero *Astyanax* são muito complexas, e esta revisão de nome da espécie é ainda recente, nesse trabalho preconizou-se pela manutenção da classificação anterior até que seja estabelecida por completo a nova nomenclatura.

O lambari-do-rabo-amarelo é uma espécie rústica, de pequeno porte, com ciclo de vida rápido e apresenta elevada produtividade nos viveiros (Garutti, 2003), já foi considerado um invasor nas pisciculturas, mas atualmente é uma espécie reconhecida pelo seu grande potencial para aquicultura (Abimorad & Castellani, 2011). É uma espécie nativa do Brasil, com potencial zootécnico por apresentar características importantes como aceitar dietas artificiais, se ajustar em sistemas de cultivo, até mesmo de forma intensiva, além de ser onívora. É utilizada na pesca esportiva como isca viva e representa fonte proteica para comunidades ribeirinhas que sobrevivem da pesca (Porto-Foresti et al., 2005).

Essa espécie apresenta ciclo de vida rápido, atingindo a maturidade sexual com quatro meses (Garutti, 2003). Além disso, essa espécie se mostra como um excelente modelo biológico para estudos em reprodução de peixes, por ter uma

grande plasticidade e a capacidade de suas fêmeas se manterem vitelogênicas durante todo o ano em cativeiro (Jesus et al., 2017).

As fêmeas, quando mantidas a uma temperatura de $\pm 30^{\circ}\text{C}$, têm seus ovários remodelados e aptos à reprodução 6 dias após a desova (Lira et al., 16 2018), podendo assim obter várias desovas ao longo do ano, porém as desovas são mais frequentes durante o verão (Jesus et al., 2017). Apesar do melhor desempenho reprodutivo ocorrer no verão, Brambila-Souza et al., (2019) demonstraram que a manipulação térmica e a suplementação hormonal melhoram o desempenho reprodutivo desta espécie, mesmo no inverno.

Considerando-se o importante papel da vitamina A na fisiologia reprodutiva de teleósteos, a hipótese deste estudo é que a suplementação da dieta de fêmeas de *A. altiparanae* na fase de maturação gonadal, com esta vitamina, aumenta a sua deposição nos ovários e melhorar os indicadores de maturação ovariana.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Avaliar a influência da suplementação de vitamina A na maturação ovariana de fêmeas de lambari-do-rabo-amarelo (*A. altiparanae*).

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar como diferentes níveis de inclusão de vitamina A influenciam no armazenamento desta vitamina no fígado e nos ovários dos peixes;
- Avaliar os efeitos dos diferentes níveis de inclusão de vitamina A sobre índices morfofisiológicos da maturação ovariana;
- Avaliar os efeitos dos diferentes níveis de inclusão de vitamina A no perfil plasmático das lipoproteínas;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Certificação de estudo

A manutenção, utilização, sedação e eutanásia dos animais foram realizadas conforme o registro do Comitê de Ética e Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biociências da USP nº 305/2017.

3.2. Dietas experimentais

Uma ração base foi confeccionada com as referências descritas na Tabela 1. Essa ração base foi dividida em cinco lotes experimentais suplementados gradualmente com 0 (zero, vitamina A apenas dos ingredientes), 1800, 3600, 7200 e 14400 UI de vitamina A por quilograma de ração (T1 a T5) originando 5 tratamentos de acordo com o nível de suplementação. Foi utilizado acetato de retinol (Rhoster 500.000 UI/g) como fonte de vitamina A por ser uma das fontes mais estáveis desta vitamina, e pré-mistura vitamínica e mineral isenta de vitamina A (Premix Rhoster, isenta de vitamina A, balanceado conforme descrito no rodapé da tabela 1).

As dietas constituíram os cinco tratamentos, sendo cada um deles ofertado a 116 peixes (58 por unidade experimental, em duplicata). A ração base foi formulada exclusivamente utilizando-se ingredientes de origem vegetal por conterem baixos níveis de vitamina A, em comparação aos de origem animal, para que os níveis de suplementação fossem os maiores responsáveis pelo aporte da vitamina. As rações fornecidas aos diferentes grupos experimentais foram isonutricionais, com exceção dos níveis de vitamina A.

As rações foram formuladas para conter 29,53% de proteína bruta e 4.258,59 Kcal por kg de energia bruta. A formulação da dieta base está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Formulação e composição química da dieta base

Ingredientes	Inclusão (%)
Farelo de soja (45,00% Proteína Bruta)	55,01
Sorgo (Baixo tanino)	13,50
Quirera de arroz	10,50
Farelo de trigo	12,00
Óleo de soja	5,50
DL-Metionina	0,31
L-Treonina	0,31
Fosfato bicálcico	2,30
Suplemento vitamínico e mineral ¹	0,40
Cloreto de sódio	0,10
Vitamina C	0,05
BHT	0,02
Composição química calculada (Base na matéria natural)	
Energia bruta (kcal kg ⁻¹)	4.258,59
Proteína bruta (%)	29,53
Extrato etéreo (%)	7,30
Fibra bruta (%)	4,43
Cálcio total (%)	0,75
Fósforo disponível (%)	0,56

¹Suplemento vitamínico e mineral (por quilograma do produto): vit. D₃ 200.000 IU; vit. E 12.000 mg; vit. K₃ 2.400 mg; vit. B₁ 4.800 mg; vit. B₂ 4.800 mg; vit. B₆ 4.000 mg; vit. B₁₂ 4.800 mg; ácido fólico 1.200 mg; pantotenato de cálcio 12.000 mg; vit. C 48.000 mg; biotina 48 mg; colina 65.000 mg; niacina 24.000 mg; ferro 10.000 mg; cobre 600 mg; manganês 4.000 mg; iodo 20 mg; cobalto 2 mg e selênio 20 mg.

Para a confecção das rações (com exceção do óleo), os ingredientes foram moídos, peneirados em peneira de 0,5mm, homogeneizados em misturador horizontal e extrusados, resultando em pellets de 1,0mm. Após a extrusão, as rações foram secas em estufa com circulação forçada de ar por 24 horas em temperatura a 50°C, e resfriadas em temperatura ambiente. Pelo fato das vitaminas degradarem rapidamente quando expostas a altas temperaturas, optou-se por

acrescentar a vitamina A imersa em óleo, na forma de *coating* após o processo de extrusão.

As rações foram passadas novamente por uma peneira para ajustar a granulometria ao tamanho da boca dos peixes e em seguida foram pesadas e dispostas em dessecador respeitando o volume de 1,0 kg por etapa. Prontamente a vitamina A, diluída em 5,5% de óleo de soja (com auxílio de agitador e barra magnética) foi adicionada e misturada manualmente durante alguns minutos em ambiente com pouca luz, afim de que cada pellet contivesse as mesmas quantidades de vitamina A.

O dessecador foi conjugado a uma bomba de vácuo que foi ligada por quatro minutos para que houvesse a absorção do óleo nos pellets e conseqüentemente também da vitamina A (*coating*). Após este processo as rações foram ensacadas, identificadas conforme o tratamento e armazenadas em freezer a -20°C.

Todo o processamento de confecção da ração foi realizado na ESALQ/USP gentilmente autorizado pelo Prof. Dr. José Eurico Possebon Cyrino, do Departamento de Zootecnia.

3.3. Delineamento experimental

O experimento foi conduzido no Laboratório de Reprodução de Peixes Nativos do Centro de Aquicultura da UNESP – CAUNESP (21°15'17"S 48°19'20" W) nos meses de maio a julho de 2018 pelo período de 84 dias. Foram utilizadas 580 fêmeas de *A. altiparanae* com idade reprodutiva. Os animais, nascidos e criados no CAUNESP foram retirados dos viveiros escavados com rede de arrasto e transportados para o laboratório em sacos plásticos com água e oxigênio e distribuídos aleatoriamente em 10 caixas de 750 litros por um período de aclimação de 8 dias. Foi utilizada a densidade de 58 fêmeas (massa corpórea de $20,1 \pm 4,1$ g e comprimento total de $10,8 \pm 0,59$ cm) por caixa, que foram mantidas nas condições descritas abaixo.

3.4. Instalações, manejo e condições experimentais

As caixas de 750 litros, onde os animais foram mantidos durante o período experimental estavam acopladas em um sistema de recirculação de água, que era adotado de aeração suplementar, trocadores de calor controlados por termostato para possibilitar a manutenção da temperatura. Para a manutenção da qualidade da água, foram realizadas limpezas constantes do filtro do sistema de recirculação, assim como diariamente uma retro lavagem, na qual 80% da água do filtro era renovada. Adicionalmente, sempre que se observava a presença de substrato, uma renovação parcial da água de cada caixa foi realizada por meio de sifonagem de resíduos de fezes e sobras de ração depositadas no fundo das mesmas.

A temperatura ($26,6 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$), concentração de oxigênio dissolvido ($7,12 \pm 0,5 \text{ mg L}^{-1}$), condutividade ($40,8 \pm 2,7 \mu\text{S.cm}^{-1}$) e pH ($6,98 \pm 0,27$) da água foram verificados diariamente. A concentração de oxigênio dissolvido e a temperatura da água foram aferidas com oxímetro digital modelo YSI 550; a condutividade por meio de uma sonda modelo HANNA HI-98311, e o pH através de kits colorimétricos LabconTest. Semanalmente foram realizados testes de amônia ($\leq 0,3 \text{ mg L}^{-1}$) e nitrito ($0,05 \pm 0,1 \text{ mg L}^{-1}$) utilizando-se testes colorimétricos (LabconTest). Todos os parâmetros de qualidade da água mantiveram-se dentro dos limites aceitáveis para a manutenção da espécie estudada (Garutti, 2003). Durante o experimento, todas as caixas foram mantidas sob fotoperíodo artificial (12L:12E) com lâmpadas fluorescentes controladas por temporizador.

O delineamento adotado foi o inteiramente casualizado com cinco tratamentos em duplicata. Antes do início do estudo os peixes foram mantidos nas unidades experimentais durante oito dias, período no qual os animais foram alimentados com dieta comercial (a mesma que estava sendo ofertada nos viveiros) duas vezes ao dia, às 9h e 17h. Após este período, foi realizada uma coleta inicial de 20 peixes para comparar os resultados dos animais antes da suplementação, com 30 e 60 dias de alimentação com as dietas experimentais. Ao final de oito dias, os animais receberam, durante 16 dias, uma dieta sem suplementação de vitamina A, com o objetivo de depletar estas reservas no organismo, o esquema detalhado segue na figura (Fig.2) abaixo. Em seguida, os peixes passaram a receber as respectivas dietas experimentais, suplementadas com diferentes níveis de inclusão

de vitamina A (T1 a T5). Os animais foram alimentados diariamente, duas vezes ao dia (9h e 17) até a aparente saciedade.

