



VICTOR FERREIRA RIBEIRO MANSUR

**IDENTIFICAÇÃO DO SEXO DO ORNAMENTAL
AMAZÔNICO *Astronotus ocellatus* (AGASSIZ, 1831), POR
MEIO DE VIDEOCELOSCOPIA E BIOPSIA GONADAL**

LAVRAS - MG

2018

VICTOR FERREIRA RIBEIRO MANSUR

**IDENTIFICAÇÃO DO SEXO DO ORNAMENTAL AMAZÔNICO *Astronotus ocellatus*
(AGASSIZ, 1831), POR MEIO DE VIDEOCELOSCOPIA E BIOPSIA GONADAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Luís David Solis Murgas

Orientador

Prof. Dr. Rodrigo Norberto Pereira

Coorientador

LAVRAS - MG

2018

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Mansur, Victor Ferreira Ribeiro.

Identificação do sexo do ornamental amazônico *Astronotus ocellatus* (AGASSIZ, 1831), por meio de videoceloscopia e biopsia gonadal / Victor Ferreira Ribeiro Mansur. – 2018.

57 p. : il.

Orientador: Luís David Solis Murgas.

Coorientador: Rodrigo Norberto Pereira.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

Bibliografia.

1 Cirurgia. 2. Peixes x. 3. Sexagem. I. Murgas, Luís David Solis. II. Pereira, Rodrigo Norberto. III. Título.

VICTOR FERREIRA RIBEIRO MANSUR

**IDENTIFICAÇÃO DO SEXO DO ORNAMENTAL AMAZÔNICO *Astronotus ocellatus*
(AGASSIZ, 1831), POR MEIO DE VIDEOCELOSCOPIA E BIOPSIA GONADAL**

**IDENTIFICATION OF THE SEX OF THE AMAZON ORNAMENTAL (*Astronotus
ocellatus*) (AGASSIZ, 1831), BY MEANS OF VIDEOCELESCOPY AND BIOPSY
GONADAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 23 de fevereiro de 2018.

Prof. Dr. Galileu Corvato Veras UFMG

Prof. Dr. Rodrigo Norberto Pereira UFLA

Prof. Dr. Luís David Solis Murgas
Orientador

LAVRAS - MG

2018

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora por serem minha força e sempre iluminarem meu caminho.

Aos meus pais, José e Glória, por sempre me apoiarem e servirem de inspiração na minha caminhada, tudo que sou ou serei é reflexo do que me ensinaram e continuam ensinando. Aos meus irmãos, Karine e Fábio, por me entenderem nos momentos de raiva, apoiarem nos momentos difíceis e vibrarem com os bons momentos. A minha noiva Aline, que é a melhor companheira que poderia ter, sempre disposta a ouvir, apoiar e consolar, sem seu apoio tudo seria mais difícil. Amo muito vocês, são a melhor família que eu poderia ter.

Ao meu orientador Luís David Solis Murgas e meu coorientador Rodrigo Norberto Pereira pelos ensinamentos e por todo o apoio nesta caminhada. Com certeza os senhores são profissionais em quem quero me espelhar.

Ao Galileu, que quando eu ainda estava na graduação fez parte da minha iniciação científica e agora volta a acrescentar ao meu crescimento profissional e acadêmico fazendo parte da minha banca.

Aos meus amigos, em especial a Naiara, Isabela, Gilmara, Isadora Assis, Isadora Marques, ao Gilmar e Wilian. O apoio de vocês nesta reta final foi fundamental para concluirmos esta caminhada. Muito obrigado pela amizade, risadas, companheirismo e dedicação, se precisarem de mim estou à disposição. Quem tem amigos tem tudo.

À Universidade Federal de Lavras, ao Departamento de Medicina Veterinária e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária, pela oportunidade concedida para a realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e à rede mineira de bioterismo, pelo apoio financeiro na execução dos estudos.

A todos vocês o meu MUITO OBRIGADO!

RESUMO

Objetivou-se avaliar a eficácia e a segurança da videoceloscopia e da biopsia gonadal e validá-las como métodos de sexagem em *A. ocellatus*. Foi utilizado um total de 31 animais adultos ($168,26 \pm 54,09$ g e $20,21 \pm 2,48$ cm). Para indução e manutenção anestésica, utilizou-se óleo de cravo (140 mg/L e 70 mg/L de água respectivamente) em um sistema de recirculação. No pré-cirúrgico imediato, procedeu-se a antibioticoterapia com florfenicol (50 mg/kg) e analgesia com morfina (5 mg/kg), ambos por via intramuscular. Para acesso à cavidade celomática, o animal foi mantido em decúbito dorsal, procedendo-se a incisão na linha mediana ventral. Em seguida, introduziu-se a óptica do endoscópio para visualização das gônadas e identificação do sexo. Na sequência, com auxílio de uma pinça laparoscópica, um fragmento do tecido gonadal foi coletado e acondicionado em formalina tamponada 10%. Para síntese da cavidade, utilizou-se fio de poliamida em padrão simples contínuo, sendo em seguida os animais monitorados quanto à recuperação anestésica. Após 15 dias da cirurgia, a cicatrização foi avaliada e os pontos removidos. A eficácia da anestesia foi avaliada considerando o tempo de indução e recuperação anestésica para machos e fêmeas. Para avaliar a eficácia dos procedimentos cirúrgicos, os seguintes parâmetros foram considerados: tempo de cirurgia, presença de possíveis complicações cirúrgicas, cicatrização, taxa de sobrevivência, consumo alimentar e parâmetros comportamentais. Para validação dos métodos de sexagem, a análise histológica das gônadas foi utilizada como método padrão-ouro. Os tempos totais de videoceloscopia, biopsia gonadal e de cirurgia foram significativamente maiores ($P < 0,05$) para os animais identificados como machos ($118,84 \pm 108,04$ s, $231,62 \pm 226,59$ s e $720,00 \pm 343,80$ s respectivamente) em comparação aos identificados como fêmeas na videoceloscopia ($26,88 \pm 38,08$ s, $84,72 \pm 36,63$ s e $366,66 \pm 112,51$ s respectivamente). Em apenas um animal foi observado secção do trato gastrointestinal, deiscência da sutura e atraso na cicatrização. A taxa de sobrevivência foi de 100%. Para o consumo alimentar, houve diferenças significativas ($P < 0,05$) para o período de 24h ($61,45 \pm 5,41\%$) e 36h ($61,13 \pm 6,13\%$) pós-cirúrgico quando comparado ao controle (pré-cirúrgico) ($83,87 \pm 4,42\%$). Para a posição na coluna d'água, foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) para os períodos de 24h ($1,45 \pm 0,09$) e 72h ($3,12 \pm 0,14$) após a cirurgia, quando comparados individualmente ao controle ($2,48 \pm 0,15$). Houve diferenças significativas ($P < 0,05$) para o comportamento de interação nos períodos de 24h ($1,61 \pm 0,11$), 36h ($1,74 \pm 0,14$) e 60h ($1,61 \pm 0,13$) após a cirurgia, em relação ao grupo controle ($2,54 \pm 0,15$). Para a procura por esconderijo, houve diferença significativa ($P < 0,05$) às 12h ($1,61 \pm 0,08$) e 24h ($1,61 \pm 0,09$) após a cirurgia em relação ao controle ($1,12 \pm 0,06$). A acurácia total da videoceloscopia foi de 96,7%. Para animais identificados como fêmeas e machos, a especificidade foi de 100% e 94,7% respectivamente. Por outro lado, a sensibilidade foi de 94,7% e 100% respectivamente. A biopsia gonadal apresentou eficácia de 83%. Pode-se concluir que o protocolo anestésico e as técnicas cirúrgicas de videoceloscopia e biopsia gonadal são eficazes e seguras. Além disso, ambas as técnicas foram validadas como métodos de sexagem em *A. ocellatus*.

Palavras-chave: Cirurgia. Peixes. Sexagem.

ABSTRACT

The objective was to evaluate the safety of videocoscopy and gonadal biopsy and to validate the methods of sexuality in *A. ocellatus*. A total of 31 adult animals (168.26 ± 54.09 g and 20.21 ± 2.48 cm) were used. For induction and anesthetic maintenance, use clove oil (140 mg / L and 70 mg / L water) in a recirculation system. In the pre-hereditary, antibiotic therapy with florfenicol (50 mg / kg) and analgesia with morphine (5 mg / kg), both intramuscularly, were performed. For access to the coelomatous cavity, the animal was kept in the supine position and an incision was made in the ventral midline. Then, the endoscope optic is inserted to visualize the gonads and identify the sex. Subsequently, with the aid of a laparoscopic forceps, a gonadal tissue fragment was collected and packed in 10% formal buffer. For synthesis of the cavity, the polyamide was used in a continuous simple pattern, and the animals were then monitored for anesthetic recovery. After 15 days of surgery, a healing was assessed and the stitches removed. Anesthesia anesthetic was used in the attempt of recovery and recovery of anesthetics for males and females. The surgical procedures, the presence of surgical parameters, healing, survival rate, food consumption and behavioral parameters were the following parameters. For validation of sexing methods, a histological analysis of the gonads was used as the gold standard method. The total time of videocoscopy, gonadal and gonadal and bipolar biopsies were significantly higher ($p < 0.05$) for animals corrected as males (118.84 ± 108.04 s, 231.62 ± 226.59 if $720.00 \pm (26.88 \pm 38.08$ s, 84.72 ± 36.63 s 366.66 ± 112.51 s). In only one animal was observed the gastrointestinal tract, dehiscence ($p < 0.05$) for the period of 24h ($61.45 \pm 5.41\%$) and 36h ($61.13 \pm 6.13\%$) post-surgical compared to the control (preoperative) ($83.87 \pm 4.42\%$). In relation to height, differences ($P < 0.05$) were observed for (1.45 ± 0.09) and 72h (3.12 ± 0.14) after surgery, when compared to control (2.48 ± 0.15). , 05) for trading behavior at 24h (1.61 ± 0.11), 36h (1.74 ± 0.14) and 60 h (1.61 ± 0.13) in one surgery, he attended the control group (2.54 ± 0.15). The children were submitted to a hypersensitivity test ($p < 0.05$) at 12h (1.61 ± 0.08) and 24h (1.61 ± 0.09). 0.06). Total videoectomy accuracy was 96.7%. For wild and male animals, a specificity was 100% and 94.7%. On the other hand, the resistance was 94.7% and 100% respectively. A gonadal biopsy appeared to be 83%. In order to perform the anesthetic protocol and the surgical techniques of sonographic and safe gonadal videography and gonadal biopsy. In addition, the techniques were validated as sexing methods in *A. ocellatus*.

Keywords: Surgery. Fish. Sexing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplar de <i>A. ocellatus</i> adulto.....	14
Figura 2 - Desenho esquemático de sistema anestésico sem recirculação para manutenção da anestesia.....	22
Figura 3 - Desenho esquemático de sistema anestésico com recirculação para manutenção da anestesia.....	23
Figura 4 - Procedimentos cirúrgicos de videoceloscopia em <i>A. ocellatus</i> . (A) Remoção das escamas para preparo do campo cirúrgico, (B) transposição da parede abdominal com fio de poliamida, (C) afastamento da parede abdominal utilizando o fio de poliamida e (D) posicionamento da ótica para visualização das gônadas.	33
Figura 5 - Biopsia gonadal (ovário) por meio de videoceloscopia em <i>A. ocellatus</i> , utilizando uma pinça laparoscópica.....	33
Figura 6 - Valores para tempos de videoceloscopia, biopsia gonadal e cirurgia em <i>A. ocellatus</i> submetidos à sexagem por videoceloscopia e biopsia gonadal.	37
Figura 7 - Cicatrização da ferida cirúrgica (ponta da seta) após videoceloscopia em <i>A. ocellatus</i>	38
Figura 8 - Variações no consumo alimentar (A), nas escalas de posição na coluna d'água (B), interação com o observador e o alimento (C) e procura por esconderijo (D) antes e após a videoceloscopia e biopsia gonadal em <i>A. ocellatus</i>	39
Figura 9 - (A) Imagem da videoceloscopia do ovário de <i>A. ocellatus</i> (aumento 4x); (B) Imagem da videoceloscopia do testículo de <i>A. ocellatus</i> (aumento 4x); (C) Lâmina histológica do ovário de <i>A. ocellatus</i> , caracterizada por lamelas ovígeras com ovócitos em diferentes fases de desenvolvimento (aumento de 10x); (D) Lâmina histológica do testículo de <i>A. ocellatus</i> visualizando túbulos seminíferos com células espermáticas em diferentes estágios de desenvolvimento (aumento de 10x).	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição dos estágios da anestesia e dos parâmetros usados para monitorar a anestesia em peixes.	24
Tabela 4 - Valores para acurácia, especificidade e sensibilidade da videoceloscopia como método de sexagem em <i>A. ocellatus</i>	41