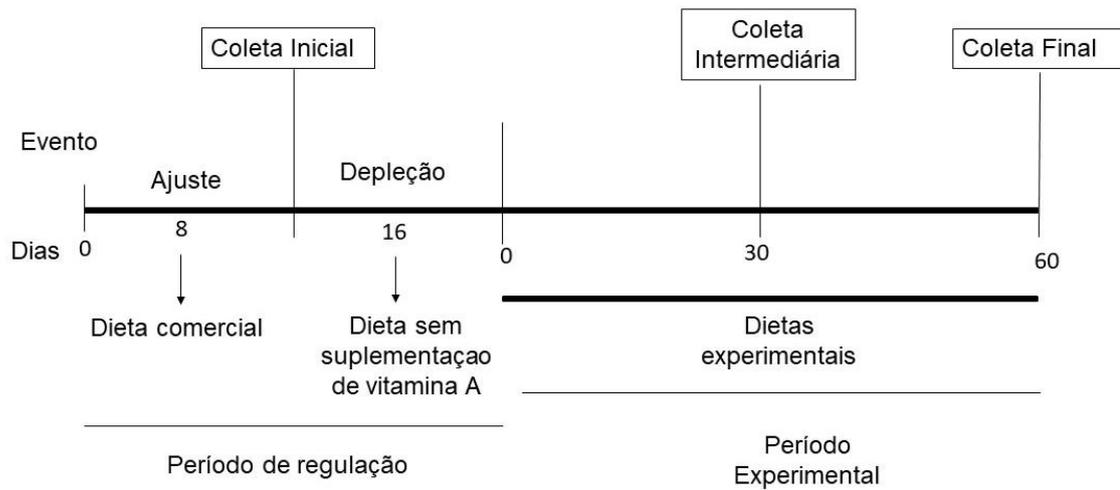


Fig.2. Esquema do desenho experimental.

3.5. Coleta das amostras

O experimento, como descrito anteriormente foi composto por três coletas em períodos diferentes conforme detalhadas na Fig.2 de amostras em diferentes períodos: coleta inicial (alimentação comercial), intermediária (30 dias de alimentação com dietas suplementadas com vitamina A) e final (60 dias de alimentação com dietas suplementadas com vitamina A), sendo coletados respectivamente dois, seis e dez animais por cada unidade experimental.

Antes das coletas, os peixes permaneceram em jejum durante 24 horas. No momento da coleta foram cuidadosamente retirados das caixas, transferidos para um recipiente com volume de 10L, onde foram sedados em uma solução de benzocaína (previamente diluída em etanol absoluto na concentração de 0,1g para 1L de água).

Após cessar o batimento opercular, foi coletado sangue por punção da vasculatura caudal com seringas e agulhas heparinizadas com heparina sódica (Hepamax®). O sangue foi colocado em frascos graduados de polietileno de 1,5 ml, previamente heparinizados, e centrifugado por cinco minutos na velocidade de 5.000 rpm para obtenção de alíquotas de plasma, as quais foram congeladas em freezer (-80 °C).

Em seguida os animais foram medidos e pesados, para tomada da massa corpórea (g), comprimento total (cm) e padrão (cm). Após serem mensurados os dados morfométricos e ponderais, os animais foram eutanasiados por secção da medula espinhal na altura do opérculo. Uma incisão ventral foi realizada para a retirada das vísceras. Os ovários e o fígado foram dissecados para a tomada da massa em balança de precisão, e cálculo do Índice Gonadossomático (IGS) e Hepatossomático (IHS), respectivamente.

Uma porção do fígado e dos ovários foi pesada e congelada em freezer (-80 °C) para posterior análise da concentração de vitamina A. O restante dos ovários foi reservado uma porção para histologia e uma pequena parte novamente foi pesado e colocado em solução de Gilson para a análise de fecundidade e frequência de diâmetro oocitário.

3.6. Análise da concentração plasmática de 17βEstradiol (E2)

As alíquotas de plasma foram utilizadas para a análise de E2 pelo método de elisaimunoensaio, utilizando-se kits da IBL (IBL®, International/Hamburg, Germany), que já foram previamente validados para *A. altiparanae* (Brambila Souza et al., 2019). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro de microplaca (*Spectra Max 250 Molecular Devices*).

Antes de proceder às análises, foram realizados testes de diluição para validar o uso do kit da IBL conforme recomendação do fabricante. Foi definida a diluição de 1:2, utilizando tampão (Cayman Chemical®).

3.7. Índices Viscerosomático (IVS), Hepatosomático (IHS) e Gonadosomático

Os índices corporais foram calculados de acordo com as seguintes fórmulas:

Índice Viscerosomático (IVS): $IVS = Wg \times 100 / Wt$. Onde, Wg = massa das vísceras e Wt = massa corpórea.

Índice Hepatosomático (IHS): $IHS = Wh \times 100 / Wt$; Onde, Wh = massa do fígado e Wt = massa corpórea.

Índice Gonadosomático (IGS): $IGS = Wg \times 100 / Wt$. Onde, Wg = massa dos ovários e Wt = massa corpórea

3.8. Análises Morfológicas

3.8.1. Histologia dos ovários

Fragments dos ovários foram fixados em Bouin acético e após 24 horas no fixador foram transferidos para etanol a 70%. As amostras foram desidratadas em etanol, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. As amostras foram emblocadas e cortadas em micrótomo (Leica-RM-2255) em cortes de 5µm de espessura e os cortes corados com hematoxilina e eosina (Behmer et al., 1976).

Após a coloração, as lâminas foram novamente desidratadas e diafanizadas para fechamento com lamínulas e goma Damar. Os cortes foram analisados em sistema de computador com captura de imagem – Leica DM 1000 (Ligth Microscope, Leica DFC295 Photografic camera and image capture *Leica application suite professional*, LASV3.6). Foi avaliada a presença das diferentes fases do desenvolvimento oocitário (West, 1990) nos ovários e o método utilizado por Gomes et al., (2015) e Brambila-Souza et al., (2019) foi aplicado para a classificação do estágio de maturação ovariana.

Este método baseia-se na ausência (-), presença (+), frequência (++) ou predominância (+++) dos diferentes tipos celulares, para a classificação do estágio de maturação gonadal.

3.8.2. Cálculo da fecundidade e diâmetro dos oócitos

Para o cálculo da fecundidade, os ovários (descontado o fragmento que foi analisado na histologia e congelado para análise de vitamina A) foram pesados e armazenados em solução de Gilson modificada (Simpson, 1951). Os ovários permaneceram por cerca de 60 dias nesta solução até que pudessem se dissociar, em seguida foram filtrados e transferidos para etanol 70% até ser submetidos às análises.

No momento da seleção de subamostras para análise, esta solução foi transferida para um volume de 1000 mL, a partir do qual, com a utilização de uma pipeta Stempel (Hensen Stempel Pipette™ 1806 series; Wildlife Supply Company, Florida, USA) foram retiradas subamostras de 2,0 mL (em triplicata). Os oócitos foram analisados em uma microplaca de acrílico milimetrada sob um microscópio acoplado a uma câmera fotográfica para captura de imagens. Em cada uma destas placas os oócitos foram contados e seu diâmetro registrado para os cálculos de frequência e fecundidade.

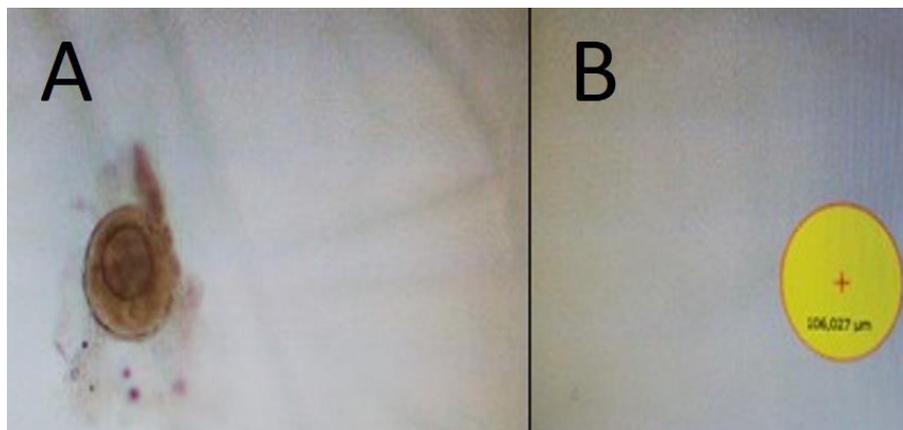


Fig. 3. Ócito (A). Diâmetro dos ócitos μm (B)

As imagens obtidas foram analisadas no programa *Leica Application Suite Professional Software LAS V3.6*. Para a determinação da frequência e do diâmetro oocitário, foi necessário estabelecer classes de diâmetros dos oócitos, Os diâmetros foram divididos em 10 classes: 0 a 100µm, 101 a 200µm e assim sucessivamente até 1000µm para se encontrar a porcentagem de oócitos em cada classe de diâmetro.

Foram considerados como vitelogênicos os oócitos com diâmetros acima de 601 µm, pois foi a partir deste diâmetro que eles se apresentaram corpo opacos e com coloração escura, caracterizando o aspecto de vitelogênico. Após as medidas e contagens dos oócitos (Fig.3) foi feita uma média da triplicata e foi calculada:

Fecundidade absoluta (FA), $FA = N \times S / 100$. Onde, FA – número estimado de oócitos que serão eliminados em um período reprodutivo; N - número de oócitos por fêmea. S - somatória da frequência dos oócitos vitelogênicos;

Fecundidade relativa à massa corpórea (FR) $FR = FA/Wt$. Onde, FA = fecundidade relativa e Wt - massa corpórea total

3.9. Análise de vitamina A

A concentração de vitamina A foi analisada nas rações antes do início do experimento para assegurarmos que as concentrações nominais fossem similares às reais. O equipamento utilizado foi o HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Foi analisada também a concentração de vitamina A no fígado e ovários dos peixes após 60 dias de alimentação com as dietas experimentais. Como a quantidade de tecido era pequena utilizamos um método de extração utilizado por García-de Blas, et al., (2011) para carotenoides, havendo sido testado e validado anteriormente para astaxantina e tecido muscular de peixes.

Após vários testes, o método de extração e as condições utilizadas no equipamento se mostraram sensíveis em relação aos outros métodos que exigiam uma maior quantidade de tecido. Os extratos das amostras foram enviados para serem injetados no Laboratório CBO (Valinhos, SP, Brasil) com equipamento:

Shimadzu LC equipado com detector de fluorescência RF-10Axl e coluna de sílica Waters Spherisorb 5 um 4,6x250 mm para as rações. E para os tecidos de fígado e ovários coluna de sílica Agilent Poroshell 120 EC-C18 3,0 x 150 mm, 2,7 e detector de fluorescência RF-10Axl operando nos comprimentos de onda: emissão: 480 nm e excitação: 325 nm.

3.10. Análise da concentração plasmática de lipídios e lipoproteínas

As análises de colesterol total, triglicérides e HDL foram realizadas Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP. O equipamento utilizado foi o analisador bioquímico automático Labmax 240 (Tokyo Boek Machinery LTD) com fator de diluição: 1:100ml de Solução NaCl 0,9%.

A concentração de VLDL e LDL foi calculada de acordo com a equação de Friedewald et al., (1972), na qual se utiliza a concentração de triglicérides, colesterol total e HDL e através dos cálculos abaixo são obtidos os valores de VLDL e LDL:

$$\text{VLDL: } \textit{triglicérides}/5$$

$$\text{LDL: } \textit{colesterol total} - (\textit{triglicérides}/5) - \textit{HDL}$$

Foi analisada a concentração plasmática de lipídios totais, utilizando-se método colorimétrico (Frings et al., 1972) e os cálculos foram realizados com uma curva de óleo de fígado de bacalhau (Sigma ®).

3.11. Análise estatística

As variáveis analisadas, como concentração de esteroides, índices somáticos, e o perfil lipídico foram comparadas entre os grupos com diferentes níveis de inclusão de vitamina A. Esta comparação foi realizada utilizando-se a

análise de variância two-way ANOVA, sendo considerados como fatores: 1) nível de inclusão de vitamina A; 2) Tempo de amostragem (30 e 60 dias).

A concentração de vitamina A hepática e gonadal foi comparada entre os animais dos diferentes grupos experimentais utilizando-se análise de variância one-way ANOVA, considerando o nível de inclusão de vitamina A como fator. Os dados foram analisados ainda pelo teste Grubb's (GraphPad) para verificação de outliers. Quando detectadas diferenças estatísticas e os dados apresentaram distribuição normal foi aplicado o teste post hoc Student Newman Keuls.

Para dados não paramétricos foi utilizado o teste Kruskal Wallis e post-hoc de Dunns. O nível de significância adotado foi de $P < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Análise de vitamina A nas dietas e tecidos

A análise da concentração de vitamina A nas rações mostrou que no tratamento 1, no qual não houve inclusão de vitamina A, foi obtida uma concentração de 1.600 UI/kg considerada originária exclusivamente dos ingredientes. Nos tratamentos com suplementação de 1.800 e 3.600 UI/kg a concentração de vitamina A se manteve acima da quantidade adicionada (contribuição dos ingredientes) e apenas nas dietas com suplementação de 7.200 e 14.400 UI/kg houve perda da vitamina A incorporada, mas com porcentagens consideradas relativamente baixas, de no máximo 13,6% dos valores inicialmente estabelecidos (Tabela 2).

Tabela 2. Análise de vitamina A nas diferentes dietas

Tratamentos	T1	T2	T3	T4	T5	
Vitamina A suplementada (UI/kg)		0	1.800	3.600	7.200	14.400
Vitamina A quantificada (UI/kg) ¹	1.600	2.798	4.704	6.724	12.409	
Valores esperados de vitamina A (UI/kg) ²	1.600	3.400	5.200	8.800	16.000	
Diferenças entre os valores esperados e quantificados (UI/kg) ³	0	-602	-496	-2.076	-3.591	
Diferença entre os valores esperados e quantificados (%) ⁴	0	-17,71	-9,54	-23,59	-22,44	

¹Níveis de vitamina A quantificados através de análises químicas em duplicata. ²Somatória da quantidade de vitamina A inicial da ração (1.600 UI/kg) com o valor suplementado, de acordo com o tratamento. ³Níveis de vitamina A perdidos quando calculada a diferença entre a quantidade de vitamina A (UI/kg) esperada e os valores quantificados após análise. ⁴Níveis de vitamina A perdidos quando calculada a diferença entre a quantidade de vitamina A (%) esperada e os valores quantificados após análise.

Apesar dos diferentes níveis de inclusão da vitamina A nas dietas, a concentração de vitamina A não variou no fígado ($P=0,716$) porém esse índice variou nos ovários das fêmeas ado T2 quando comparadas com os outros diferentes grupos experimentais (Fig.4).

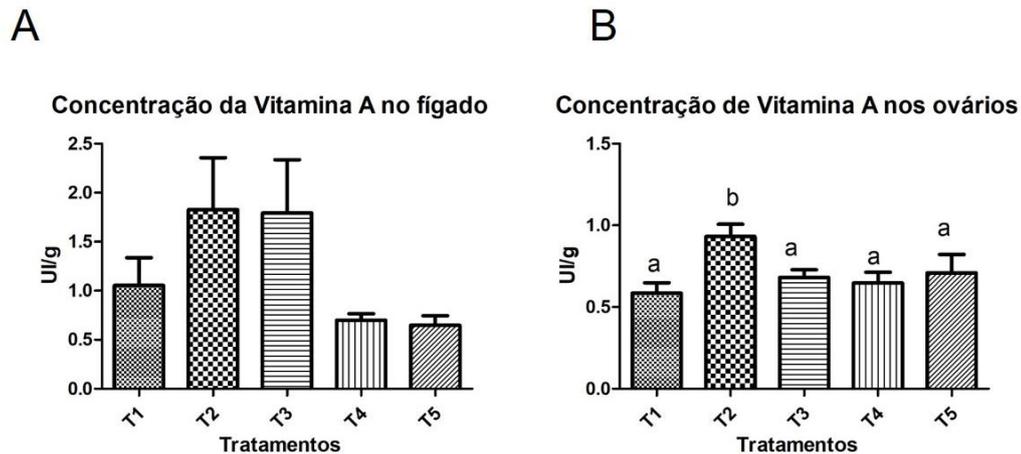


Fig.4. Concentração da vitamina A no fígado e ovários de fêmeas de *Astyanax altiparanae* alimentadas com diferentes níveis de suplementação de vitamina A: 0 (T1), 1800 (T2), 3.600 (T3), 7.200 (T4) e 14.400 UI/kg (T5) durante 60 dias ^{ab}Letras diferentes representam diferenças entre os tratamentos dentro do mesmo período de coleta ($p > 0.05$).

4.2. Dados morfométricos, ponderais, índices corporais e E2

Com relação aos dados morfométricos, o comprimento total e a massa corpórea não variaram entre os animais dos diferentes tratamentos após 30 e 60 dias (Fig. 5). Da mesma forma, o IVS e o IHS (Fig. 6) também não variaram entre os diferentes tratamentos ($P=0,761$ e $P=0,329$, respectivamente) e tempos experimentais ($P=0,358$ e $P=0,542$, respectivamente). Por outro lado, a análise do IGS (Fig.7) mostra que apesar de não haver influência do nível de inclusão de vitamina A neste índice em 30 dias ($P > 0,05$), os animais mantidos por 60 dias sob os diferentes tratamentos apresentaram um aumento de IGS na maioria dos tratamentos ($P=0,029$ em T1, $P < 0,001$ em T2 e T4 e $P=0,004$ em T5). Os animais do grupo T3 não apresentaram variação no IGS ($P=0,239$) entre os dois momentos de coleta (Fig. 7).

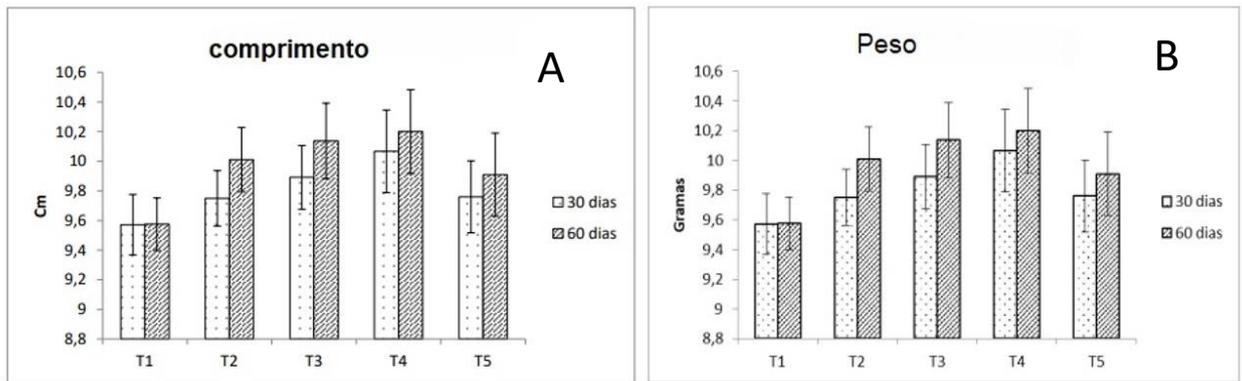


Fig.5. Comprimento e peso médio (média \pm EPM) de fêmeas de *Astyanax altiparanae* alimentadas com diferentes níveis de suplementação de vitamina A: 0 (T1), 1800 (T2), 3.600 (T3), 7.200 (T4) e 14.400 UI/kg (T5) durante 30 e 60 dias. Não houve diferença estatística entre os tratamentos experimentais e tempo de coleta ($p > 0.05$) (média \pm EPM)

A análise da concentração plasmática de E2 revelou que aos 30 dias não houve variação entre os tratamentos ($P = 0,140$), porém aos 60 dias, a concentração plasmática de E2 foi mais elevada no grupo T3 em relação ao T1, T2 ($P = 0,002$), T4 ($P = 0,003$) e T5 ($P = 0,004$). Considerando o tempo como fator de comparação, apenas dos animais do T3 os valores encontrados aos 60 dias foram mais elevados que aos 30 dias ($P = 0,002$) (Fig.8).

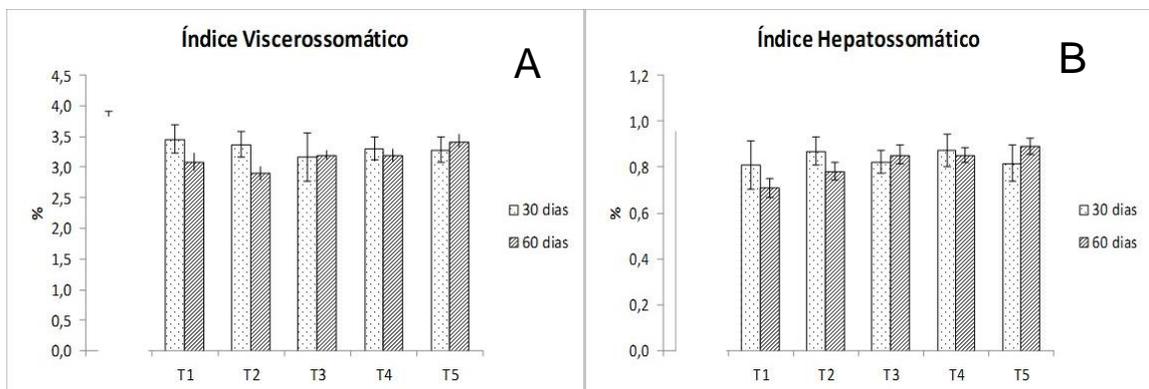


Fig. 6. Índice Viscerossomático e índice Hepatossomático (média \pm EPM) de fêmeas de *Astyanax altiparanae* alimentadas com diferentes níveis de suplementação de vitamina A: 0 (T1), 1800 (T2), 3.600 (T3), 7.200 (T4) e 14.400 UI/kg (T5) durante 30 e 60 dias. Não houve diferença estatística entre os tratamentos experimentais e tempo de coleta ($p > 0.05$).

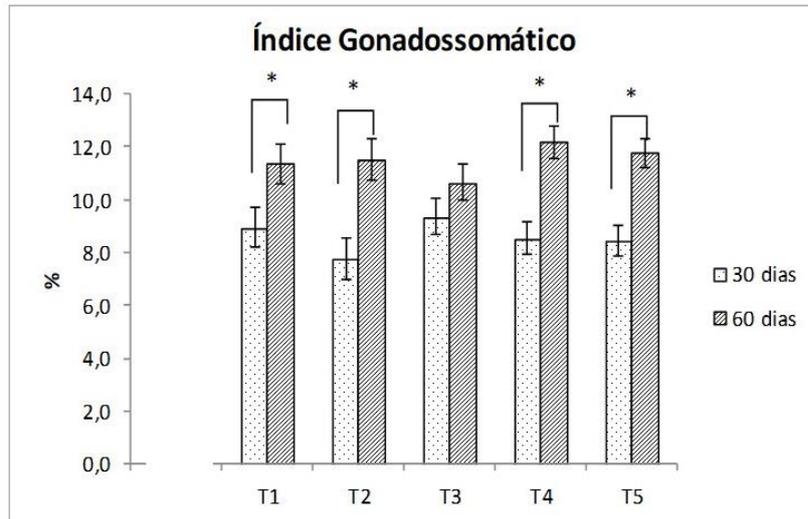


Fig.7. Índice Gonadossomático (média \pm EPM) de fêmeas de *Astyanax altiparanae* alimentadas com diferentes níveis de suplementação de vitamina A: 0 (T1), 1.800 (T2), 3.600 (T3), 7.200 (T4) e 14.400 UI/kg (T5) durante 30 e 60 dias. *Símbolo representa diferença estatística dentro do mesmo tratamento entre os diferentes momentos da coleta ($p < 0.05$).