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	<i>Astronotus ocellatus</i>	12
2.2	Importância da identificação do sexo em peixes	14
2.3	Métodos de sexagem em peixes	15
2.4	Anestesia e analgesia em peixes	18
2.4.1	Importância da anestesia e da analgesia em peixes	18
2.4.2	Agentes anestésicos e vias de administração	19
2.4.3	Indução, manutenção e recuperação anestésica	20
2.4.4	Monitoramento da anestesia (Planos anestésicos)	23
2.4.5	Fatores que afetam a qualidade da anestesia	24
2.5	Cirurgia em peixes	25
2.5.1	Preparação pré-operatória	26
2.5.2	Abordagem cirúrgica da cavidade celomática	27
2.5.3	Abordagem cirúrgica na videoceloscopia e biopsia gonadal	28
2.5.4	Pós-operatório e complicações cirúrgicas	29
3	MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1	Local, animais e manejo	31
3.2	Indução e manutenção anestésica	31
3.3	Equipamento de videoceloscopia e biopsia	32
3.4	Técnica cirúrgica de videoceloscopia e biopsia gonadal	32
3.5	Recuperação anestésica e monitoramento pós-operatório	34
3.6	Avaliação da eficácia da cirurgia de videoceloscopia e biopsia gonadal	34
3.7	Validação da técnica de videoceloscopia e biopsia gonadal como métodos de sexagem	35
3.8	Determinação da acurácia, especificidade e sensibilidade	35
3.9	Análises estatísticas	36
4	RESULTADOS	37
4.1	Avaliação da eficácia da cirurgia de videoceloscopia e biopsia gonadal	37
4.2	Validação das técnicas de videoceloscopia e biopsia gonadal como métodos de sexagem	39
5	DISCUSSÃO	42
5.1	Avaliação da eficácia da cirurgia de videoceloscopia e biopsia gonadal	42
5.2	Validação da técnica de videoceloscopia e biopsia gonadal como métodos de sexagem	45
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
7	CONCLUSÕES	50
	REFERÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

Na aquicultura, uma importante estratégia para a gestão de programas reprodutivos é a capacidade de identificar o sexo e o estágio de desenvolvimento gonadal em peixes, considerando o uso de técnicas minimamente invasivas. Isto se torna ainda mais importante em espécies de peixes que não apresentam dimorfismo sexual e cromossomos sexuais heteromórficos. Frente a estas limitações, a sexagem e seleção dos animais para formação do plantel de reprodutores pode ser dificultada, resultando em importantes perdas econômicas.

Astronotus ocellatus é uma espécie de peixe nativo da América do Sul, sendo encontrada originalmente na bacia do rio Amazonas, incluindo Peru, Colômbia e Brasil. Popularmente, é conhecida como oscar, apaiari, carro-baiano, apanari ou acará-açu e sua maior representatividade econômica está associada à aquariofilia, embora seja também apreciado para consumo no Norte e Nordeste do Brasil, devido as suas características favoráveis como carne firme, saborosa e sem espinhas intramusculares.

Em *A. ocellatus*, por ser uma espécie monogâmica e com necessidade de formação de casais, a identificação do sexo se torna ainda mais importante. Entretanto, geralmente, a seleção de machos e fêmeas é realizada por meio de características morfológicas subjetivas, como formato da nadadeira, da papila urogenital e coloração, sem comprovação científica de sua validade. De acordo com revisão bibliográfica recente, apenas um método foi descrito para sexagem em *A. ocellatus*, por meio de dosagem de esteroides sexuais, porém, a técnica mostrou-se limitada para uso em animais sexualmente imaturo. Diante disso, dada a importância econômica da espécie e a dificuldade de diferenciação sexual, faz-se necessária a definição de métodos de sexagem não letais e minimamente invasivos.

Dentre os diferentes métodos de sexagem em peixes, podem-se citar a videoceloscopia e a biopsia gonadal, sendo ambos os métodos técnicas cirúrgicas minimamente invasivas. A videoceloscopia baseia-se na visualização das gônadas através de endoscópico, tendo acesso direto à cavidade celomática por meio de uma pequena incisão na parede celomática. Este método tem se mostrado extremamente eficaz e seguro, com risco mínimo e baixa mortalidade, em uma variedade de espécies de peixes.

A biopsia gonadal, por sua vez, consiste em coletar fragmentos gonadais para análise histológica, que é o padrão-ouro para identificação do sexo. A biopsia das gônadas tem sido proposta, principalmente, para a confirmação do sexo em situações em que outros métodos mostraram-se ineficazes. Visto isso, a associação da técnica de videoceloscopia e biopsia gonadal podem fornecer uma excelente oportunidade para pesquisadores e aquicultores no

que diz respeito, por exemplo, a diferenciação entre machos e fêmeas e também a definição do seu *status* reprodutivo.

É importante ressaltar que, por serem técnicas cirúrgicas, antes de serem validadas como métodos de sexagem, é de suma importância assegurar sua eficácia e nível de segurança, minimizando possíveis riscos à saúde e à vida dos animais. Neste aspecto, o uso de protocolos anestésicos adequados deve ser considerado, definindo, por exemplo, os fármacos empregados, dose e via de administração. Além disso, deve-se garantir que os procedimentos cirúrgicos causem o mínimo de efeitos possíveis sobre parâmetros fisiológicos e comportamentais, resultando em boa recuperação pós-operatória, baixo índice de complicações cirúrgicas e baixa mortalidade.

Considerando a necessidade de estabelecer métodos cirúrgicos minimamente invasivos de sexagem em *A. ocellatus*, objetivou-se com a execução do presente estudo avaliar a segurança dos procedimentos cirúrgicos de videoceloscopia e biopsia gonadal, bem como validá-las como métodos de sexagem em *A. ocellatus*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Astronotus ocellatus*

Astronotus ocellatus é um peixe da família Cichlidae, da ordem Perciformes, sendo popularmente conhecido como oscar, apaiari ou acará-açu. É uma espécie nativa da América do Sul, na bacia dos rios Amazonas, Aroak, Içá e Negro, sendo encontrado em países como Peru, Colômbia, Guiana Francesa e Brasil (PAVANELLI, 2000).

A dispersão da espécie, no Brasil, iniciou-se em 1983, em açudes e rios do Nordeste, pelo Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS), sendo atualmente encontrado em quase todo território brasileiro (FONTENELE, 1982). Nos demais continentes, há relatos de observação da espécie em países como Estados Unidos, Austrália, Canadá, China, Itália e Cingapura, já sendo considerada uma espécie cosmopolita.

A criação do *A. ocellatus* tem a aquariofilia como sua finalidade principal, devido as suas características morfológicas e comportamentais marcantes. Porém, em determinadas regiões do Brasil, como por exemplo, no Norte e Nordeste, a espécie é bastante apreciada para consumo, devido às características da sua carne (GURGEL; FREITAS, 1973).

Morfologicamente, a espécie caracteriza-se pela presença de um ocelo quase circular, de cor preta, orlada de vermelho-carmim, localizado no pedúnculo caudal próximo à inserção da nadadeira caudal (FONTENELE, 1982). Sua coloração é variável, podendo apresentar-se marrom ao vermelho-ferrugem, sendo comum a identificação de indivíduos albinos. Na fase reprodutiva, a coloração tende a se acentuar e as tonalidades marrons mudam para negra, principalmente o carmesim na base do opérculo, nas faixas verticais, dorso e parte superior da cabeça (FIGURA 1) (WEBB; MAUGHAN; KNOTT, 2007). A espécie apresenta o corpo achatado lateralmente, com formato fusiforme e região dorsal espessa. A cabeça é pequena em relação ao corpo, com olhos grandes e com íris laranja ou vermelha. As nadadeiras dorsal e anal apresentam espinhos proeminentes e a nadadeira caudal é arredondada (FONTENELE, 1982).

A. ocellatus é uma espécie territorialista, caracterizada por apresentar comportamento agonístico no estabelecimento de um posto social em uma hierarquia de dominância (SHACKLETON; JENNIONS; HUNT, 2005). Também há relatos que possui a capacidade de mimetizar a própria morte, tanatose, sendo importante mecanismo na captura de presas e na defesa contra predadores (TOBLER, 2005).

O oscar é uma espécie onívora, com preferência alimentar por insetos, crustáceos e pequenos peixes (HONEBRINK, 1990). A espécie habita, preferencialmente, pântanos e várzeas de rios de águas lânticas, sendo geralmente encontradas em meio a detritos lenhosos. Nas fases iniciais de desenvolvimento, quando alevinos e juvenis, apresenta comportamento gregário, vivendo em cardumes compactos. Entretanto, quando adultos tendem a formar casais e permanecem menos conjuntamente (FELDBERG; PORTO; BERTOLLO, 2003).

A. ocellatus é uma espécie com considerável tolerância ecológica, sendo resistente a baixos níveis de oxigênio dissolvido na água, a variação de temperatura e pH. Quanto à concentração de oxigênio dissolvido na água, o oscar é capaz de sobreviver em níveis inferiores a 0,4 mg/L (MUUSZE et al., 1998). Animais adultos podem sobreviver por até 6 horas em condições de hipóxia ou até anoxia, variando com o tamanho do animal (SLOMAN et al., 2001). A temperatura máxima de cultivo pode variar entre 23-34 °C, sendo a temperatura mínima crítica de, aproximadamente, 13 °C (SHAFLAND; PESTRAK, 1982). A faixa de tolerância do pH, por sua vez, varia em torno de 6 e 7. Devido a sua distribuição nos trechos médio e superior dos rios da bacia Amazônica, considera-se que a espécie apresenta tolerância limitada à salinidade (WEBB; MAUGHAN; KNOTT, 2007).

O apaiari é uma espécie ovípara, caracterizada por sua desova parcelada, restrita aos meses mais quentes do ano, com temperaturas superiores a 25 °C. Os animais atingem a maturidade a partir de, aproximadamente, 12 cm de comprimento total, sendo a maturidade sexual alcançada em torno de 12 meses (PAIVA; NEPOMUCENO, 1989). As fêmeas depositam em média de 200 a 2.000 ovos em substratos, sendo o número de ovos correlacionados positivamente com o tamanho do corpo da fêmea (BEECHING, 1997). A espécie apresenta cuidado biparental, sendo este papel desempenhado especialmente pelas fêmeas. Após a eclosão dos ovos, em torno de 3 a 4 dias, o cuidado parental das larvas permanece por um período de várias semanas (BEECHING, 1997).

Quanto ao comportamento reprodutivo, a espécie apresenta acasalamento monogâmico formando casais que permanecem unidos por toda a vida (BEECHING, 1997; ENQUIST; JAKOBSSON, 1986). *A. ocellatus* não apresenta dimorfismo sexual marcante, sendo os sexos diferenciados por características subjetivas, tais como, coloração, formato da nadadeira e da papila urogenital (FELDBERG; PORTO; BERTOLLO, 2003).

Figura 1 - Exemplar de *A. ocellatus* adulto.

Fonte: Arquivo pessoal (2016).

2.2 Importância da identificação do sexo em peixes

A identificação precoce do sexo em peixes, aliada à avaliação da sua condição reprodutiva, deve ser considerada questão primordial em protocolos de reprodução em cativeiro (NEWMAN; JONES; INGRAM, 2008). A sexagem adequada pode contribuir para a definição de estratégias que facilitem o manejo reprodutivo, desde a seleção dos animais até a indução hormonal da reprodução. Adicionalmente, é possível, por exemplo, formar um plantel de reprodutores considerando uma proporção adequada de machos e fêmeas, o que contribui para a redução do estresse e de gastos com manutenção de matrizes indevidas. Como consequência, pode-se observar o aumento da produção de alevinos, obtendo assim, maior ganho econômico (CHU-KOO et al., 2009).

Em espécies que são sexualmente monomórficas, a diferenciação do sexo e avaliação do estado reprodutivo dos indivíduos apresenta-se como um grande desafio (NEWMAN; JONES; INGRAM, 2008). Nestas espécies, na qual se pode incluir o *A. ocellatus*, a sexagem, geralmente, é realizada tardiamente durante a fase reprodutiva e baseia-se na observação de características externas subjetivas. Tais características incluem, em fêmeas, abdômen abaulado e hiperemia da papila urogenital em fêmeas, e em machos, liberação de pequena quantidade de sêmen por massagem abdominal (CREPALDI et al., 2006). Em *A. ocellatus*, há relatos de dimorfismo entre os sexos associado ao formato da papila urogenital, entretanto, este método é extremamente subjetivo e pouco confiável (PAIVA; NEPOMUCENO, 1989).

Diante das limitações apresentadas acima, diferentes métodos de sexagem, não letais e minimamente invasivos, têm sido propostos como alternativa para identificação do sexo. Como exemplo, pode-se citar a ultrassonografia (MARTIN et al., 1983), dosagem de esteroides sexuais (BERLINSKY; SPECKER, 1991), endoscopia (ORTENBURGER;

JANSEN; WHYTE, 1996) e biópsia gonadal (ALAM; NAKAMURA, 2008). Cada um destes métodos apresenta vantagens e desvantagens importantes, que devem ser consideradas no momento da escolha de qual técnica utilizar.

2.3 Métodos de sexagem em peixes

O exame ultrassonográfico é uma técnica de sexagem não invasiva que, além de ser de rápida execução, oferece risco mínimo para o animal. A técnica permite a visualização das gônadas e tem se mostrado eficaz em diferentes estudos para a identificação do sexo, especialmente em peixes sexualmente maduros (EVANS; FITZPATRICK; SIDDENS, 2004; MARTIN-ROBICHAUD; ROMMENS, 2001; NEWMAN; JONES; INGRAM, 2008; WILDHABER et al., 2005). Além de ser utilizada como método de sexagem, a ultrassonografia tem sido proposta a fim de determinar o estágio do desenvolvimento e o status reprodutivo (NEWMAN; JONES; INGRAM, 2008).

Outras importantes vantagens da sexagem por ultrassonografia incluem o uso opcional de anestesia, baixo nível de estresse aos animais e possibilidade de avaliação de um grande número de peixes em um curto período de tempo (KOHN et al., 2013). Em contrapartida, a desvantagem mais marcante deste método é a diminuição de sua eficiência quando utilizada em animais sexualmente imaturos, principalmente machos, devido ao pequeno tamanho das gônadas (MARTIN-ROBICHAUD; ROMMENS, 2001). Adicionalmente, tal técnica requer um alto nível de habilidade e treinamento para identificação e interpretação das imagens, o que pode representar um fator limitante para o seu uso (KOHN et al., 2013).

A dosagem de esteroides sexuais já vem sendo investigada como método de sexagem em diferentes espécies de peixes, como o salmão (*Salmo salar*) (POTTINGER et al., 2005), pirarucu (*Arapaima gigas*) (CHU-KOO et al., 2009), beluga (*Huso huso*) (NAZERI et al., 2014) e *Astronotus ocellatus* (CARVALHO et al., 2017). A técnica baseia-se na dosagem dos níveis plasmáticos de andrógenos e estrógenos por meio de radioimunoensaio ou ensaio de imun absorção enzimática (ELISA) (CHU-KOO et al., 2009; KOHN et al., 2013). Esta técnica de sexagem tem-se apresentado bastante eficaz e precisa. Como principais vantagens podem-se destacar a sua praticidade, o fato de ser um método quantitativo e minimamente invasivo e a possibilidade de aplicação em animais sexualmente imaturos (KOHN et al., 2013). Entretanto, o seu elevado custo e a carência de laboratórios e profissionais especializados podem limitar a sua aplicação na rotina das pisciculturas (POTTINGER et al., 2005).

A celiotomia é uma técnica cirúrgica na qual se realiza a abertura através de uma incisão cujo tamanho varia de acordo com o procedimento a ser empregado e ao tamanho do peixe. Na aplicação da celiotomia para sexagem, realiza-se uma incisão de aproximadamente 3 cm, geralmente sobre a linha mediana ventral, a partir da qual procede-se a localização das gônadas (HARMS, 2005; SLADKY; CLARKE, 2016). Tal método é considerado bastante invasivo e requer treinamento do profissional que o executa, devido ao risco de lesionar as vísceras do paciente.

A endoscopia é um método diagnóstico que consiste na inspeção visual interna de órgãos por meio do uso de lentes especializadas de um endoscópio (MOCCIA et al., 1984). Especificamente para identificação do sexo em peixes, a endoscopia permite a visualização das gônadas e pode ser realizada por meio de duas abordagens diferentes. Primeiramente, a óptica do endoscópio pode ser inserida através de uma pequena abertura na parede celomática, o que permite uma visualização direta da gônada, sendo esta técnica denominada de celoscopia ou videoceloscopia. Por outro lado, a gonadoscopia consiste em realizar a inserção da óptica do endoscópio através da papila urogenital (BRYAN et al., 2007; HURVITZ et al., 2007; WILDHABER et al., 2005).

Ao se comparar as duas abordagens de endoscopia, observam-se aspectos positivos e negativos de cada uma delas. Por exemplo, a gonadoscopia tem vantagem em relação à videoceloscopia, principalmente, no que se refere ao fato de não necessitar de anestesia, favorecendo o seu desenvolvimento em estudos de campo. Além disso, o acesso do endoscópio via papila urogenital dispensa a necessidade de incisões, suturas e insuflação da cavidade celomática, práticas estas que podem dificultar a recuperação do animal após o procedimento. Por outro lado, embora seja mais invasiva, haja vista a necessidade de abertura da cavidade celomática, a videoceloscopia é uma técnica mais precisa e eficaz por permitir visualização direta da gônada e obtenção de melhores imagens (FALAHATKAR et al., 2013).

A endoscopia, via celoscopia, tem sido amplamente empregada para a identificação do sexo e avaliação do desenvolvimento gonadal em diferentes espécies de esturjões, como por exemplo, em esturjões do golfo do México (*Acipenser oxyrinchus desotoi*) (HERNANDEZ-DIVERS et al., 2004), esturjão russo (*Acipenser gueldenstaedtii*) (HURVITZ et al., 2007), esturjão branco (*Huso huso*) (FALAHATKAR et al., 2011), Em espécies nativas do Brasil, está técnica de sexagem já foi utilizada, por exemplo, em surubim (*Pseudoplatystoma corruscans* X *Pseudoplatystoma reticulatum*) (CHAVES et al., 2015) e pacamã (*Lophiosiluru alexandri*) (MELILLO et al., 2016).

Em geral, a endoscopia como método de sexagem apresenta eficiência superior a 90%, o que indica a sua aplicabilidade em diferentes espécies de peixes. Uma das suas grandes vantagens é a possibilidade de ser utilizada tanto a campo como em laboratório, uma vez que, permite a utilização de equipamentos portáteis (FALAHATKAR et al., 2011). Diferentemente da ultrassonografia, a endoscopia permite uma visualização direta da gônada e, em fêmeas, da cor, tamanho e distribuição dos ovócitos. Com isso, a sexagem torna-se mais precisa principalmente em animais jovens (HURVITZ et al., 2007). Por fim, é capaz também de fornecer resultado imediato quanto ao sexo e ao desenvolvimento gonadal, ao contrário da dosagem de hormônios (FALAHATKAR et al., 2011).

Entre as desvantagens da técnica, deve-se considerar o elevado custo do endoscópio, necessidade de conhecimento prévio da anatomia da espécie e da experiência do observador na avaliação das gônadas em diferentes estágios de desenvolvimento. Para minimizar possíveis erros da técnica, o treinamento e validação da mesma tornam-se necessários (FALAHATKAR et al., 2011). Embora seja uma técnica mais invasiva para identificação do sexo, uma vez que, necessita de anestesia, incisão e sutura da parede celomática, sua maior eficácia e precisão em relação aos outros métodos, a torna atrativa (WILDHABER et al., 2005).

Para que possa ser utilizada a campo e na rotina da aquicultura, um sistema de endoscopia para sexagem deve considerar os seguintes aspectos: (1) utilização de uma óptica de qualidade para uma técnica de entrada única; (2) utilização de técnica de insuflação da cavidade celomática de baixo custo e eficaz, permitindo uma melhor visualização gonadal; (3) possibilidade de realização de biopsias para a confirmação histológica dos achados endoscópicos e (4) uso de equipamentos compactos e portáteis (DIVERS et al., 2009).

A biopsia gonadal, como método de sexagem, tem sido realizada com segurança especialmente em esturjões (FALAHATKAR; POURSAEID, 2014) e, ocasionalmente, verifica-se seu emprego em outras espécies de peixes (ALAM; NAKAMURA, 2008; LOKMAN et al., 2001; MATSUBARA et al., 2003). O princípio da técnica consiste em coletar fragmentos gonadais que possam ser avaliados por análise histológica, sendo esta última considerada padrão-ouro para identificação do sexo (FALAHATKAR et al., 2011). Esta coleta pode ser realizada de duas maneiras diferentes, com o auxílio da videoceloscopia (DIVERS et al., 2009; HERNANDEZ-DIVERS et al., 2004) ou com o uso de um “trocatel”, em que é feito a punção do tecido através da parede celomática (HURVITZ et al., 2007).

A capacidade de obter amostras gonadais para análise histológica fornece mais uma oportunidade de método não letal de sexagem em peixes (DIVERS et al., 2009). Entretanto, o

seu uso ainda é limitado, sendo especialmente aplicado para a confirmação do sexo em casos em que outros métodos de sexagem foram imprecisos (DIVERS et al., 2009; HERNANDEZ-DIVERS et al., 2004). Além disso, embora seja extremamente eficaz, em animais jovens, devido ao menor tamanho da gônada e excesso de tecido adiposo, a coleta da gônada é mais difícil, o que pode tornar a biopsia improdutiva. Com isso, muitas vezes, é necessário realizar uma segunda avaliação e coleta, tornando o método mais dispendioso e oneroso (HURVITZ et al., 2007).

2.4 Anestesia e analgesia em peixes

Em qualquer tipo de procedimento que possa ocasionar desconforto e dor aos animais, é necessária a utilização de anestesia. Isto inclui a realização de procedimentos de sexagem, especialmente quando se utiliza técnicas invasivas. Diante disso, é de extrema importância conhecer os principais anestésicos disponíveis para utilização em peixes, os fatores que afetam sua eficácia, bem como os procedimentos de indução, manutenção e recuperação anestésica.

2.4.1 Importância da anestesia e da analgesia em peixes

Os peixes representam a classe de animais vertebrados com maior número de espécies, sendo utilizados para diferentes finalidades, tais como, alimentação, animais de companhia e modelos experimentais para pesquisas. Com isso, nos últimos anos, tem-se observado um crescente interesse no desenvolvimento de pesquisas em diferentes áreas, incluindo anestesia e dor (STOSKOPF; POSNER, 2008). Entretanto, ainda há necessidade de desenvolver novas pesquisas no que diz respeito à indução anestésica, taxa de recuperação, farmacocinética e efeitos colaterais dos anestésicos. Isso se deve, primeiramente, às variações espécie-específica, sendo os estudos, muitas vezes, restritos a poucas espécies. Adicionalmente, devem-se considerar outros fatores que podem afetar a eficácia dos anestésicos, como por exemplo, fatores biológicos e abióticos (SNEDDON, 2012), como será descrito posteriormente.

A pesquisa com anestesia e analgesia em peixes tornou-se ainda mais atrativa a partir das evidências de que estes animais também apresentam mecanismos nociceptivos, semelhante ao que ocorre em mamíferos (SNEDDON, 2012). A presença de dor em peixes tem sido evidenciada, por exemplo, por meio de estudos que envolvem alterações

comportamentais e fisiológicas em indivíduos submetidos a processos potencialmente dolorosos (ASHLEY et al., 2009; NORDGREEN et al., 2009). Além disso, tais alterações são reduzidas quando administrado analgésico, reforçando a presença de um sistema de percepção de dor nestes animais (METTAM et al., 2011; SNEDDON, 2003).

Em peixes, os anestésicos podem ser utilizados para diversas finalidades, tais como, transporte, manuseio e procedimentos cirúrgicos. O uso de anestésico tem como função principal deprimir o SNC e, na maioria das vezes, diminuir o estresse nos animais. Neste quesito, os anestésicos se mostram bastante eficientes reduzindo indicadores fisiológicos de estresse, além de diminuir a mortalidade frente a agentes estressores severos (SNEDDON, 2012; WEBER, 2011).

Deve-se notar que, nem sempre, um fármaco anestésico é capaz de proporcionar analgesia, desta forma, dependendo do procedimento ao qual o animal será submetido, é necessário administrar também fármacos analgésicos. Em geral, os analgésicos são utilizados com o objetivo de reduzir a dor e melhorar o bem-estar, de forma a promover uma melhor recuperação do paciente após a submissão a procedimentos dolorosos e estressantes (SNEDDON, 2012). Como exemplo de analgésicos em peixes, pode-se destacar o uso de opioides, tais como a morfina (SNEDDON, 2003), e dos anti-inflamatórios não esteroidais, incluindo, o carprofeno, meloxicam, cetoprofeno, flunixinina meglumina (WEBER et al., 2009).

2.4.2 Agentes anestésicos e vias de administração

Uma série de agentes anestésicos pode ser utilizada na aquicultura, sendo os mais comuns a metanosulfonato de triclaína (MS-222), benzocaína, eugenol (óleo de cravo), metomidato, 2-fenoxietanol e quinaldina. Em geral, é mais comum a utilização de anestésicos de forma isolada, entretanto, a associação dos mesmos pode proporcionar uma anestesia mais completa e redução da dose a ser utilizada. Além disso, devido ao efeito balanceado dos anestésicos, a combinação de diferentes fármacos pode reduzir os efeitos adversos sem diminuir o grau de anestesia (SNEDDON, 2012). Como exemplo, em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e em lucio (*Esox lucius*) a associação do MS-222 e da quinaldina, mostrou-se eficaz na indução anestésica, reduzindo a mortalidade e os efeitos colaterais (SCHOETTGER; STEUCKE, 1970).