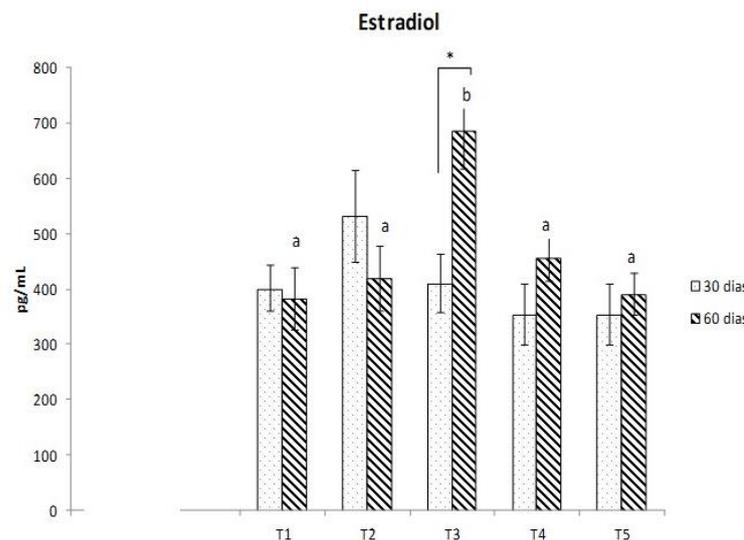


Fig.8. Concentração plasmática de estradiol (média \pm EPM) em fêmeas de *Astyanax altiparanae* alimentadas com diferentes níveis de suplementação de vitamina A: 0 (T1), 1.800 (T2), 3.600 (T3), 7.200 (T4) e 14.400 UI/kg (T5) durante 30 e 60 dias. ^{ab}Letras diferentes representam diferenças entre os tratamentos dentro do mesmo período de coleta. *Símbolo representa diferença estatística no mesmo tratamento entre 30 e 60 dias ($p < 0.05$).

4.3. Fecundidade e diâmetros oocitário

A análise de fecundidade absoluta mostrou que não houve influência do nível de suplementação de vitamina A no número total de oócitos vitelogênicos nos ovários das fêmeas analisadas aos 30 ou 60 dias ($P= 0,324$) (Fig. 10). No entanto, aos 60 dias, a fecundidade absoluta das fêmeas do T2 foi mais elevada do que aos 30 dias ($P=0,006$) (Fig.10). Já na análise de fecundidade relativa, na qual o número de oócitos vitelogênicos relativizado pela massa corpórea da fêmea, após 60 dias de tratamento (Fig.9.), os animais que receberam o maior nível de suplementação de vitamina A (T5) apresentaram valores de fecundidade relativa mais elevado do que as fêmeas de todos os outros grupos experimentais ($P<0,001$). Da mesma forma, estas fêmeas do T5 apresentaram maior valor de fecundidade relativa após 60 dias de experimento, quando estes valores foram comparados aos 30 dias ($P<0,001$).

Mesmo considerando-se as referidas alterações na fecundidade absoluta e relativa, não houve diferença no diâmetro dos oócitos vitelogênicos entre os tratamentos (Fig.11) ($P=0,543$) e tempo de alimentação com os diferentes níveis de inclusão da vitamina A ($P=0,849$). O mesmo ocorreu para os oócitos do lote residual que não apresentaram variações no tamanho ao longo do tempo ($P=0,583$) e diferentes tratamentos ($P=0,116$) (Fig.11).

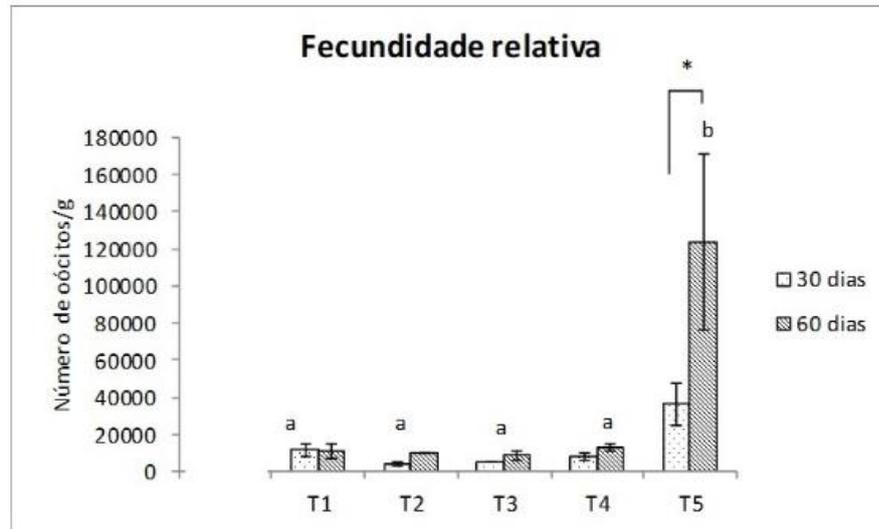


Fig.9. Fecundidade relativa à massa corpórea (média \pm EPM) em fêmeas de *Astyanax altiparanae* alimentadas com diferentes níveis de suplementação de vitamina A: 0 (T1), 1800 (T2), 3.600 (T3), 7.200 (T4) e 14.400 UI/kg (T5) durante 30 e 60 dias. ^{ab}Letras diferentes representam diferenças entre os tratamentos dentro do mesmo período de coleta. *Símbolo representa diferença no mesmo tratamento entre 30 e 60 dias ($p < 0.05$).

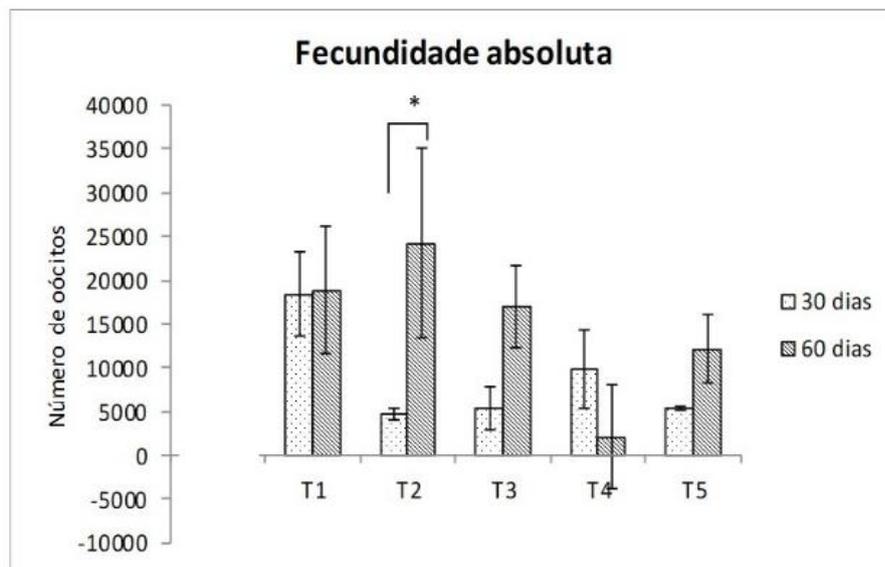


Fig. 10. Fecundidade absoluta (média \pm EPM) em fêmeas de *Astyanax altiparanae* alimentadas com diferentes níveis de suplementação de vitamina A: 0 (T1), 1800 (T2), 3.600 (T3), 7.200 (T4) e 14.400 UI/kg (T5) durante 30 e 60 dias. *Símbolo representa diferença estatística no mesmo tratamento entre 30 e 60 dias ($p < 0.05$).

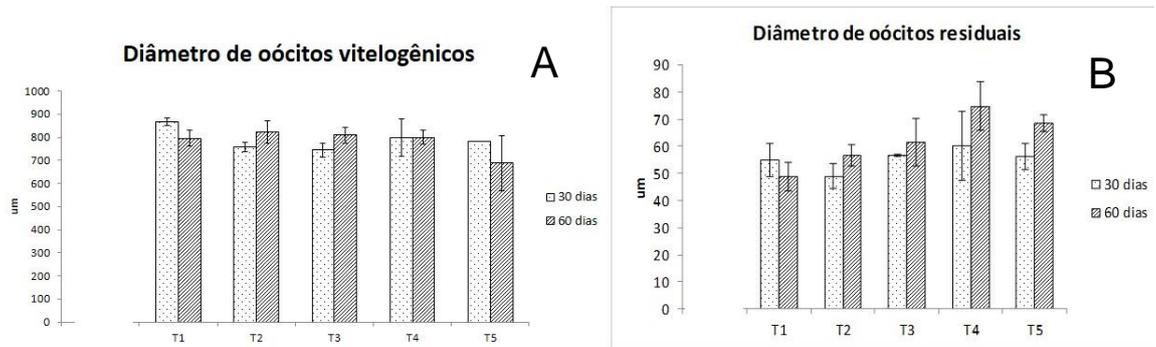


Fig.11. Diâmetro dos oócitos vitelogênicos e os oócitos residuais (média \pm EPM) de fêmeas de *Astyanax altiparanae* alimentadas com diferentes níveis de suplementação de vitamina A: 0 (T1), 1800 (T2), 3.600 (T3), 7.200 (T4) e 14.400 UI/kg (T5) durante 30 e 60 dias. Não houve diferença estatística entre os tratamentos experimentais e tempo de coleta ($p > 0.05$).

4. 4. Análises lipídicas plasmáticas

As análises plasmáticas mostraram que em todos os tratamentos os animais que permaneceram 60 dias no experimento apresentaram diminuição da concentração de lipídios totais (Fig.12) em relação aos animais mantidos por 30 dias no experimento ($P=0,002$ em T1; $P<0,001$ em T2, T3 e T4; $P=0,037$ em T5). Considerando-se o momento de coleta, após 30 dias de experimento, as fêmeas do grupo T5 apresentaram concentração plasmática de lipídio total mais baixa que aquelas dos demais tratamentos ($P < 0,001$), mas estes valores não foram diferentes após 60 dias de experimento (Fig. 12).

Considerando-se as diferentes classes de lipídios, a concentração plasmática de triglicérides não variou entre os tratamentos ($P=0,813$) e período experimental ($P= 0,800$) (Fig.13). A concentração plasmática de colesterol total também não variou entre os tratamentos ($P= 0,682$), mas os valores foram inferiores em 60 dias, comparando-se com a coleta de 30 dias nos grupos experimentais T4 ($P=0,044$) e T5 ($P=0,003$).

Dentre as frações do colesterol, os diferentes níveis de inclusão de vitamina A não alteraram a concentração de HDL comparando-se fêmeas dos diferentes

tratamentos ($P=0,539$) e nos diferentes tempos experimentais ($P=0,197$) (Fig.15). Já a fração LDL não se alterou no plasma das fêmeas dos diferentes tratamentos aos 30 dias ($P=0,540$), mas aos 60 dias, a concentração foi mais elevada nos animais do T2 comparados ao T5 ($P=0,032$). Na comparação dos períodos experimentais, exceto para o grupo T5 ($P=0,169$), a concentração plasmática de LDL foi mais elevada nos animais amostrados com 60 dias, quando comparada com aquela dos animais amostrados aos 30 dias experimentais ($P=0,033$ em T1; $P=0,007$ em T2; $P<0,001$ em T3 e $P=0,044$ em T4) (Fig. 14). A fração de colesterol menos densa, a VLDL, também não se alterou no plasma das fêmeas com diferentes níveis de inclusão de vitamina A ($P=0,813$) e nem em relação aos dois diferentes períodos experimentais ($P=0,800$) (Fig. 15).