Dentre os anestésicos mencionados acima, o óleo essencial de cravo tem sido cada vez mais utilizado na prática de piscicultura, tanto em espécies de água doce como marinha. Este óleo apresenta em sua composição o eugenol na proporção de 90-95%, sendo este o princípio

anestésico ativo. Na prática, considera-se que 1 mL de óleo de cravo contém, aproximadamente, 100 mg de eugenol (LEWBART, 2005). Devido a sua baixa solubilidade em água, o eugenol tem que ser previamente diluído em etanol (95%), geralmente, na proporção de 1:9 (LEWBART, 2001).

Entre as propriedades farmacocinéticas favoráveis do eugenol, destaca-se a capacidade de fornecer uma rápida indução anestésica, embora a recuperação possa ser mais prolongada (SLADKY et al., 2001). Outras importantes vantagens incluem uma indução anestésica tranquila, sem excitação prolongada, quando comparado, por exemplo, o MS-222 e benzocaína (MUNDAY; WILSON, 1997). Entretanto, deve-se considerar a possibilidade de depressão respiratória em doses elevadas, acima de 100 mg/L e o fato de não fornecer boa analgesia (FIDDES, 2008).

Quanto às formas de administração dos fármacos anestésicos, a principal delas é por meio de imersão, sendo o animal colocado em um tanque de água contendo a solução anestésica. Por esta via, a absorção do fármaco ocorre pelas brânquias e pela pele e, assim sendo, a quantidade de anestésico que o animal recebe é diretamente dependente do tempo de exposição. Diante disso, é de fundamental importância o monitoramento constante da anestesia, considerando, principalmente, o grau de aprofundamento da mesma através dos planos anestésicos (FIDDES, 2008; WEBER, 2011). Outras possíveis vias de administração dos fármacos são por injeção intramuscular e por via oral (FIDDES, 2008; SNEDDON, 2012; WEBER, 2011).

2.4.3 Indução, manutenção e recuperação anestésica

Diferentemente do que é realizado em mamíferos, geralmente, não se utiliza sedação pré-anestésica em peixes. Isso se deve, principalmente, aos efeitos adversos de um manejo adicional para administração dos fármacos, como por exemplo, hipotermia e hipóxia. Diante disso, a maioria dos procedimentos opta por utilizar agentes anestésicos que permitam alcançar o plano anestésico adequado de acordo com a finalidade proposta (ROSS, 2001).

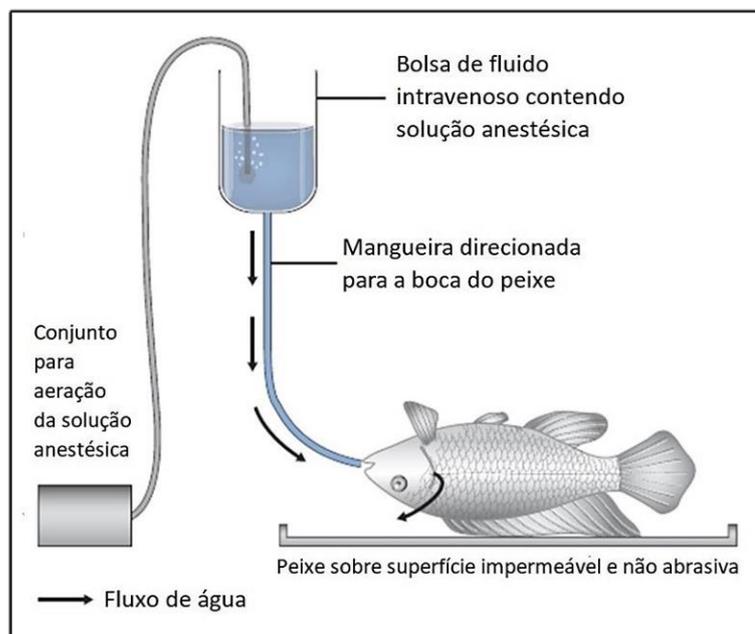
Considerando a imersão como via de administração do anestésico, a indução da anestesia deve ser realizada por banho do animal em um tanque ou aquário contendo a solução anestésica (HARMS, 1999). Para isso, é importante considerar algumas características do tanque de imersão, sendo este grande o suficiente para acomodar o animal confortavelmente, mas não tão grande que permita que o peixe se machuque durante a fase de excitação. Além disso, como muitos anestésicos são capazes de ocasionar depressão

respiratória é necessária a aeração deste tanque. Em geral, uma boa indução anestésica deve ser rápida o suficiente para reduzir o estresse e a duração da fase de excitação. Para isso, se pode lançar mão do uso de doses anestésicas mais elevadas para indução e reduzi-la na fase de manutenção (FIDDES, 2008).

A manutenção da anestesia depende do tipo de procedimento a ser realizado. Para procedimentos curtos, inferiores a 5 minutos, o peixe pode ser removido da solução anestésica e, quando necessário, retornar ao tanque de indução para o aprofundamento da anestesia. Entretanto, para procedimentos em que o animal permanecerá por maior tempo fora d'água, é necessário um sistema que direcione a água sobre as brânquias, permitindo a troca gasosa, entrega do fármaco e manutenção da anestesia. Para isso, dois sistemas podem ser utilizados: o de não recirculação e o de recirculação anestésica (FIDDES, 2008; SNEDDON, 2012).

No sistema em que não se utiliza a recirculação do anestésico, o peixe, após indução anestésica, é colocado sobre uma superfície acolchoada onde receberá o anestésico para manutenção. Por exemplo, bolsa de fluido venoso é preenchido com solução anestésica e um sistema de distribuição é responsável por direcionar o anestésico para as brânquias. Em seguida, a solução passa pelas brânquias e é eliminada (FIGURA 2) (FIDDES, 2008). Para alterar a profundidade anestésica, o fluxo de água pode ser controlado por meio de um conjunto de válvulas, que diminui ou aumenta a quantidade de solução anestésica recebida. Este tipo de sistema é mais recomendado para ser utilizado em peixes pequenos (HARMS, 2003).

Figura 2 - Desenho esquemático de sistema anestésico sem recirculação para manutenção da anestesia.

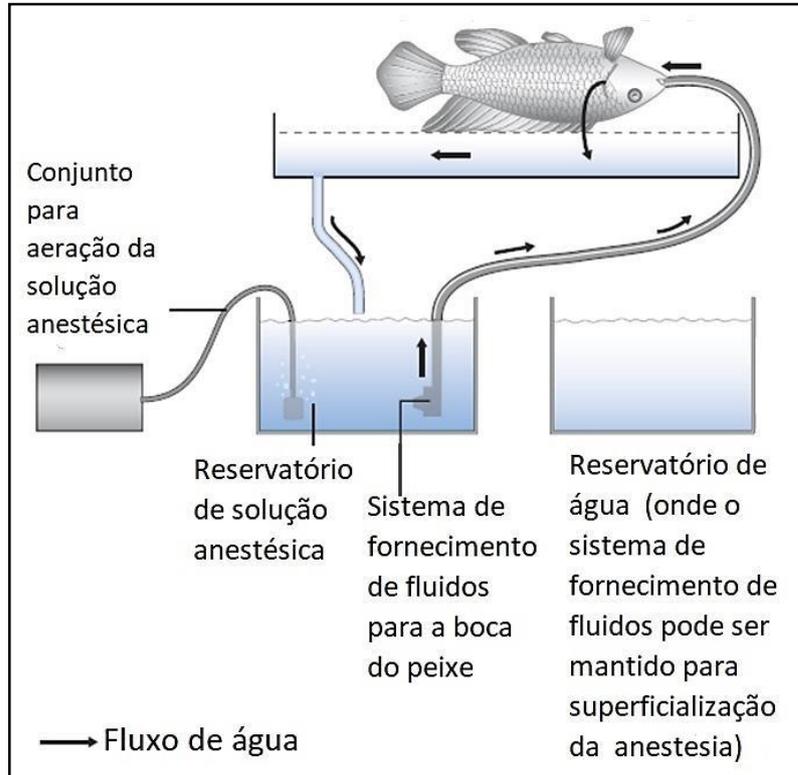


Fonte: Adaptação de Fiddes (2008).

Para os sistemas de recirculação, a solução anestésica é fornecida continuamente às brânquias. Um bom exemplo deste tipo de manutenção anestésica é o sistema elétrico, em que uma bomba elétrica é posicionada em um reservatório contendo a solução anestésica. Em conjunto, um sistema de distribuição é responsável por direcionar o anestésico para a boca do animal, passando pelas brânquias e retornando ao reservatório e, em seguida, de volta para o animal (Figura 3). A profundidade anestésica pode ser controlada por meio da regulação do fluxo da bomba. A utilização deste tipo de sistema de manutenção é ideal para peixes grandes e procedimentos mais longos, como por exemplo, em cirurgias (FIDDES, 2008).

Após realização do procedimento necessário, os animais devem ser transferidos para tanques sem solução anestésica, para que possam se recuperar da anestesia. Durante a recuperação, é importante monitorar o retorno anestésico, considerando a respiração, movimento e equilíbrio (HARMS, 1999). Em geral, espera-se que os anestésicos apresentem propriedades que permitam uma rápida indução, em torno de 3 min, e uma rápida recuperação anestésica, em no máximo 10 minutos (SMALL, 2003).

Figura 3 - Desenho esquemático de sistema anestésico com recirculação para manutenção da anestesia



Fonte: Adaptação de Fiddes (2008).

2.4.4 Monitoramento da anestesia (Planos anestésicos)

Em peixes, assim como na maioria das espécies animais, a indução e aprofundamento da anestesia são geralmente divididos em planos ou estágios, conforme apresentado na Tabela 1. Para identificar e avaliar cada um destes estágios os seguintes parâmetros devem ser considerados: atividade natatória, equilíbrio, comportamento, frequência respiratória, movimento dos olhos, respostas reflexas e frequência cardíaca. É importante ressaltar que as mudanças observadas nestes parâmetros, em cada estágio, dependem diretamente do nível de anestesia para cada procedimento. Por exemplo, em induções rápidas, é difícil notar a transição dos estágios anestésicos o que pode favorecer superdosagens (FIDDES, 2008; SNEDDON, 2012).

Tabela 1 - Descrição dos estágios da anestesia e dos parâmetros usados para monitorar a anestesia em peixes.

Estágios	Planos	Parâmetros para monitoramento
I	Sedação leve	Movimento natatório reduzido, reação a estímulos externos levemente reduzidos e equilíbrio normal. Movimentos operculares normais.
II	Excitação	Atividade aumentada, equilíbrio dificultado e resposta aumentada a estímulos externos. Movimentos operculares aumentados.
III	Plano Cirúrgico	Perda total dos reflexos, do equilíbrio e de resposta a estímulos externos. Movimentos operculares quase ausentes.
IV	Overdose	Perda total dos reflexos a estímulos externos e movimento opercular ausente. Óbito.

Fonte: Adaptado de Fiddes (2008); Sneddon (2012).

O plano anestésico desejável em cada procedimento irá depender diretamente do tempo e do grau de invasividade pela qual o animal será submetido. Assim sendo, em procedimentos rápidos e não invasivos, como pesagem, manuseio, inspeção e marcação externa, a sedação leve é suficiente. Por outro lado, para a realização de procedimentos invasivos ou de longa duração, como procedimentos cirúrgicos, é necessário alcançar planos anestésicos mais profundos (plano cirúrgico) (HILL; FORSTER, 2004).

2.4.5 Fatores que afetam a qualidade da anestesia

Há uma série de fatores que podem afetar a eficácia dos anestésicos em peixes, incluindo fatores biológicos e abióticos. Os principais fatores biológicos são: idade, sexo, condição corporal, peso, estágio de desenvolvimento, crescimento, estado fisiológico, saúde e condição reprodutiva. Em contrapartida, dentre os fatores abióticos podem-se destacar a qualidade da água, temperatura e oxigenação (SNEDDON, 2012).

Quanto ao tamanho e peso dos animais, os resultados disponíveis na literatura ainda são controversos e depende da espécie e do tipo de anestésico utilizado. Assim sendo, a influência estas variáveis, de maneira direta, sobre os tempos de indução e recuperação anestésica é bastante variável, sendo que a maioria dos estudos indica sobre a eficácia da

anestesia (GILDERHUS; MARKING, 1987; OLSEN; EINARSDOTTIR; NILSSEN, 1995; ZAHL et al., 2009).

Os peixes são animais heterotérmicos, sendo o seu metabolismo diretamente relacionado à temperatura da água, o que reflete diretamente na anestesia. Por exemplo, em salmão do Atlântico (*Salmo salar*), a anestesia com eugenol resultou em indução e recuperação anestésica mais rápida (HOSKONEN; PIRHONEN, 2004; WOOLSEY; HOLCOMB; INGERMANN, 2004). Entretanto, isto não ocorre para todas as espécies, uma vez que, o aumento da temperatura também pode resultar em um tempo mais prolongado de recuperação em outras espécies (ZAHL et al., 2009).

O estresse é capaz de afetar intensamente a anestesia em peixes, principalmente quando se utiliza a via de administração por imersão. O estresse tem a capacidade de aumentar as respostas cardiovasculares e o fluxo sanguíneo nas brânquias, produzindo maior disseminação de agentes anestésicos. Como consequência, podem-se observar variações nos tempos de indução e recuperação e o aprofundamento dos planos anestésicos (ZAHL et al., 2009). Entretanto, o uso de anestésicos, previamente ou durante eventos estressantes, pode ser benéfico para diminuir o efeito deste sobre o organismo (DAVIS; GRIFFIN, 2004; SMALL; CHATAKONDI, 2005).

2.5 Cirurgia em peixes

A realização de cirurgia em peixes tem se tornado cada vez mais comum. Com o avanço no desenvolvimento de protocolos anestésicos ficou mais fácil a realização de procedimentos cirúrgicos nestes animais. Além disso, o desenvolvimento de ferramentas diagnósticas e de novos tratamentos diminuiu a prática de eutanásia em peixes e, conseqüentemente, surge maior possibilidade de intervenção cirúrgica nestes animais (SLADKY; CLARKE, 2016).

Dentre as principais finalidades de se realizar cirurgia em peixes pode-se destacar o diagnóstico e tratamento de uma variedade de afecções, incluindo neoplasias, cirurgias oftálmicas, biópsias, problemas reprodutivos e ingestão de corpo estranho (STETTER, 2002; WEBER et al., 2009). Além disso, pode ser empregada para o desenvolvimento de pesquisa, em estudos de conservação, migração de peixes, entre outros (MULCAHY, 2003).

De maneira geral, as técnicas cirúrgicas realizadas em animais terrestres podem ser aplicadas de forma semelhante em peixes, desde um peixe-zebra de 1 g até um tubarão-tigre de 500 kg (SLADKY; CLARKE, 2016). Entretanto, é necessário considerar algumas

diferenças importantes, tais como, a ausência da linha alba e a coloração da musculatura, que é muito semelhante a coloração dos intestinos, levando a um alto risco de perfuração intestinal (HARMS et al., 2005).

O sucesso na realização de procedimentos cirúrgicos em animais aquáticos depende do conhecimento da anatomia da espécie, do uso de técnicas que minimizem os danos teciduais e secção de tecidos. Diante disso, é possível reduzir o desconforto, estresse e risco de complicações cirúrgicas (MULCAHY, 2003). Outro importante fator que interfere no sucesso cirúrgico é a utilização de técnicas assépticas, diminuindo o risco de infecções (MULCAHY, 2003; WAGNER et al., 2011). A partir destes cuidados, a cicatrização da ferida cirúrgica ocorre de forma adequada e, conseqüentemente, o retorno do animal a homeostasia é acelerado (MURRAY, 2002).

O treinamento é uma questão fundamental na execução de cirurgia em animais, principalmente quando se utiliza técnicas mais invasivas. Para procedimentos cirúrgicos, são necessárias várias habilidades para reduzir a probabilidade de erros e saber lidar com complicações que possam surgir durante o procedimento. Desta forma, é esperado que tais habilidades sejam fortemente correlacionadas ao resultado dos procedimentos (SZALAY et al., 2000).

Diante do exposto acima, a experiência e habilidade de quem realiza o procedimento cirúrgico afeta, não só a precisão da confecção e grau de retenção da sutura, mas também o tempo operatório (ANNETT, 1971; ENGELHORN, 1997). Em cirurgias mais longas, quanto maior for o tempo do procedimento maior será o período de anestesia e, conseqüentemente, recuperação mais longa, o que é crítico para o retorno do animal ao seu ambiente. Em peixes, esta correlação é ainda mais significativa devido a menor possibilidade de treinamento, quando comparada a cirurgias em outras espécies (COOKE et al., 2004). Em estudo realizado por Cooke et al. (2003), no qual se comparou o desempenho de cirurgiões experientes e inexperientes, estes levaram mais tempo para finalizar as cirurgias, além de reduzir a eficácia da técnica e resultar em maior mortalidade.

2.5.1 Preparação pré-operatória

Antes de iniciar qualquer procedimento cirúrgico, deve-se proceder a avaliação do animal. O tipo de avaliação pode variar de acordo com a necessidade de cada procedimento, entretanto, pode-se considerar a realização de exame físico, hemograma, perfil bioquímico sérico e exames de imagens, como radiografias e ultrassonografia. Em peixes, deve-se sempre

considerar a observação de parâmetros como atividade natatória, movimentos operculares, atitude e comportamento animal, visando possuir um parâmetro para a avaliação a recuperação pós-cirúrgica (MURRAY, 2002; SLADKY; CLARKE, 2016).

Independentemente da espécie, um adequado protocolo anestésico seguro e eficaz é um componente chave de um resultado cirúrgico bem sucedido. Além disso, muitas vezes, é necessário o uso de analgesia, que influencia diretamente na recuperação do animal. A antibioticoterapia, previamente ao procedimento cirúrgico, também deve ser considerada, visando a prevenção de infecções decorrentes de patógenos residentes no meio aquático. Entre os antibióticos mais utilizados na aquicultura pode-se citar a oxitetraciclina (10 mg/kg por via intramuscular (IM)), enrofloxacina (5-10 mg/kg, IM, a cada 24 horas), ceftazidima (30 mg/kg, IM, a cada 48-72 horas) e florfenicol (40 mg/kg, IM, a cada 24-48 horas) (MURRAY, 2002; NEIFFER; STAMPER, 2009).

Após sedação ou anestesia, o animal deve ser transferido para a área cirúrgica e preparado de forma adequada para a realização da cirurgia (FIDDES, 2008). Diferente do que ocorre em mamíferos, os peixes não requerem uma extensa preparação. Entretanto, as práticas de assepsia e posicionamento do animal, assim como nos demais vertebrados, são primordiais para uma boa execução da cirurgia. A manutenção da posição cirúrgica é um ponto crítico e pode ser feita com uso de blocos de espuma. A escolha deste material baseia-se nas suas características favoráveis, tais como, facilidade de aquisição, minimamente abrasiva à pele e capacidade de absorver a água, o que contribui para manter a pele do animal úmida (HARMS; LEWBART, 2000).

Após o posicionamento adequado do animal, a limpeza do local de incisão deve ser realizada, utilizando, geralmente, solução fisiológica estéril. Esta escolha se deve ao fato de que a presença do muco na superfície da pele é essencial para a osmorregulação e proteção, sendo que o uso de qualquer substância mais abrasiva pode comprometer sua produção (HARMS; LEWBART, 2000). Entretanto, ainda assim, alguns profissionais optam pelo uso de iodo povidona para antissepsia (SLADKY; CLARKE, 2016).

2.5.2 Abordagem cirúrgica da cavidade celomática

Para o acesso adequado da cavidade celomática, recomenda-se a realização de uma incisão suficiente para fornecer uma boa visualização da maioria dos órgãos desta cavidade. Para tal, na maioria das espécies de peixes, a incisão deve ser realizada com uma lâmina de bisturi #15 ou #10, sendo o acesso mais comum pela linha mediana ventral, realizando a

incisão da pele, musculatura e membrana celomática. Além disso, é importante ressaltar que em algumas espécies, como o, *Carassius auratus*, a cintura peitoral cartilaginosa, associada às nadadeiras peitorais, deve ser incisada com auxílio de uma tesoura (BAKER et al., 2013).

Para uma boa recuperação cirúrgica, é de fundamental importância considerar o fio e o padrão de sutura, uma vez que, estão intimamente relacionados com a ocorrência de processo inflamatório e lesões nos tecidos adjacentes (ANDERSON et al., 2010). Neste contexto, deve-se evitar o uso de fios multifilamentares, devido as suas características de capilaridade e maior risco de manter microrganismos e resultar em contaminações (FONTENOT; NEIFFER, 2004).

Em relação à sutura, geralmente, utiliza-se plano único com padrão simples separado (MULCAHY, 2003). Na maioria das vezes, a realização de plano único de sutura é suficiente, pois a derme é intimamente relacionada à musculatura, fazendo com que raramente exista espaço morto para ser reduzido (HARMS, 2005). Ainda assim, a sutura em duas camadas pode ser empregada, de forma eficiente. Neste caso, realiza-se a aproximação da membrana celomática, no padrão de cerzadura, e a aproximação da musculatura nos padrões simples separado ou de cerzadura (SLADKY; CLARKE, 2016).

2.5.3 Abordagem cirúrgica na videoceloscopia e biopsia gonadal

As indicações para videoceloscopia em peixes refletem aquelas descritas para outras espécies: identificação do sexo, manejo da reprodução, exame de vísceras, coleta de biopsia e remoção de corpos estranhos (MURRAY, 2010). Esta técnica é considerada um procedimento cirúrgico minimamente invasivo e com baixo risco de problemas iatrogênicos (HERNANDEZ-DIVERS et al., 2004). Outras importantes vantagens são menor tempo de monitoramento e retorno mais rápido do paciente para o seu grupo social (STETTER, 2010).

Para a realização da videoceloscopia, a abordagem cirúrgica adequada depende diretamente da anatomia da espécie em questão. Assim sendo, em espécies achatadas dorsalmente o ideal é o acesso pela linha mediana ventral. Por outro lado, em espécies que são achatadas lateralmente o melhor acesso da cavidade celomática é por meio de uma incisão paramediana cranial à abertura urogenital. O tamanho da incisão é variável, entre 3 a 5 mm, entretanto, deve permitir uma boa entrada do endoscópio (STETTER, 2010).

Os pontos de inserção para a laparoscopia são determinados pela estrutura "alvo" e pela anatomia da espécie submetida ao procedimento. O formato relativamente fusiforme da maioria dos peixes ciclídeos impede uma visualização adequada da maioria das estruturas

celomáticas. Assim sendo, recomenda-se o uso de técnicas que permitam a distensão da cavidade celomática. Tradicionalmente, esta técnica é realizada por meio da insuflação da cavidade celomática com dióxido de carbono, podendo ser utilizado ainda ar ambiente ou solução fisiológica. Independente da substância utilizada, deve-se sempre considerar a pressão de 10 mm/Hg. Além disso, é importante ressaltar que é necessário remover o máximo de gás possível da cavidade, com manipulação e pressão digitais, pois a permanência de excesso de gás pode dificultar o retorno e manutenção da posição adequada na coluna d'água (MURRAY, 2002, 2010; STETTER, 2010).

Em peixes, a abordagem cirúrgica para realização de biopsias tem sido frequentemente realizada de duas maneiras diferentes, por meio de celotomia e celoscopia/videoceloscopia. A celotomia da linha mediana ventral tem sido utilizada em uma variedade de espécies e permite a coleta de diferentes tecidos, entretanto, apresenta uma série de desvantagens. Por exemplo, para exploração da cavidade é necessária a realização de incisões maiores, aumentando a possibilidade de feridas. Além disso, a manipulação das vísceras pode resultar em lesões em diferentes tecidos, infecções e evisceração. Diante disso, tem-se preferido o uso da videoceloscopia para guiar a coleta de tecidos, apresentando significativos benefícios em relação à celotomia. Dentre suas vantagens pode-se destacar o fato de ser um método diagnóstico mais rápido e preciso, redução do estresse cirúrgico, redução da dor e desconforto e menor tempo de procedimento cirúrgico e recuperação (BOONE et al., 2008).

2.5.4 Pós-operatório e complicações cirúrgicas

Em geral, a cicatrização da ferida cirúrgica em espécies aquáticas ocorre de forma mais rápida e eficiente quando comparado aos vertebrados terrestres. A reepitelização do tecido se completa em 24 horas, enquanto que a proliferação, organização e diferenciação das células da epiderme, inicia-se em um período de 9 a 34 h, finalizando em 3 a 4 dias. Caso haja tecido muscular envolvido, sua regeneração começa de 7 a 8 dias após o trauma, finalizando em um período de 10 a 15 dias (FONTENOT; NEIFFER, 2004). É importante ressaltar que a temperatura influencia diretamente no tempo de cicatrização bem como nas respostas inflamatória e imune (MULCAHY, 2003). Em geral a remoção da sutura é realizada de 2 a 3 semanas após a cirurgia (WEBER et al., 2009).