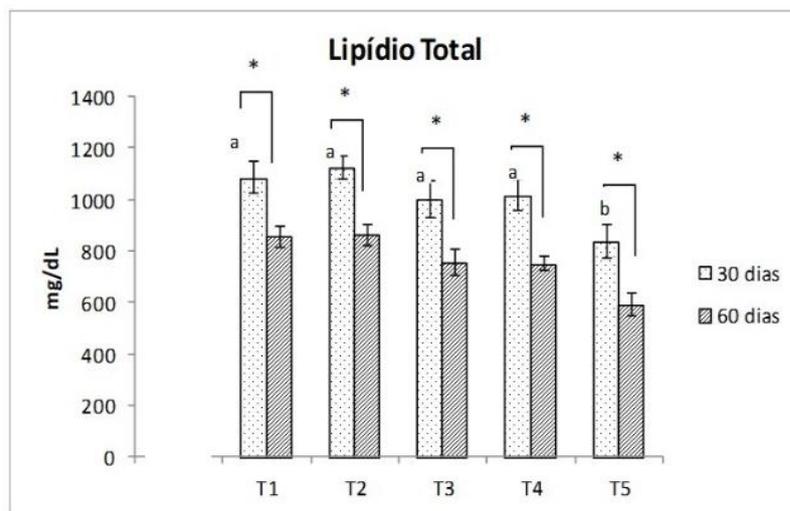


Fig.12. Concentração plasmática de lipídios totais (média \pm EPM) em fêmeas de *Astyanax altiparanae* alimentadas com diferentes níveis de suplementação de vitamina A: 0 (T1), 1800 (T2), 3.600 (T3), 7.200 (T4) e 14.400 UI/kg (T5) durante 30 e 60 dias. ^{ab}Letras diferentes representam diferenças entre os tratamentos dentro do mesmo período de coleta. *Símbolo representa diferença no mesmo tratamento entre 30 e 60 dias ($p<0.05$).

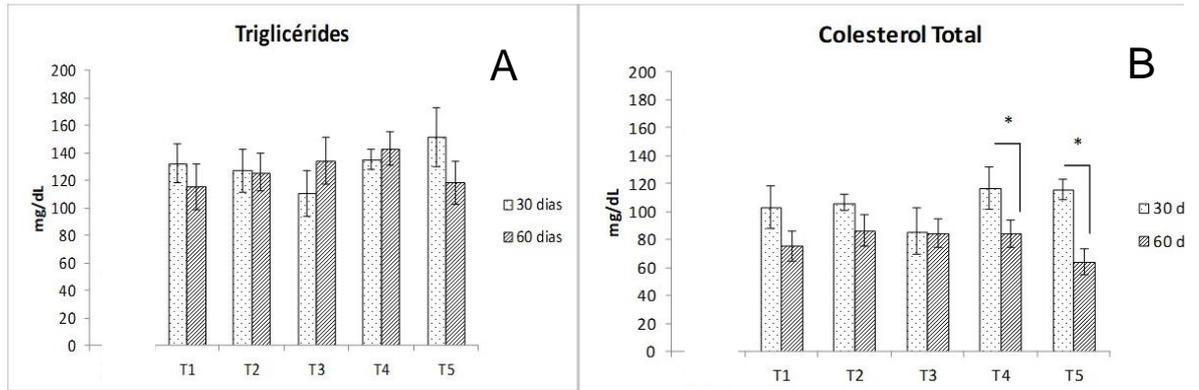


Fig. 13. Concentração plasmática triglicérides e colesterol total (média \pm EPM) em fêmeas de *Astyanax altiparanae* alimentadas com diferentes níveis de suplementação de vitamina A: 0 (T1), 1800 (T2), 3.600 (T3), 7.200 (T4) e 14.400 UI/kg (T5) durante 30 e 60 dias. *Símbolo representa diferença no mesmo tratamento entre 30 e 60 dias ($p < 0.05$).

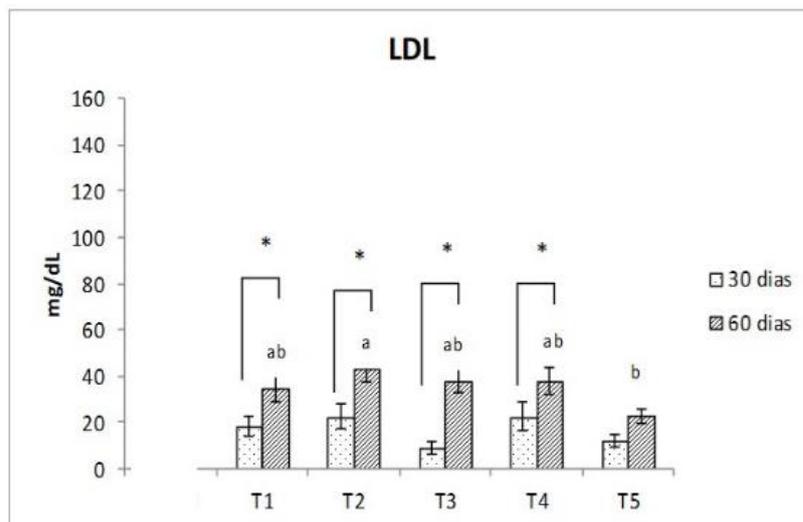


Fig. 14. Concentração plasmática de LDL (média \pm EPM) em fêmeas de *Astyanax altiparanae* alimentadas com diferentes níveis de suplementação de vitamina A. ^{ab}Letras diferentes representam diferenças entre os tratamentos dentro do mesmo período de coleta. *Símbolo representa diferença no mesmo tratamento entre 30 e 60 dias ($p < 0.05$).

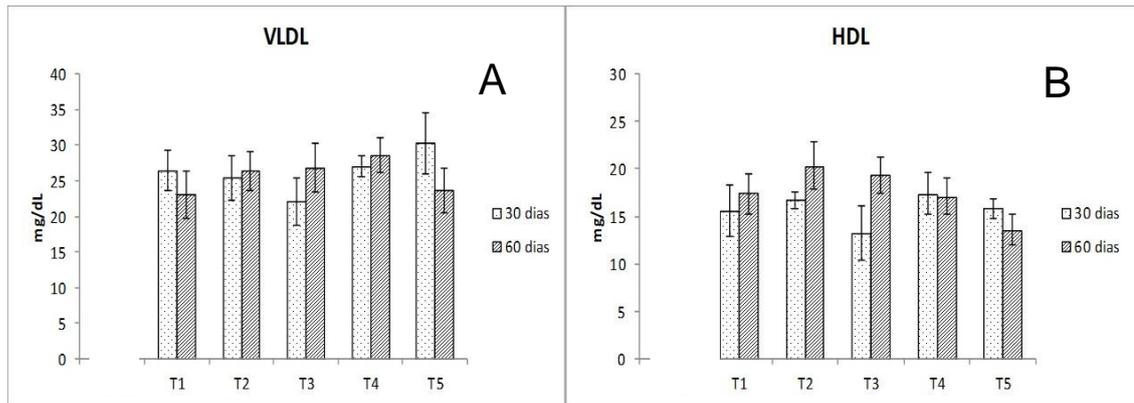


Fig. 15. Concentração plasmática de VLDL e HDL (média \pm EPM) em fêmeas de *Astyanax altiparanae* alimentadas com diferentes níveis de suplementação de vitamina A: 0 (T1), 1800 (T2), 3.600 (T3), 7.200 (T4) e 14.400 UI/kg (T5) durante 30 e 60 dias. *Símbolo representa diferença no mesmo tratamento entre 30 e 60 dias ($p < 0.05$).

4.5. Análises Histológicas dos ovários

Os cortes histológicos dos ovários demonstraram a presença dos seguintes tipos celulares: perinucleolar (PN), vitelogênico (V) cortical alveolar (CA). Com base na presença destes tipos celulares, os ovários das fêmeas do grupo inicial (Fig. 16A) e dos tratamentos 1 a 4 (Figs. 16 B-E) nos primeiros 30 dias foram classificados como “Em maturação”, pela predominância de PN e frequência de oócitos vitelogênicos. As fêmeas do grupo T5 no período de 30 dias (Fig. 17) e aquelas amostradas após 60 dias de experimento apresentaram os ovários na fase madura, caracterizado pela predominância de oócitos vitelogênicos (Figs. 17 A-E) (Tabela 3)

Tabela.3. Classificação do estágio de maturação ovariana baseado nas fases de desenvolvimento dos oócitos de fêmeas de *Astyanax altiparanae* alimentadas com diferentes níveis de suplementação de vitamina A no período inicial, 30 e 60 dias.

Fases do desenvolvimento do óocito	Estágio de maturação			
	PN	CA	V	
Tratamento				
Inicial	+++	-	++	Em maturação
30 dias				
T1	+++	+	++	Em maturação
T2	+++	+	++	Em maturação
T3	+++	-	++	Em maturação
T4	+++	+	++	Em maturação
T5	++	+	+++	Avançado
60 dias				
T1	++	+	+++	Avançado
T2	++	+	+++	Avançado
T3	++	+	+++	Avançado
T4	++	+	+++	Avançado
T5	++	+	+++	Avançado

Perinucleolar (PN), vitelogênico (V) e Cortical Alveolar (CA). Ausência (-), presença (-), frequência (++) e predominância (+++).