A mortalidade de peixes associada a procedimentos cirúrgicos normalmente é muito baixa, entretanto, algumas complicações cirúrgicas podem ser observadas. Tais complicações incluem alterações comportamentais, diminuição na fluatuabilidade e equilíbrio, infecção,

deiscência da sutura e hemorragia (MULCAHY, 2003). Adicionalmente, podem ocorrer também lesões de órgãos internos, perda de muco, aumento da temperatura corporal, ressecamento da pele ou a combinação destes fatores. A ocorrência de qualquer uma destas complicações pode contribuir para eventuais mortes após o procedimento (SWENSON; ROSENBERGER; HOWELL, 2007).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local, animais e manejo

O experimento foi realizado na Ala de Peixes do Biotério Central, da Universidade Federal de Lavras (Lavras, MG, Brasil). Para isso, foi utilizado um total de 31 peixes da espécie *A. ocellatus* adultos (aproximadamente doze meses de idade), com peso médio de $168,26 \pm 54,09$ g e comprimento total médio de $20,21 \pm 2,48$ cm. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com a aprovação do Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da UFLA e registrado conforme protocolo 052/2013.

Durante o período experimental, os peixes foram mantidos individualmente em aquários de 40 L, em um sistema de recirculação de água, com controle da temperatura e filtros biológicos, mecânico e UV para manutenção da qualidade da água. Os aquários foram sifonados uma vez ao dia, sendo retirado, em média, 50% do volume total. A temperatura da água ($27 \pm 0,5$ °C) foi verificada por meio de termômetro de mercúrio com escala de 1 °C uma vez ao dia, às 9 horas. Foram quantificados, semanalmente, pela manhã, o pH ($6,9 \pm 0,56$) e teor de amônia tóxica ($0,28 \pm 0,1$ mg/L) através de kits comerciais colorimétricos (Alcon, Labcontest for pH Tropical e ToxicAmmonia, Camboriú (SC), Brasil). O teor de oxigênio dissolvido ($7,8 \pm 0,9$ mg/L) foi determinado com o auxílio de um oxímetro digital (ALFAKIT AT 155, Florianópolis (SC) Brasil). O fotoperíodo foi mantido em 14 h de luz e 10 h de escuro. A alimentação dos peixes foi realizada com ração comercial extrusada, com teor de 32% de proteína bruta (Fri-Aqua®), ofertada duas vezes ao dia (7 h e 19 h).

3.2 Indução e manutenção anestésica

Previamente à realização dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram mantidos em jejum por 24 horas. Em seguida, com auxílio de um puçá, foram capturados e transferidos individualmente para aquários de indução anestésica com solução de óleo de cravo (140 mg/L de água) e oxigenação abundante. Os animais foram considerados induzidos após atingir o estágio III da anestesia (plano cirúrgico), caracterizado por perda total do equilíbrio, dos reflexos e resposta a estímulos externos, além de diminuição dos movimentos operculares. Em seguida, os peixes foram transferidos para a área cirúrgica.

Na área de cirurgia, os peixes foram mantidos em decúbito dorsal em superfície acolchoada e conectados a sistema de recirculação anestésica, possibilitando a oxigenação e

manutenção da anestesia. Este sistema foi composto por um recipiente contendo solução de óleo de cravo (70 mg/L de água), uma mangueira posicionada na boca do animal e uma bomba para distribuição da solução anestésica.

3.3 Equipamento de videoceloscopia e biopsia

O equipamento para videoceloscopia consistiu-se em um Tele Pack LedKarlStorz15 (1024x768 pixel) com fonte de luz integrada e um endoscópio rígido de visão oblíqua angular panorâmica HOPKINS® 45° de 2,7 mm de diâmetro e 18 cm de comprimento. Além disso, contava-se com uma câmera Karl Storztele cam S1parafocal zoom para capturar as imagens geradas. Este conjunto é capaz de aumentar em 4x a imagem.

3.4 Técnica cirúrgica de videoceloscopia e biopsia gonadal

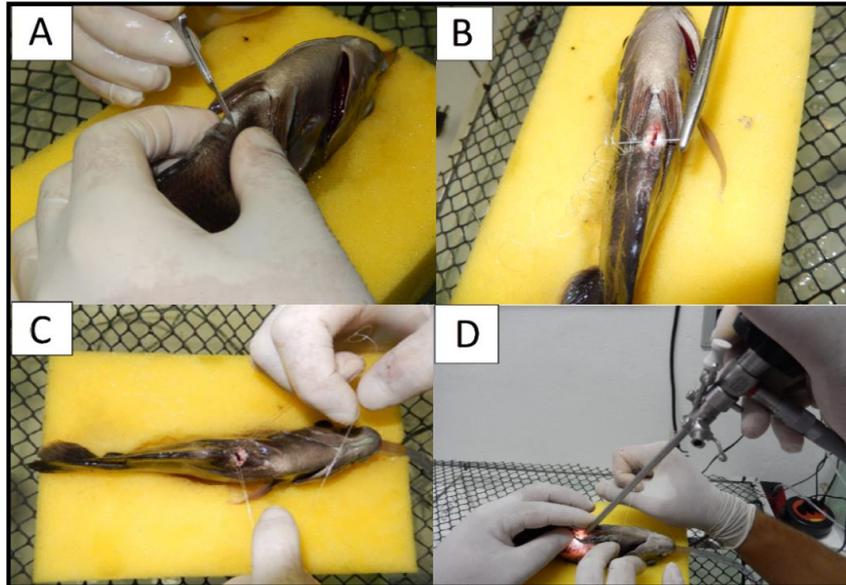
No pré-operatório imediato, procedeu-se a antibioticoterapia com florfenicol (50 mg/kg) e analgesia com morfina (5 mg/kg), ambos por via intramuscular, próximo a nadadeira peitoral. Em seguida, removeu-se as escamas da região ventral da cavidade celomática (2 cm cranial da papila urogenital), com auxílio de um bisturi, criando-se uma área de, aproximadamente, 1 cm² sem escamas (FIGURA 4A).

Durante o transcirúrgico, realizou-se uma incisão linear, na linha mediana ventral, de pele e musculatura, de aproximadamente 0,5 cm, prosseguindo-se a transposição da parede celomática com fio de poliamida de 30 mm (FIGURA 4B), utilizando-o como ponto de reparo. Tal procedimento foi necessário para afastar as paredes celomáticas (FIGURA 4C) e permitir a introdução do portal, sendo este direcionado, ventrocaudalmente, em um ângulo de aproximadamente 45° (FIGURA 4D). Com isso, foi possível visibilizar a região caudoventral da cavidade celomática, próximo a inserção da papila urogenital. Considerando as características macroscópicas das gônadas de *A. ocellatus* (CARVALHO et al., 2017), os animais foram sexados em machos ou fêmeas.

Após identificação da gônada por meio da videoceloscopia, procedeu-se a biopsia das mesmas. Para isso, as gônadas foram pinçadas, com auxílio da pinça de biopsia laparoscópica (FIGURA 5), e tracionadas para fora da cavidade celomática, através da abertura na parede celomática. Em seguida, pequeno fragmento do órgão foi seccionado, com auxílio de uma tesoura e transferido para solução de formalina tamponada 10%. Por fim, a gônada foi reintroduzida na cavidade, procedendo-se a inspeção da mesma com o endoscópio a fim de

verificar possíveis complicações. Ao final dos procedimentos de sexagem, removeu-se a ótica do endoscópio e, em seguida, procedeu-se a síntese da cavidade celomática com fio de poliamida 30 mm em padrão simples separado, utilizando o ponto de reparo.

Figura 4 - Procedimentos cirúrgicos de videoceloscopia em *A. ocellatus*. (A) Remoção das escamas para preparo do campo cirúrgico, (B) transposição da parede abdominal com fio de poliamida, (C) afastamento da parede abdominal utilizando o fio de poliamida e (D) posicionamento da ótica para visualização das gônadas.



Fonte: Arquivo pessoal (2017)

Figura 5 - Biopsia gonadal (ovário) por meio de videoceloscopia em *A. ocellatus*, utilizando uma pinça laparoscópica



Fonte: Arquivo pessoal (2017)

3.5 Recuperação anestésica e monitoramento pós-operatório

Após a cirurgia, os animais foram transferidos para os seus respectivos aquários e monitorados quanto à recuperação anestésica. A recuperação anestésica foi considerada após o animal apresentar o retorno completo do equilíbrio e natação espontânea. Após 12 h, a alimentação foi reintroduzida conforme manejo alimentar descrito anteriormente. Transcorridos 15 dias da cirurgia, os animais foram contidos para avaliação da cicatrização e remoção do ponto cirúrgico. Por fim, manteve-se o monitoramento dos animais por mais 15 dias, completando-se o período experimental de 30 dias.

3.6 Avaliação da eficácia da cirurgia de videoceloscopia e biopsia gonadal

A eficácia da cirurgia foi avaliada por meio dos seguintes parâmetros: tempo necessário para realização da cirurgia, a presença de possíveis complicações cirúrgicas e pós-operatórias, cicatrização da ferida cirúrgica, sobrevivência, consumo alimentar e parâmetros comportamentais. Assim sendo, durante o transcirúrgico os tempos de videoceloscopia (cronometrado a partir do momento da colocação da óptica para sexagem até sua subsequente remoção), biopsia gonadal (cronometrado a partir da visualização da gônada até a remoção das mesmas) e tempo total de cirurgia (cronometrado a partir do momento da incisão cirúrgica até o final da sutura da cavidade celomática) foram registrados. Os tempos de videoceloscopia, biopsia gonadal e cirurgia foram determinados em segundos.

As complicações cirúrgicas também foram observadas durante e após a realização do experimento. Além disso, acompanhou-se a cicatrização durante o pós-cirúrgico, considerando-se a possibilidade de deiscência da ferida cirúrgica e evolução da cicatrização. A taxa de sobrevivência foi determinada em porcentagem de animais sobrevivente após 30 dias do procedimento cirúrgico.

Para determinar o consumo alimentar, foi considerado a porcentagem de 30 *pellets* de ração consumida em um período de 20 minutos após a oferta do alimento. O consumo alimentar, de todos os animais, foi avaliado 72 h antes da cirurgia (controle) e após a cirurgia nos intervalos de 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas.

Os seguintes parâmetros comportamentais foram avaliados: posição na coluna d'água, comportamento de interação e procura por esconderijo. A posição na coluna d'água foi pontuada em uma escala de 1 a 4, como se segue: 1 = em repouso no fundo do aquário; 2 = localizado no terço inferior do aquário; 3 = localizado no terço médio do aquário e 4 =

localizado no terço superior do aquário. O comportamento de interação, por sua vez, foi determinado em uma escala de 1 a 3, sendo: 1 = não se aproxima do observador ou se afasta; 2 = se aproxima do observador, mas não se alimenta e 3 = se aproxima do observador e se alimenta. A procura por esconderijo foi pontuada em uma escala de 1 a 2, sendo: 1 = não se escondeu e 2 = se escondeu (ficando atrás do cano de saída de água e ou virado para o lado oposto ao examinador) (BAKER et al., 2013). Os parâmetros comportamentais, de todos os animais, foram avaliados 72 h antes da cirurgia (controle) e após a cirurgia nos intervalos de 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas. O momento da avaliação comportamental variou de acordo com cada parâmetro, sendo a posição na coluna d'água e procura por esconderijo determinados pouco antes de cada alimentação e o comportamento de interação determinado no momento da alimentação.

3.7 Validação da técnica de videoceloscopia e biopsia gonadal como métodos de sexagem

Para validação da técnica de sexagem de videoceloscopia e biopsia gonadal, a análise histológica das gônadas foi utilizada como método padrão ouro. Para isso, foram utilizados os fragmentos gonadais coletados por biopsia. Nos casos em que a biopsia foi improdutiva, as gônadas foram coletadas posteriormente por meio de celotomia, a fim de confirmar o sexo dos animais. Na celotomia, realizou-se uma incisão de aproximadamente 4 cm na linha mediana ventral, sendo esta posteriormente suturada no padrão cerzidura com fio de poliamida 0,30 mm. Independente do método de coleta, os fragmentos gonadais foram armazenados em formalina tamponada 10% por 24 horas, sendo posteriormente transferidos para álcool etílico 70%. As amostras foram processadas por técnicas histológicas rotineiras e as lâminas coradas por hematoxilina-eosina. As lâminas foram analisadas sob microscopia óptica de campo claro com objetiva de 40X e o sexo identificado de acordo com as características histológicas dos ovários e testículos. A validação da videoceloscopia como método de sexagem foi baseada na determinação da acurácia, especificidade e sensibilidade. Para validação da biopsia gonadal considerou-se a porcentagem de animais em que a coleta da gônada foi realizada corretamente.

3.8 Determinação da acurácia, especificidade e sensibilidade

A determinação dos valores para acurácia, especificidade e sensibilidade foi realizada através do número de animais considerados verdadeiros positivos (a), falsos positivos (b),

verdadeiros negativos (c) e falsos negativos (d). Sendo a acurácia dada pela divisão da soma dos indivíduos verdadeiros positivos e verdadeiros negativos pela soma de todos os indivíduos. A sensibilidade é encontrada a partir da divisão do número de animais verdadeiramente positivos pela soma de indivíduos verdadeiros positivos e indivíduos falsos negativos. Por fim a especificidade é encontrada a partir da divisão do número de indivíduos verdadeiros negativos pela soma dos indivíduos falsos positivos e verdadeiros negativos.

$$\text{Acurácia} = \frac{a + c}{(a + b + c + d)}$$

$$\text{Sensibilidade} = \frac{a}{(a + d)}$$

$$\text{Especificidade} = \frac{c}{(b + c)}$$

Os animais verdadeiros positivos foram aqueles nos quais a característica avaliada foi considerada presente e posteriormente esta hipótese foi confirmada pela histologia. Os animais falsos positivos são aqueles em que a característica avaliada foi considerada presente, porém na análise histológica identificou-se o erro desta identificação. Como animais verdadeiros negativos, considerou-se aqueles animais cuja característica avaliada foi considerada ausente e tal negativa foi confirmada posteriormente. Por fim os animais falsos negativos foram aqueles em que a característica foi considerada ausente, mas na análise histológica a dada característica foi identificada.

3.9 Análises estatísticas

Para avaliar o efeito do sexo sobre o tempo total de indução e recuperação anestésica, videoceloscopia, biopsia gonadal e tempo total de cirurgia, utilizou-se o teste de F. Para avaliar o efeito dos procedimentos cirúrgicos de videoceloscopia e biopsia gonadal sobre consumo alimentar e parâmetros de comportamento, a normalidade dos dados foi verificada por teste de Shapiro-Wilk. Ao constatar a distribuição assimétrica dos dados para os diferentes intervalos de tempo após a cirurgia, foram analisados por teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e comparados individualmente com os valores apresentados antes da cirurgia (controle) pelo teste de Mann-Whitney. Para todas as variáveis, considerou-se o nível de significância de 0,05.

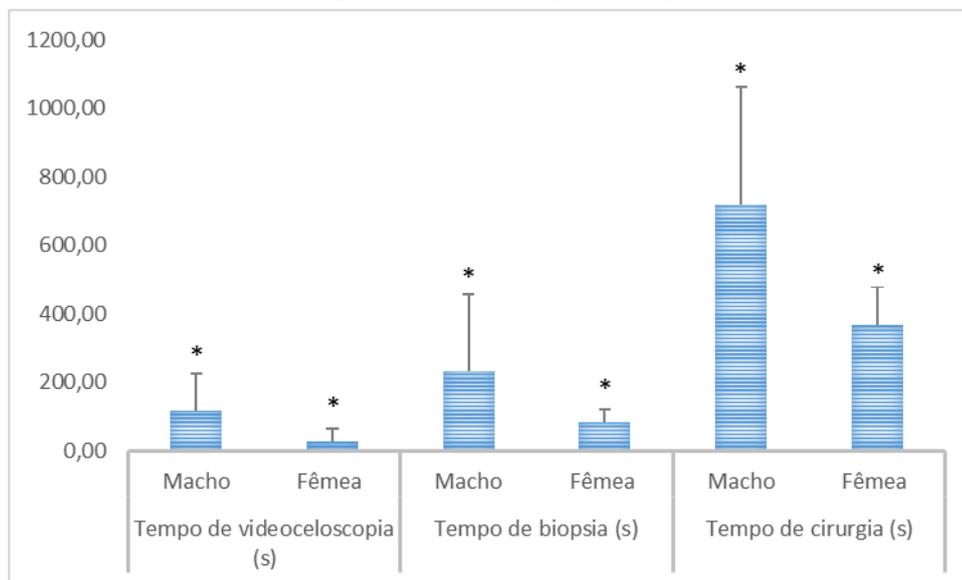
4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da eficácia da cirurgia de videoceloscopia e biopsia gonadal

Os tempos de videoceloscopia, biopsia gonadal e de cirurgia foram significativamente maiores ($P < 0,05$) para os animais identificados como machos ($118,84 \pm 108,04$ s, $231,62 \pm 226,59$ s e $720,00 \pm 343,80$ s respectivamente) em comparação aos identificados como fêmeas na videoceloscopia ($26,88 \pm 38,08$ s, $84,72 \pm 36,63$ s e $366,66 \pm 112,51$ s respectivamente) (FIGURA 6).

Em relação à complicação cirúrgica, durante a realização da biopsia ocorreu a secção de parte do trato gastrointestinal de um animal. Na tentativa de realizar a correção, procedeu-se a celiotomia, entretanto, não se obteve sucesso neste procedimento. Assim sendo, foi realizada a lavagem da cavidade celomática e a sutura da mesma com padrão cerzadura. Neste mesmo animal, a cicatrização foi tardia (30 dias), sendo observada também a deiscência da sutura. Ainda assim o animal não veio a óbito.

Figura 6 - Valores para tempos de videoceloscopia, biopsia gonadal e cirurgia em *A. ocellatus* submetidos à sexagem por videoceloscopia e biopsia gonadal.



Fonte: Do autor (2017)

Nos demais animais, não foram observadas complicações decorrentes dos procedimentos cirúrgicos. Após 15 dias da cirurgia, a cicatrização da ferida cirúrgica era completa (FIGURA 7). Após 30 dias da sexagem, a taxa de sobrevivência foi de 100%.

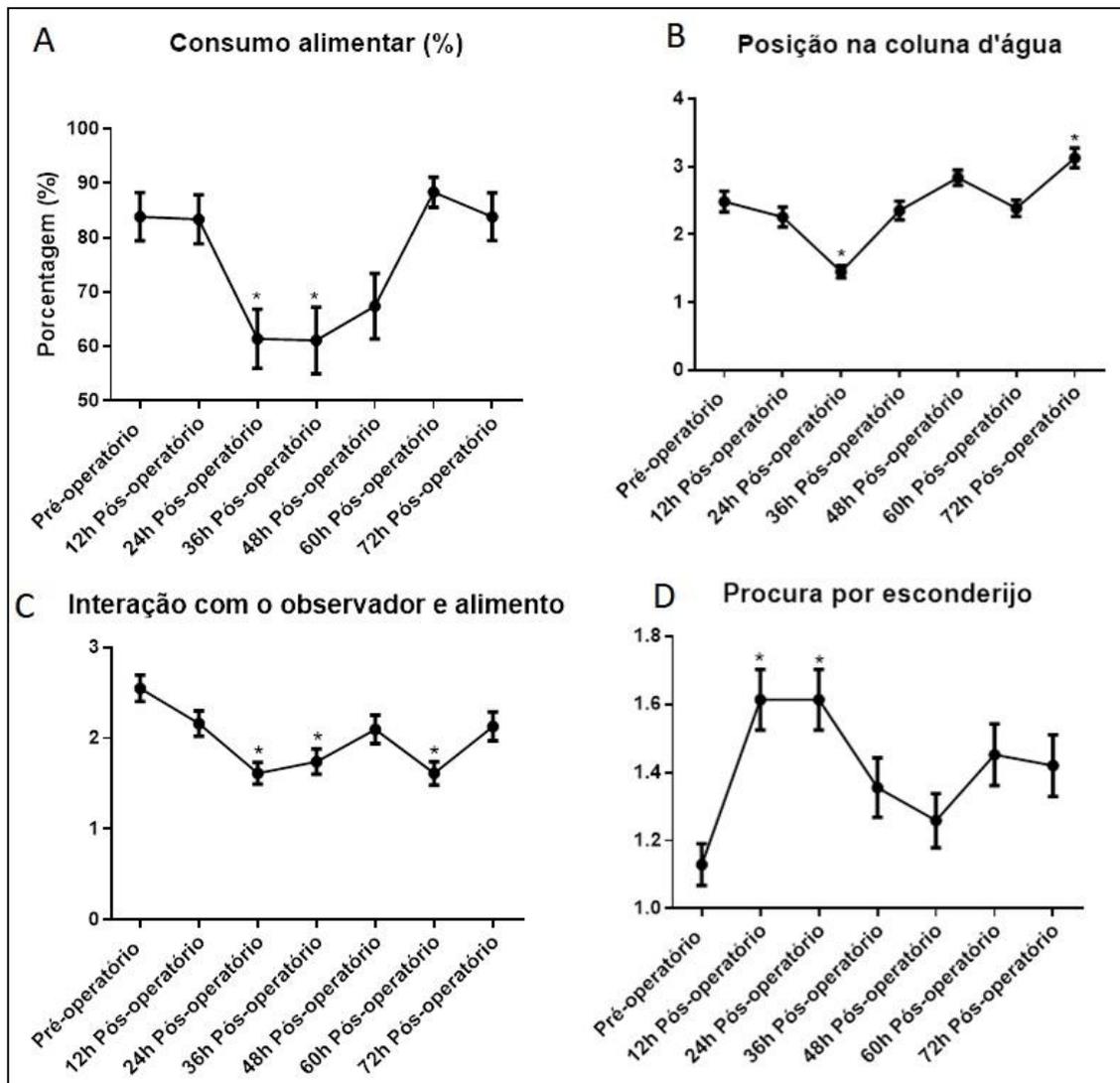
Figura 7 - Cicatrização da ferida cirúrgica (ponta da seta) após videoceloscopia em *A. ocellatus*.



Fonte: Arquivo pessoal (2017).

Na Figura 8, estão representados os valores da média e erro padrão da média para os valores de consumo alimentar e parâmetros comportamentais. Para o consumo alimentar houve diferenças significativas ($P < 0,05$) para o período de 24 h ($61,45 \pm 5,41$) e 36 h ($61,13 \pm 6,13$) após a cirurgia quando comparado ao controle no pré-cirúrgico ($83,87 \pm 4,42$) (FIGURA 8A). Para a posição na coluna d'água, foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) para os períodos de 24 h ($1,45 \pm 0,09$) e 72 h ($3,12 \pm 0,14$) após a cirurgia, quando comparados individualmente ao controle ($2,48 \pm 0,15$) (FIGURA 8B). Houve diferenças significativas ($P < 0,05$) para o comportamento de interação nos períodos de 24 h ($1,61 \pm 0,11$), 36 h ($1,74 \pm 0,14$) e 60 h ($1,61 \pm 0,13$) após a cirurgia, em relação ao grupo controle ($2,54 \pm 0,15$) (FIGURA 8C). Em relação à procura por esconderijo, foi identificada diferença significativa ($P < 0,05$) às 12 h ($1,61 \pm 0,08$) e 24 h ($1,61 \pm 0,09$) após a cirurgia em relação ao controle ($1,12 \pm 0,06$) (FIGURA 8D).

Figura 8 - Variações no consumo alimentar (A), nas escalas de posição na coluna d'água (B), interação com o observador e o alimento (C) e procura por esconderijo (D) antes e após a videoceloscopia e biopsia gonadal em *A. ocellatus*.



Asteriscos indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre as médias, comparando-se cada tratamento (12, 24, 36 e 72 horas após a operação) com o valor basal (72 horas antes da operação). A posição na coluna d'água foi pontuada em uma escala de 1 a 4 (1 = repouso no fundo do aquário; 2 = localizado no terço inferior do aquário; 3 = localizado no terço médio do aquário e 4 = localizado no terço superior do aquário). A interação com o observador e alimento foi determinada em uma escala de 1 a 3 (1 = não se aproxima do observador ou se afasta; 2 = se aproxima do observador, mas não se alimenta e 3 = se aproxima do observador e se alimenta). A procura por esconderijo foi pontuada em uma escala de 1 a 2 (1 = não se escondeu e 2 = se escondeu).

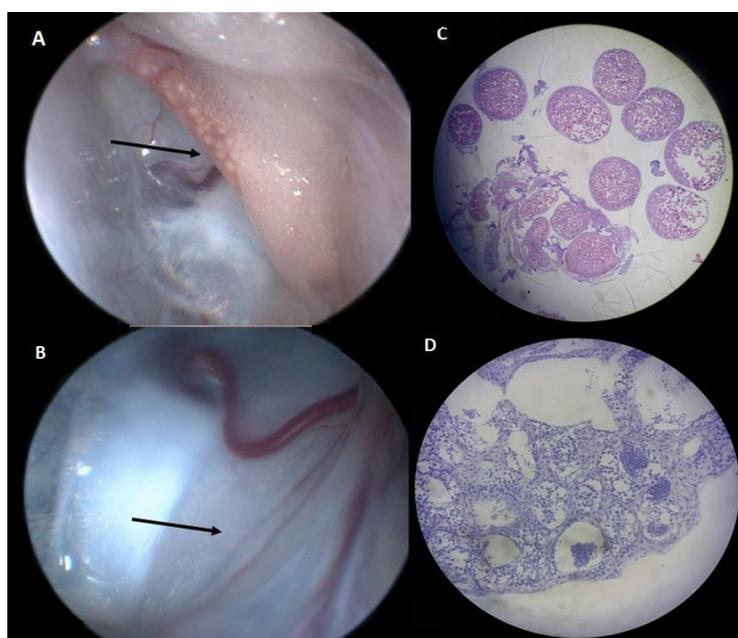
Fonte: Do autor (2017)

4.2 Validação das técnicas de videoceloscopia e biopsia gonadal como métodos de sexagem

Por meio da videoceloscopia, foi possível obter uma boa visualização das gônadas. Os ovários foram caracterizados pelas seguintes particularidades: saculiformes, grandes, de coloração rósea, com presença de ovócitos amarelados de tamanho variável, sendo localizada

próxima a bexiga natatória (FIGURA 9A). Os testículos foram caracterizados como estruturas delgadas (filiformes ou em formato de fita), de coloração esbranquiçada, sendo situado da papila urogenital até próximo ao rim e aderidos na parede da cavidade celomática (FIGURA 9B).