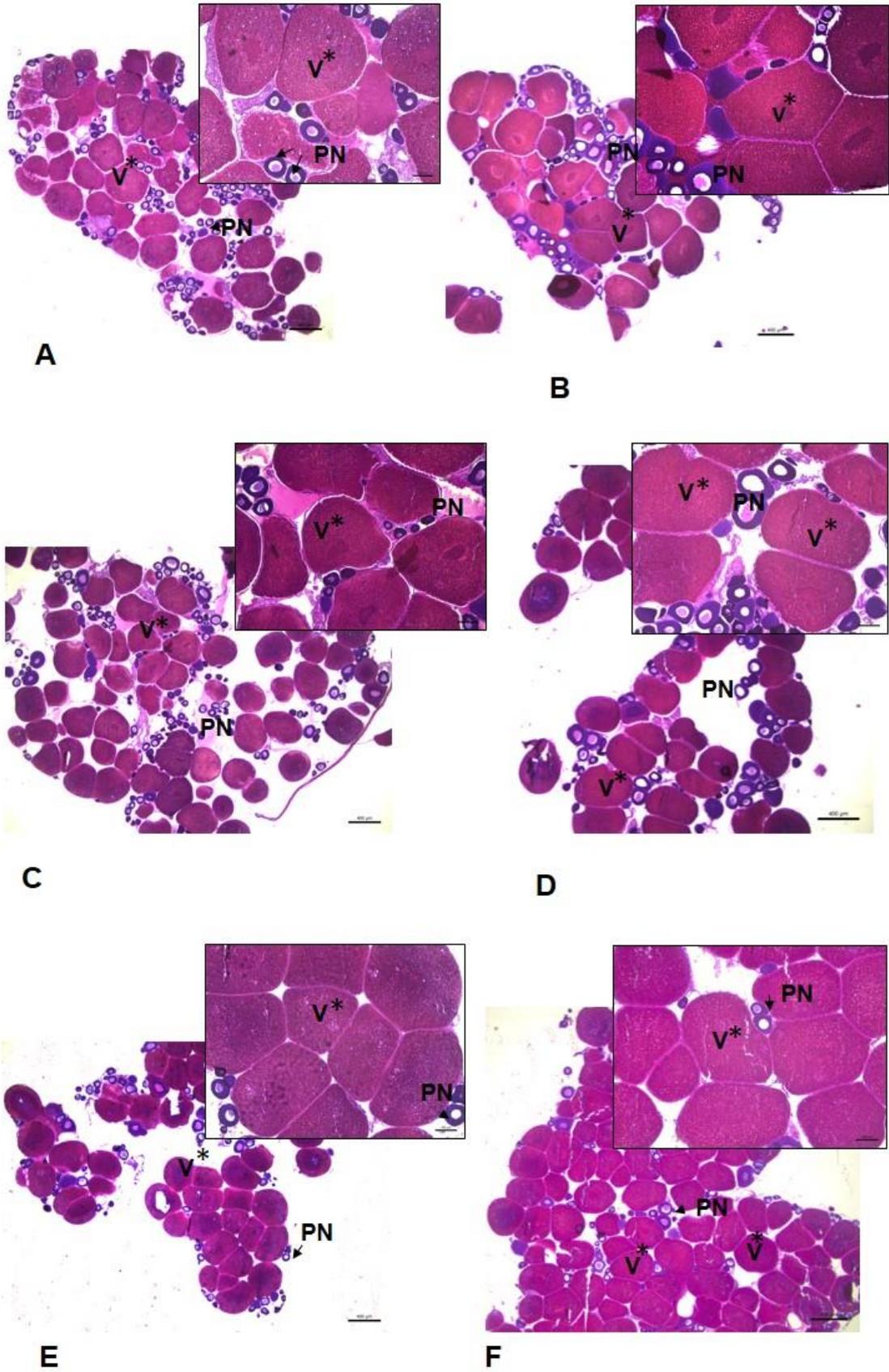
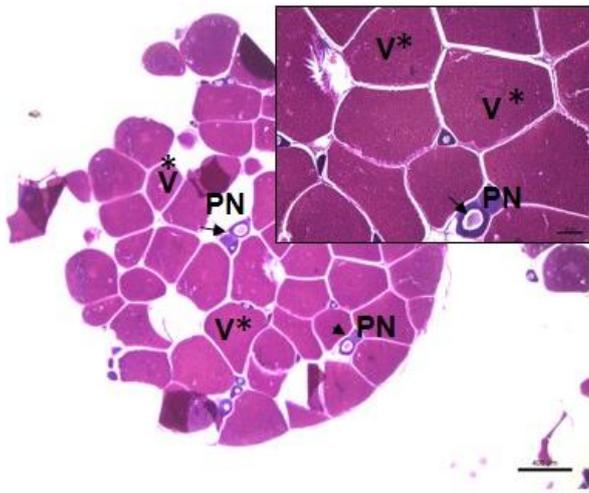
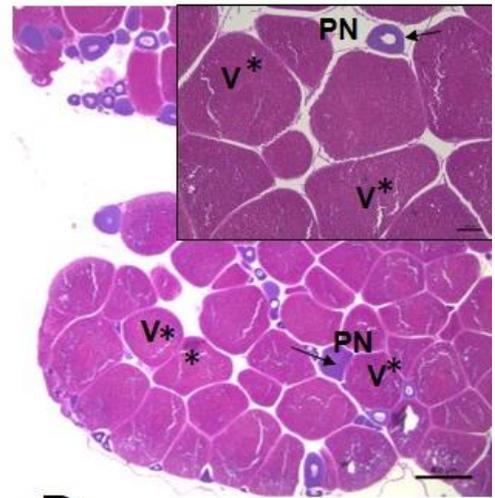


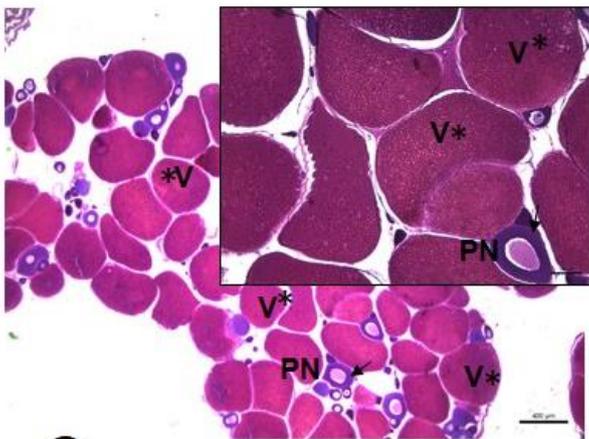
Fig.16. Cortes histológicos de ovários de fêmeas de *Astyanax altiparanae* alimentadas com diferentes níveis de suplementação de vitamina A. (A) grupo inicial composto por animais consumindo dietas comerciais. As imagens seguintes referem se respectivamente aos tratamentos. (B) tratamento T1 sem suplementação de vitamina A, T2 com 1.800 (C), T3 com 3.600 (D), T4 com 7.200, (E) e T5 14.400 UI/kg (F) após 30 dias de ingestão da dieta. V: ócito vitelogênico; PN: ócito perinucleolar.



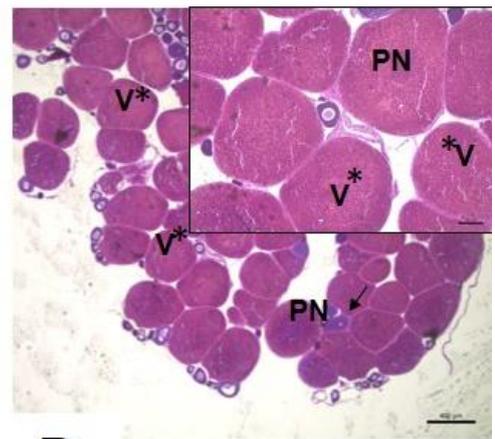
A



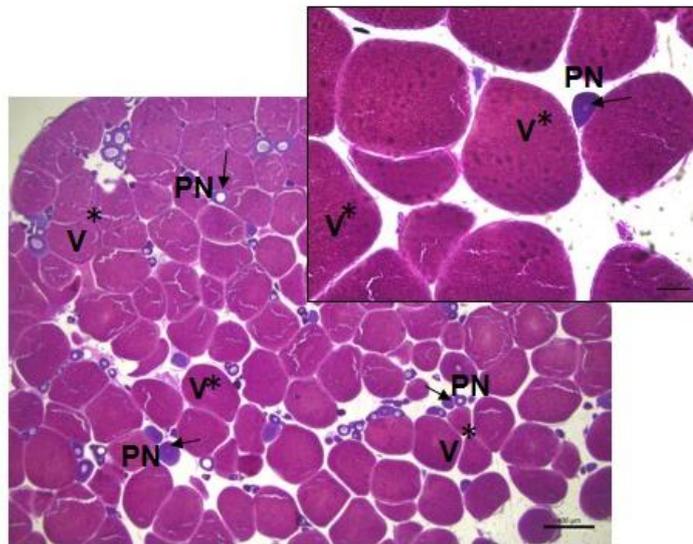
B



C



D



E

Fig.17. Cortes histológicos de ovários de fêmeas de *Astyanax altiparanae* alimentadas com diferentes níveis de suplementação de vitamina A. (A) tratamento T1 sem suplementação de vitamina A, T2 com 1.800 (B), T3 com 3.600 (C), T4 com 7.200, (D) e T5 14.400 UI/kg (E) após 60 dias de ingestão da dieta. V: ócito vitelogênico; PN: oócito perinucleolar

DISCUSSÃO

Considerando-se o procedimento de inclusão da vitamina A, o método utilizado, baseado em Koch et al., (2018), foi satisfatório, pois a quantificação da vitamina A nas rações esteve, de forma geral, de acordo com um patamar de variação esperado. Variações entre os valores esperados e analisados de vitamina A nas dietas são comumente previstos, considerando-se que ocorrem perdas no processo de incorporação, bem como variações analíticas.

Apesar da utilização apenas de ingredientes vegetais nas dietas, os mesmos apresentam baixa concentração de vitamina A, que reflete na quantificação desta vitamina nas dietas, ou seja, a vitamina A quantificada não é oriunda apenas da suplementação, ocorrendo o aumentando da concentração em alguns tratamentos. Guimarães et al., (2013) adicionaram diferentes níveis de vitamina A em dietas semi-purificadas de tilápia do Nilo e obtiveram nas análises cerca de metade da quantidade inicialmente adicionada, não sendo detectada a vitamina A nos níveis mais baixos de inclusão (0, 200, 400 e 800 UI/kg). Essa diferença entre a quantidade adicionada e analisada pode estar associada ao período de armazenamento das dietas, tendo em vista que a vitamina A é um composto fotossensível, ou ainda ao método de processamento, como extrusão em que as taxas de retenção da vitamina A pode variar de 11% a 59% (Barrows et al., 2008). Battisti et al., (2017) também obtiveram perdas elevadas na vitamina A incluída na dieta de *Rhamdia quelen*, chegando até 78% de perda. O fato de ter utilizado o processo de *coating* após a extrusão e ingredientes de origem vegetal possibilitou maior estabilidade da concentração de vitamina A nas dietas de *A. altiparanae* quando comparada com estes trabalhos.

No presente trabalho não foi observado nenhum sinal clínico de deficiência dessa vitamina, apesar da ração controle apresentar baixos níveis de vitamina A. O tempo de alimentação, para que seja possível detectar os sinais de deficiência varia conforme a idade dos animais, ou seja, quanto mais jovem os peixes, mais rapidamente devem surgir os sinais de deficiência (Signor et al., 2013). O tempo de alimentação e o fato das fêmeas já estarem na fase adulta podem justificar a razão de não encontrarmos sinais clínicos de carência ou hipervitaminose nos animais. Guimarães et al., (2013) relataram alguns sinais clínicos de deficiência em

Oreochromis niloticus com alimentados com diferentes níveis de vitamina A, entre eles, natação errática, exoftálmica, redução da secreção de muco e presença de ascite na cavidade abdominal para animais alimentados com baixos níveis da vitamina. Com relação aos dados morfométricos, como os animais já eram adultos não foi observado diferença significativa de ganho de peso ou alteração do comprimento entre os animais dos diferentes tratamentos experimentais.

A vitamina A é ingerida através da dieta e absorvida pelo intestino. Quando necessária esta vitamina é recrutada de tecidos periféricos e da musculatura, transportada por lipoproteínas e armazenada no fígado, que é o principal órgão responsável pelo metabolismo e liberação de vitamina A nos peixes (Batres & Olson, 1987), assim como nos demais vertebrados. Esta vitamina está presente também no tecido adiposo, assim como em outros órgãos que armazenam lipídios, como os ovários (Irie & Seki, 2002) sendo esta incorporada como material nutritivo no ovo. No presente trabalho, os diferentes níveis de inclusão de vitamina A nas dietas, mostraram alteração na concentração de vitamina A gonadal após 60 dias de alimentação, porém não apresentaram diferenças nas concentrações dessa vitamina no fígado. Campeche et al., (2009) não conseguiram detectar vitamina A no tecido hepático de *Oreochromis niloticus* que recebem 0 a 4.800 UI de retinil palmitato.kg⁻¹ dieta, e apenas em animais que ingeriram concentrações mais elevadas (5.400 UI kg⁻¹) foi possível detectar esta vitamina no fígado. De acordo com estes autores, apenas este nível de vitamina A suplementado na dieta excedeu as exigências metabólicas dos peixes, e assim, somente após satisfazer as necessidades metabólicas, esta vitamina poderia ser armazenada no fígado.

Apesar de não apresentar diferença na deposição de vitamina no fígado dos animais analisados, os resultados encontrados em *A. altiparanae* demonstram quantidades significativas de vitamina A nesse órgão, inclusive nos tratamentos sem suplementação, com uma tendência à queda nos valores nos animais suplementados com a maior concentração de vitamina A (T5). Este perfil observado no fígado, mais especificamente dos animais do T5 deixam evidente que não houve um quadro de hipervitaminose nos animais, pois segundo Harvey and Hardy (2002), um dos sintomas deste quadro seria o armazenamento hepático em excesso desta vitamina, o que não foi observado. Adicionalmente, houve aumento das concentrações de vitamina A nos ovários dos animais alimentados com 1.800 UI/kg

de vitamina A (T2), grupo no qual houve um aumento da fecundidade relativa após 60 dias de alimentação. Estes dados sugerem que este pode ser o local de armazenamento das concentrações suplementares fornecidas.

Nos ovários, outros indicadores foram analisados com o objetivo de avaliar possíveis efeitos da suplementação com vitamina A na maturação gonadal. Um indicador importante para avaliar o grau de maturação dos ovários e relatar possíveis efeitos do tratamento foi o IGS, que segundo Flores et al., (2019), além de ser um método para avaliar o estágio de maturação gonadal, pode ser considerado o melhor indicador da época de reprodução. Os valores de IGS no presente experimento não foram alterados nos animais dos diferentes tratamentos, no entanto vale destacar que ao longo do período houve aumento do IGS na maioria dos grupos experimentais. As fêmeas de *A. altiparanae* mantidas no experimento por 60 dias tiveram valores de IGS mais elevados que aos 30 dias (exceto T3), enquanto os animais provenientes dos viveiros (grupo inicial) apresentavam valores de IGS mais baixos (por volta de 5,0) o que corrobora com os dados morfológicos dos ovários.

Na coleta inicial e aos 30 dias, foi observada nos ovários uma predominância de oócitos perinucleolares, classificando estas fêmeas como em maturação. A morfologia dos ovários neste grupo foi semelhante àquela observada por Jesus et al., (2017) na mesma espécie, no início e no final do período reprodutivo, e quando os valores de IGS também foram cerca de 5 a 6,0. Estes mesmos autores encontraram uma predominância de oócitos vitelogênicos no momento em que os valores de IGS foram mais elevados (12 a 20), mas durante o período da primavera-verão. Brambila-Souza et al., (2019) estudando esta mesma espécie, no mesmo período do presente experimento, observaram valores de IGS próximos àqueles encontrados aos 30 dias e os ovários também apresentaram oócitos vitelogênicos. Os dados de IGS analisados em conjunto com a morfologia gonadal demonstram que houve um avanço na maturação ovariana ao longo do experimento, com aumento da frequência de oócitos vitelogênicos e IGS, mas que os diferentes níveis de vitamina A não alteraram este processo. Adicionando-se à análise os dados de fecundidade, fica evidente que este avanço na maturação se deu pelo desenvolvimento dos oócitos e não pelo aumento no recrutamento de novos folículos, pois a fecundidade absoluta aumentou ao longo do período experimental

apenas nas fêmeas do T2 e não se alterou nos demais tratamentos experimentais, mantendo-se inalterada entre 30 e 60 dias. Já a fecundidade relativa aumentou apenas nos animais suplementados com a maior concentração de vitamina A e aos 60 dias, mas este aumento não se refletiu nos valores de IGS e na morfologia ovariana. É importante destacar que fêmeas de *A. altiparanae* mantêm oócitos vitelogênicos em seus ovários durante todo o ano, tanto em cativeiro (Jesus et al., 2017) quanto na natureza, comprovando assim a plasticidade desde animais de acumular reservas e manter oócitos vitelogênicos mesmo quando submetido a dietas com baixas concentrações de vitamina A.

A maturação oocitária nas espécies ovíparas é acompanhada pela deposição de vitelo e este processo é modulado pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (Lubzens et al., 2010). Sob controle hipotalâmico e hipofisário, as células foliculares do ovário sintetizam E2, que estimula a síntese hepática de vitelogenina, que é uma glicolipofosfoproteína, que é pinocitada pelo oócito e clivada nas proteínas de vitelo (Reading et al., 2017; Lubzens et al., 2010). Nesse estudo, ao quantificar as concentrações plasmáticas de E2 foi observado que os animais alimentados com 3.600 UI/kg de vitamina A (T3) após 60 dias de alimentação, apresentaram concentração mais elevada deste estrógeno em relação aos demais grupos experimentais, sugerindo que a vitamina A pode ter influenciado no aumento desse hormônio, no entanto os mecanismos que suportam esta possível relação ainda não foram compreendidos.

Considerando-se a natureza lipossolúvel da vitamina A, foi relevante no presente trabalho analisar o perfil lipídico plasmático das fêmeas submetidas aos diferentes níveis de inclusão desta vitamina. Os dados obtidos mostram que o aumento na suplementação de vitamina A diminuiu a concentração plasmática de lipídios totais na primeira etapa do experimento (30 dias), mas estes valores foram semelhantes ao final do período experimental, pois ocorreu uma redução nos níveis plasmáticos de lipídios após 60 dias em todos os grupos. Nos grupos com maior suplementação (T4 e T5), sugere-se que esta redução de lipídios totais tenha ocorrido pela diminuição na concentração de colesterol. É importante destacar que na piscicultura, os animais estavam sendo alimentados com dietas comerciais, que certamente incluem ingredientes de origem animal. Durante o período experimental, com o uso exclusivo de ingredientes vegetais na dieta, seria

esperada uma redução no aporte de colesterol aos animais, o que foi observado ao longo do período.

Observando-se as frações do colesterol, fêmeas de *A. altiparanae* não apresentaram alterações nas frações com maior (VLDL) e menor (HDL) porcentagem lipídica. No entanto, fêmeas de todos os grupos experimentais apresentaram aumento da concentração plasmática de LDL comparando-se aos 60 dias experimentais, quando comparadas com dias, exceto aqueles que receberam maior quantidade de vitamina A (T5), que apresentaram níveis mais baixos aos 60 dias em relação ao grupo T2. Livrea et al., (1995) detectaram a atividade antioxidante da vitamina A em seres humanos, sugerindo um potencial papel fisiopatológico na prevenção ou retardo de doenças ateroscleróticas, devido às alterações na concentração de LDL. Por outro lado, Prashanth et al., (2014) trabalhando com diferentes níveis de suplementação de vitamina A em ratos obesos observaram que a alimentação com a maior suplementação de vitamina A reduziu significativamente a concentração de HDL e colesterol total.

No entanto, estes efeitos são difíceis de serem comparados com outras espécies de peixes, pois são inexistentes na literatura estudos que relacionam ingestão de vitamina A e metabolismo lipídico, nem mesmo em animais jovens.

Conclusão

Os resultados encontrados permitem concluir que os diferentes níveis de suplementação de vitamina A fornecidos às fêmeas de *A. altiparanae* não alterou o padrão de deposição hepática desta vitamina, porém alterou a deposição dessa vitamina nos ovários dos animais alimentados com 1.800 UI/kg de vitamina A após 60. Além disso, nos animais deste mesmo tratamento foi observado aumento da fecundidade relativa, sugerindo assim que as concentrações suplementares ingeridas dessa vitamina podem estar armazenadas nos ovários. A manutenção nas condições experimentais promoveu a maturação ovariana, avaliada pelos dados histológicos e IGS. As variáveis fisiológicas evidenciaram que a manutenção destas fêmeas no experimento, com uma dieta composta integralmente por ingredientes vegetais, reduziu a concentração plasmática de lipídios e colesterol totais e que o nível mais elevado de suplementação (14.400 UI/kg) foi capaz ainda de reduzir a concentração plasmática de LDL. Adicionalmente, uma concentração intermediária de suplementação (3.600 UI/kg), administrada por 60 dias proporcionou aumento da concentração plasmática de E2.

Referências

ABIMORAD, E. G., & CASTELLANI, D. Exigências nutricionais de aminoácidos para o lambari-do-rabo-amarelo baseadas na composição da carcaça e do músculo. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 37, n. 1, p. 31-38, 2011.

ALSOP, D., MATSUMOTO, J., BROWN, S., & VAN DER KRAAK, G. Retinoid requirements in the reproduction of zebrafish. **General and Comparative Endocrinology**. V. 156, no 1, p. 51-62. 2008.

ARAÚJO, F.G.; SIMONI, M.R.F. Relação peso comprimento do lambari rabo vermelho (*Astyanax fasciatus parahybae*) e do lambari rabo amarelo (*Astyanax bimaculatus*) na represa de Ribeirão das Lajes, Rio de Janeiro. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 40, n.2, p.453-458, 1997.

BARROWS, F.T., GAYLORD, G.T., SEALEY, W.M., PORTER, L., SMITH, C.E. The effect of vitamin premix in extruded plant-based and fish meal based diets on growth efficiency and health of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture** v. 283, p. 148-155, 2008.

BATRES, R. O., & OLSON, J. A. Relative Amount and Ester Composition of Vitamin A in Rat Hepatocytes as a Function of the Method of Cell Preparation and of Total Liver Stores. **The Journal of Nutrition**, v. 117, p. 77–82, 1987.

BATTISTI, E. K., MARASCA, S., DURIGON, E. G., VILLES, V. S., SCHNEIDER, T.L., UCZAY, J, & LAZZARI, R. Growth and oxidative parameters of *Rhamdia quelen* led dietary levels of vitamin A. **Aquaculture**, v. 474, p. 11-17, 2017.

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

BLOMHOFF, R., BLOMHOFF, H.K. Overview of retinoid metabolism and function. **Journal of Neurobiology**, v. 66, n. 7, p. 606-630, 2006.

BOBE, J. & LABBÉ, C. Egg and sperm quality in fish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, n. 3, p. 535-548, 2010.

BORBA, M., G., SÁ, M., V., C., ABREU, S., J. Vitaminas e sais minerais. Nutriaqua: nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira. Florianópolis, SC: **Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática**, p. 121,2012.

BRAMBILA-SOUZA, G.; MYLONAS C. C. MELLO P.H.; KURADOMIC, R.Y; BATLOUNI S.R;.TOLUSSI, C.E;.MOREIRA, R.G . Thermal manipulation and GnRHa therapy applied to the reproduction of lambari-do-rabo-amarelo, *Astyanax altiparanae* females (Characiformes: Characidae) during the nonbreeding season. **General and Comparative Endocrinology**, v.279, p.120- 128, 2019.

BROMAGE, N.; PORTER, M.; RANDALL, C. The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. **Aquaculture**, v. 197, n. 1, p. 63-98, 2001.

CAMPECHE, D.F.B.; R.R. CATHARINO, H.T. GODOY, AND J.E.P. CYRINO, 2009.Vitamin A in diets for Nile tilapia. *Scientia Agricola* 66: 751-756 CLAGETT-DAME, MARGARET; DELUCA, HECTOR F. The role of vitamin A in mammalian

reproduction and embryonic development. **Annual review of nutrition**, vol. 22, no 1, p. 347-381.2002.

DEDI, J., TAKEUCHI, T., SEIKAI, T., & WATANABE, T. Hypervitaminosis and safe levels of vitamin A for larval flounder *Paralichthys olivaceus* fed Artemia nauplii. **Aquaculture**, vol. 133, no 2, p. 135-146. 1995

ESCHMEYER, W.N. The catalog of fishes online. **California Academy of Sciences**, San Francisco, California, 2003. Acessado em 10 de fevereiro de 2019. <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>.

FERNÁNDEZ, I. & GISBERT, E. The effect of vitamin A on flatfish development and skeletogenesis: **A review. Aquaculture**, v. 315, P. 34-48, 2011.

FLORES, A., WIFF, R., GANIAS, K., & MARSHALL, C. T. Accuracy of gonadosomatic index in maturity classification and estimation of maturity ogive. **Fisheries Research**, v. 210, p. 50-62, 2019.

FONTAGNÉ-DICHARRY, S., LATAILLADE, E., SURGET, A., BRÈQUE, J., ZAMBONINO-INFANTE, J. L., & KAUSHIK, S. J. Effects of dietary vitamin A on broodstock performance, egg quality, early growth and retinoid nuclear receptor expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 303, no 1-4, p. 40-49. 2010.

FRIEDEWALD, W.T., LEVY, R.I., FREDRICKSON, D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative centrifuge. **Clinical Chemistry**, v.18, p. 499–500, 1972.

FRINGS, C.S., FENDLY, T.W., DUNN, R.T., QUENN, C.A. Improved determination of total serum lipids by the sulfo-phospho-vanillin reaction. **Clinical Chemistry**, v. 18, n. 7, p. 673-674, 1972.

FURUITA, H., TANAKA, H., YAMAMOTO, T., SHIRAISHI, M., TAKEUCHI, T. Effects of high dose of vitamin A on reproduction and egg quality of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. **Fisheries Science**, v. 67, n. 4, p. 606-613, 2001.

GARCÍA-DE BLAS, E., MATEO, R., VIÑUELA, J., & ALONSO-ÁLVAREZ, C. Identification of carotenoid pigments and their fatty acid esters in an avian integument combining HPLC–DAD and LC–MS analyses. **Journal of Chromatography B**, v. 879, no 5-6, p. 341-348. 2011.

GARUTTI, V. & BRITSKI, H. A. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. **Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS**, Série Zoologia, v. 13, p. 65-88, 2000.

GARUTTI, V. Piscicultura ecológica. São Paulo: Editora UNESP. 332p. 2003
GOMES, A.D.; TOLUSSI, C.E.; RIBEIRO, C.S.; HONJI, R.M.; MOREIRA, R.G. The role of ovarian steroids in reproductive plasticity in *Hoplias malabaricus* (Teleostei: Characiformes: Erythrinidae) in tropical reservoirs with different degrees of pollution. **General and Comparative Endocrinology**, v.222: 1-10. 2015

GUIMARÃES, I.G.; LIM, C.; YILDIRIM-AKSOY, M.; LI, M.H.; KLESIOUS, P.H. Effects of dietary levels of vitamin A on growth, hematology, immune response and resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to *Streptococcus iniae*. **Animal Feed Science and Technology**, v. 188, p. 126- 136, 2013.

Haga, Y., Takeuchi, T., & Seikai, T Influence of all-trans retinoic acid on pigmentation and skeletal formation in larval Japanese flounder. **Fisheries science**, vol. 68, no 3, p. 560-570. 2002.

HERNANDEZ, L. H. H., TESHIMA, S. I., KOSHIO, S., ISHIKAWA, M., TANAKA, Y., & ALAM, M. S. HERNANDEZ, Effects of vitamin A on growth, serum antibacterial activity and transaminase activities in the juvenile Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. **Aquaculture**, v. 262, n. 2-4, p. 444-450, 2007.

IRIE, TOSHIAKI; SEKI, TAKAHARU. Retinoid composition and retinal localization in the eggs of teleost fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 131, p. 209- 219, 2002.

IZQUIERDO, M. S.; FERNANDEZ-PALACIOS, H.; TACON, A. G. J. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. **Aquaculture**, v. 197, n.1, p. 25-42, 2001.

JESUS, L.W.O., BOGERD J., VIECELI, F.M., BRANCO, G.S., CAMARGO M.P., CASSEL, M., MOREIRA, R.G., YAN, C.Y.I., BORELLA, M.I. Gonadotropin subunits of the characiform *Astyanax altiparanae*: molecular characterization, spatiotemporal expression and their possible role on female reproductive dysfunction in captivity. **General and Comparative Endocrinology**, v. 246, p. 150-163, 2017.

KOCH, J. F. A., SABIONI, R. E., AGUILAR, F. A. A., LORENZ, E. K., & CYRINO, J. E. P. Vitamin A requirements of dourado (*Salminus brasiliensis*): Growth performance and immunological parameters. **Aquaculture**, v. 491, p. 86-93, 2018.

LEVAVI-SIVAN, B., BOGERD, J., MAÑANÓS, E. L., GÓMEZ, A., LAREYRE, J. J. Perspectives on fish gonadotropins and their receptors. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, n. 3, p. 412-437, 2010.

LI, M., FENG, R., MA, H., DONG, R., LIU, Z., JIANG, W., WANG, D. Retinoic acid triggers meiosis initiation via *stra8*-dependent pathway in Southern catfish, *Silurus meridionalis*. **General and Comparative Endocrinology**, v.232, p. 191-198, 2016.

LIRA, L. V. G., KURADOMI, R. Y., SOUZA, T. G. D., HAINFELLNER, P., & BATLOUNI, S. R. *Astyanax altiparanae* ovarian maturation after spawning in water recycling systems. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 44, n. 4, p. e207- e207, 2018.

LIU, B., ZHAO, Z., BROWN, P. B., CUI, H., XIE, J., HABTE-TSION, H. M., & GE, X. Dietary vitamin A requirement of juvenile Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala*) determined by growth and disease resistance. **Aquaculture**, v. 450, p. 23-30, 2016.

LIVREA, M. A., TESORIERE, L., BONGIORNO, A., PINTAUDI, A. M., CIACCIO, M., & RICCIO, A. Contribution of vitamin A to the oxidation resistance of human low density lipoproteins. **Free Radical Biology and Medicine**, v 18 n.3, p.401–409. 1995.

LUBZENS, E., LISSAUER, L., LEVAVI-SIVAN, B., AVARRE, J.C., SAMMAR M. Carotenoid and retinoid transport to fish oocytes and eggs: what is the role of retinol binding protein? **Molecular Aspects of Medicine**, v.24, n.6, p.441- 57, 2003.

LUBZENS, E.; YOUNG, G.; BOBE, J.; CERDÁ, J. 2010. Oogenesis in teleosts: how fish eggs are formed. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, n. 3, p. 367- 389, 2010.

LUCENA, C. D.; SOARES, H.G. Review of species of the *Astyanax bimaculatus* “caudal peduncle spot” subgroup sensu Garutti & Langeani (Characiformes, Characidae) from the rio La Plata and rio São Francisco drainages and coastal systems of southern Brazil and Uruguay. **Zootaxa**, v. 4072, n. 1, p. 101-125, 2016.

MOHAMED, J. S., SIVARAM, V., ROY, T. C., MARIAN, M. P., MURUGADASS, S., & HUSSAIN, M. R. Dietary vitamin A requirement of juvenile greasy grouper (*Epinephelus tauvina*). **Aquaculture**, v. 219, no 1-4, p. 693-701. 2003.

MORAES, G., ALMEIDA, L.C., Reprodução e embriogênese. In: *Biologia e Fisiologia de Peixes Neotropicais de Água Doce*. Jaboticabal: Funep/Unesp, p.236-238, 2014.

NAVARRO, R. D., NAVARRO, F. K. S. P., SEIXAS-FILHO, J., RIBEIRO-FILHO, O. P. Nutrição e alimentação de reprodutores de peixes. **Augustus**, v. 30, n. 30, p.108-118, 2010.

NELSON, DAVID L.; COX, MICHAEL M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. Porto Alegre: Artmed, 2011. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 373, 2014.

Ørnsrud, R., Graff, I. E., Høie, S., Totland, G. K., & Hemre, G. I Hypervitaminosis A in first-feeding fry of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Aquaculture nutrition**, vol. 8, no 1, p. 7-13. 2002

PALACE, V. P., & WERNER, J. Vitamins A and E in the maternal diet influence egg quality and early life stage development in fish: a review. **Scientia Marina**, v. 70, n.S2, p. 41-57, 2006.

PEIL, S. Q., POUHEY, J. L. O. F., LOPES, P. R. S., MARTINS, C. R., & TIMM, G. Adição de vitamina A na dieta de pós-larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*). **Biodiversidade Pampeana**, v. 5, n. 1, 2007.

PESSINI, J. E., MORO, E. B., FERNANDES, D. R. A., SIGNOR, A., BOSCOLO, W. R., & FEIDEN, A. (Vitamina A em dietas para larvas de jundiá *Rhamdia voulezi*. **Acta Iguazu**, v. 3, n. 1, p. 28-36, 2014.

PORTO-FOREST, F.; CASTILHO-ALMEIDA, R.B.; FORESTI, F. Biologia e criação do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). **Espécies nativas para Piscicultura no Brasil**, v. 2, p. 101-116, 2005.

PRADHAN, AJAY & OLSSON, PER-ERIK. Inhibition of retinoic acid synthesis disrupts spermatogenesis and fecundity in zebrafish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 217, p. 81-91. 2015.

PRASHANTH, A., JEYAKUMAR, S. M., GIRIDHARAN, N. V., & VAJRESWARI, A. Vitamin A-enriched diet modulates reverse cholesterol transport in hypercholesterolemic obese rats of the WNIN/Ob strain. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 21, n. 11, p. 1197-1207, 2014.

READING, B.J. SULLIVAN, C.V. SCHILLING J. Vitellogenesis in Fishes. Elsevier Inc. Doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.03076-4 57

ROCHA, M. J. & ROCHA, E. Morphofunctional aspects of reproduction from synchronous to asynchronous fishes-an overview. In: **Fish Endocrinology** (2 Vols.). Science Publishers, p. 571-624, 2006.

SALEH, G.; ELERAKY, W.; GROPP, J. M. A short note on the effects of vitamin A hypervitaminosis and hypovitaminosis on health and growth of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*). **Journal of Applied Ichthyology**, vol. 11, no 3-4, p. 382-385. 1995.

SANTIAGO, B. C., & GONZAL, A. C. Effect of prepared diet and vitamins A, E and C supplementation on the reproductive performance of cage-reared bighead carp *Aristichthys nobilis* (Richardson). **Journal of Applied Ichthyology**, v. 16, no 1, p. 8-13. 2000.

SIGNOR, A. A., POTRICH, F. R., FEIDEN, A., BOSCOLO, W. R., RIBEIRO, R. P., & VARGAS, L. Vitamina A em dieta de juvenis de pacu cultivados em tanques-rede. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 8, p. 1103-1109, 2013.

SIGNOR, A. A., SIGNOR, F. R. P., BOSCOLO, W. R., SIGNOR, A., FEIDEN, A., & VARGAS, L. Vitamina A na dieta de alevinos de pacu. **Boletim do Instituto de Pesca**, 2018, vol. 44, no 3, p. 156-173.

SIMPSON, A.C. The fecundity of the plaice. **Fishery investigations**, v.5, P.1-27, 1951.

STEFFENS, W. Principios fundamentales de la alimentación de los peces. Zaragoza: Acribia, 1987.

TAKEUCHI, T., DEDI, J., HAGA, Y., SEIKAI, T., & WATANABE, T. Effect of vitamin A compounds on bone deformity in larval Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Aquaculture**, vol. 169, no 3-4, p. 155-165. 1998

WEST, G., Methods of assessing ovarian development in fishes: a review. **Marine and Freshwater Research**, v.41, 199–222, 1990.

ZHANG L., FENG L., JIANG W. D., , LIU Y., WU P., KUANG S. Y., TANG L., TANG W., N., ZHANG Y. A., AND ZHOU X. Q. Vitamin A deficiency suppresses fish immune function with differences in different intestinal segments: the role of transcriptional factor NF- κ B and p38 mitogen-activated 58 protein kinase signalling pathways. **British Journal of Nutrition**, v. 117, no 1, p. 67-82. 2017.

ZOHAR, Y.J.A.; MUÑOZ-CUETO, A. ELIZUR; O. KAH. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, p.438-55, 2010.