Figura 9 - (A) Imagem da videoceloscopia do ovário de *A. ocellatus* (aumento 4x); (B) Imagem da videoceloscopia do testículo de *A. ocellatus* (aumento 4x); (C) Lâmina histológica do ovário de *A. ocellatus*, caracterizada por lamelas ovígeras com ovócitos em diferentes fases de desenvolvimento (aumento de 10x); (D) Lâmina histológica do testículo de *A. ocellatus* visualizando túbulos seminíferos com células espermáticas em diferentes estágios de desenvolvimento (aumento de 10x).



Fonte: Arquivo pessoal (2017)

A análise histológica das gônadas foi utilizada para confirmar o sexo dos animais. Assim sendo, o ovário foi caracterizado pela presença de ovócitos em diferentes fases de desenvolvimento dentro das lamelas ovígeras (FIGURA 9C). O testículo, por sua vez, caracterizou-se por sua estrutura tubular, coberta por uma camada de tecido conjuntivo. Os túbulos seminíferos eram dispostos radialmente, com presença de células espermáticas em diferentes estágios de desenvolvimento (FIGURA 9D).

A videoceloscopia apresentou acurácia de 96,7%. Para especificidade e sensibilidade, os valores para videoceloscopia foram de 100% e 94,7% para fêmeas e de 94,7% e 100% para machos (TABELA 4). A eficácia da técnica de biópsia gonadal, por videoceloscopia, como método de sexagem foi de 83%, uma vez que, não foi possível coletar a gônada de cinco animais, sendo coletado tecido adiposo ao invés de ovário ou testículo.

Tabela 2 - Valores para acurácia, especificidade e sensibilidade da videoceloscopia como método de sexagem em *A. ocellatus*.

Sexo	Sexagem por videoceloscopia (n)	Sexagem por análise histológica (n)	Acurácia (%)	Especificidade (%)	Sensibilidade (%)
Machos	13	12	96,7	94,7	100
Fêmeas	18	19	96,7	100	94,7

n = número de animais totais Fonte: Do autor (2017)

5 DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da eficácia da cirurgia de videoceloscopia e biopsia gonadal

Os tempos de videoceloscopia, biopsia gonadal e cirurgia foram significativamente maiores para animais identificados como machos. Corroborando com estes resultados, na sexagem por videoceloscopia de surubim (*Pseudoplatystoma corruscans* X *Pseudoplatystomareticulatum*) a cirurgia demorou mais tempo para animais sexados como machos (CHAVES et al., 2015). Estes autores sugerem que tal diferença pode ser atribuída ao menor índice gonadossomático dos machos, grande quantidade de gordura intracelomática e pelo grande tamanho do intestino. Em *A. ocellatus*, embora estes parâmetros não tenham sido quantitativamente avaliados, também foram visualizadas grande quantidade de gordura celomática e gônadas muito pequenas, o que contribui para o maior tempo de procedimento cirúrgico na identificação de machos.

Quanto às complicações cirúrgicas, embora tenha sido observada a secção do trato gastrointestinal de um animal, esta complicação não foi suficiente para resultar na morte, apesar de causar atraso no processo de cicatrização. Possivelmente, a lesão de órgãos internos ocorreu pela dificuldade em visibilizar e acessar a gônada neste animal, o que acabou por gerar trauma iatrogênico. Em geral, as principais complicações cirúrgicas observadas em peixes são diminuição no equilíbrio, infecções, deiscência da sutura, hemorragias e lesões de órgãos internos (MULCAHY, 2003; SWENSON; ROSENBERGER; HOWELL, 2007), indo ao encontro ao observado em *A. ocellatus*.

Após 15 dias da cirurgia, observou-se excelente cicatrização da ferida cirúrgica, com exceção de um animal no qual foi observada a deiscência da ferida cirúrgica e maior tempo para cicatrização. Este resultado se opõe ao retratado por Hurty et al. (2002) em seu estudo no qual observaram sinais de reações inflamatórias em sutura de pele de peixes. Esta resposta antagônica pode ser atribuída, por exemplo, à administração de antibiótico no pré-cirúrgico e também à grande produção de muco em *A. ocellatus*, que apresentam propriedades imunológicas e protetoras (GUARDIOLA et al., 2014). A ausência de maiores complicações cirúrgicas e excelente cicatrização são características desejáveis quando se trata de procedimento cirúrgico, o que contribui para a eficácia das técnicas de videoceloscopia e biopsia gonadal.

A alta taxa de sobrevivência observada (100%) é mais um indicativo da segurança das técnicas empregadas como método de sexagem e está diretamente associada à ausência de

complicações cirúrgicas significativas. Na literatura, a mortalidade associada à videoceloscopia varia consideravelmente entre as espécies, o que indica possíveis variações de técnicas anestésicas e cirúrgicas além de diferenças interespecíficas, e até mesmo individuais, da resistência ao procedimento cirúrgico. Por exemplo, em surubim (*Pseudoplatysto macrorrancans X Pseudoplatystoma reticulatum*) observou-se taxa de mortalidade de 6,2%, sendo associada a variações fisiológicas de cada indivíduo e ao canibalismo (CHAVES et al., 2015).

Em salmonídeos (*Salvelinu fontinalis*) a taxa de mortalidade foi de 3,3%, associada ao tamanho dos animais, sendo que animais menores estão mais sujeitos aos riscos da cirurgia (SWENSON; ROSENBERGER; HOWELL, 2007). Em contrapartida, em *catfish* (*Lophiosilurus alexandri*) e esturjão (*Huso huso*), a taxa de sobrevivência foi de 100% (FALAHATKAR; POURSAEID, 2014; MELILLO et al., 2016), sendo estas espécies mais resistentes aos procedimentos cirúrgicos. Outras possíveis explicações para diferenças na mortalidade podem ser atribuídas, por exemplo, a perda de muco e escamas, ao aumento de temperatura corporal e secagem da pele (SWENSON; ROSENBERGER; HOWELL, 2007).

As técnicas cirúrgicas de videoceloscopia e biopsia gonadal não afetaram o consumo alimentar nas primeiras 12 h após a cirurgia, observando valores médios semelhantes ao controle (pré-cirúrgico). Este resultado pode ser atribuído ao uso da morfina como analgésico, sendo esta capaz de ocasionar analgesia suficiente para não afetar a alimentação. De maneira semelhante, em carpas (*Cyprinus carpio*) submetidas à gonadectomia, a morfina apresentou potente efeito analgésico, contribuindo diretamente para a manutenção do consumo alimentar (BAKER et al., 2013). Segundo estes autores, o consumo alimentar é o indicador mais confiável de dor em peixes submetidos à cirurgia.

Em contrapartida, para os períodos de 24 e 36 h após a cirurgia foi observado uma redução significativa no consumo alimentar. A anorexia ou diminuição do apetite são achados clínicos comuns de serem observados em peixes submetidos a procedimentos dolorosos e pode ser uma complicação após cirurgia (WEBER, 2011). Assim sendo, considerando que o efeito da morfina começa a diminuir após um determinado tempo, devido a sua meia vida de aproximadamente 37 h (NEWBY; WILKIE; STEVENS, 2009), a redução no consumo alimentar é justificada. O retorno à alimentação foi observado em 48 h pós-cirúrgico, restabelecendo os níveis basais semelhantes ao controle, o que se manteve até o período de 72 h. Estes achados sugerem que seja indicada uma nova administração de analgésico 24 h após a cirurgia, pois assim possivelmente não haveria declínio do consumo alimentar.

Outros autores também avaliaram o retorno à alimentação em peixes submetidos à sexagem por videoceloscopia. Por exemplo, em surubim híbrido (*Pseudoplatystoma corruscans* X *Pseudoplatystoma reticulatum*) os animais demoraram, em média, 10 dias para retornarem à alimentação (CHAVES et al., 2015), valor muito superior ao observado em *A. ocellatus*. Entretanto, para surubim não foi utilizado analgesia, o que pode indicar, mais uma vez, a importância em utilizar analgésicos para controle da dor.

Em conjunto, os resultados para posição na coluna d'água e comportamento de interação podem indicar uma redução da atividade normal dos animais após os procedimentos de videoceloscopia e biopsia gonadal. Nas primeiras 12 h após a cirurgia, o efeito analgésico da morfina contribuiu para a manutenção dos parâmetros comportamentais em seus valores basais. Com isso, os animais permaneceram no terço médio do aquário e interagiram com o observador e alimento. Entretanto, em 24 h após a cirurgia observou-se uma redução na atividade dos animais, caracterizada pela manutenção dos peixes no fundo do aquário e diminuição da interação.

Para a posição na coluna d'água, o comportamento foi restabelecido rapidamente, após 36 h da cirurgia, mantendo-se no terço médio do aquário. Entretanto, no período de 72 h após a cirurgia comportamento atípico foi observado, sendo que os animais permaneceram no terço superior do aquário, diferindo do controle. A permanência do animal na superfície da coluna d'água pode estar associada, possivelmente, à antecipação da alimentação, uma vez que, o alimento era fornecido pouco depois da análise do comportamento. Diante disso, provável hipótese é que os animais apresentavam um maior apetite, permanecendo na superfície em busca de alimento. Adicionalmente, tal comportamento indica que os animais já estavam completamente recuperados de qualquer fator estressante ocasionado pela cirurgia.

Corroborando com as observações do presente estudo, alterações comportamentais significativas também foram observadas em carpas (*Cyprinus carpio*) após procedimento cirúrgico de celiotomia, com ou sem analgesia. Nesta espécie, os animais permaneceram por mais tempo no fundo do aquário, além de reduzir significativamente a atividade de natação, alterações estas observadas especialmente nas primeiras 48 horas após celiotomia (NEWBY; WILKIE; STEVENS, 2009). Em contrapartida, para esta mesma espécie, a cirurgia de gonadectomia, embora mais invasiva que a celiotomia, não foi capaz de alterar a localização na coluna d'água, possivelmente devido ao uso de analgesia. Assim sendo, especialmente para a localização na coluna d'água, os resultados são controversos e podem estar associado às particularidades metodológicas de cada cirurgia e à espécie em questão (BAKER et al., 2013).

Para a interação com o observador e alimento, o comportamento retornou ao normal após 48 h, sendo a interação semelhante ao controle. Entretanto, este padrão de comportamento não se manteve e, inesperadamente, 60 h após a cirurgia houve uma diminuição na interação. Alterações comportamentais estão diretamente relacionadas à sensibilidade dolorosa, medo e estresse e flutuações no padrão de resposta podem ser observadas em função de variações individuais. Além disso, tais parâmetros são subjetivos e podem interferir nos resultados observados (WEBER, 2011).

Para a procura por esconderijo, nas primeiras 24 h após a cirurgia os animais passaram a se esconder, sendo este comportamento restabelecido a partir de 36 horas. Este resultado difere do observado em carpas (*Cyprinus carpio*) submetidas ao procedimento cirúrgico de gonadectomia, em que a cirurgia não foi capaz de afetar significativamente este comportamento (HARMS et al., 2005). Para estes autores, a procura por esconderijo como indicador de dor é diretamente dependente do tipo de esconderijo utilizado, o que não parece ser um fator limitante para *A. ocellatus*.

5.2 Validação da técnica de videoceloscopia e biopsia gonadal como métodos de sexagem

A videoceloscopia em *A. ocellatus* permitiu uma clara visualização das características macroscópicas das gônadas e, conseqüentemente, sua classificação em ovário ou testículo. A classificação de fêmeas e machos foi baseada no conhecimento prévio da morfologia gonadal do *A. ocellatus* (CARVALHO et al., 2017).

Adicionalmente, os resultados aqui observados vão ao encontro dos preconizados para outras espécies de peixes nativas do Brasil, nas quais também se avaliou a videoceloscopia como método de sexagem. Por exemplo, em pacamã (*Lophiosiluru alexandri*) as gônadas foram descritas por serem delgadas em machos e saculares em fêmeas (MELILLO et al., 2016). De maneira semelhante, em surubim híbrido (*Pseudoplatystoma corruscans* X *Pseudoplatystoma reticulatum*) os ovários apresentaram-se como estruturas globulares de coloração rósea e os testículos como estruturas delgadas de coloração rósea (CHAVES et al., 2015).

A partir dos resultados de acurácia, especificidade e sensibilidade várias ponderações devem ser consideradas quanto à técnica de videoceloscopia para sexagem em *A. ocellatus*. Primeiramente, para identificação das fêmeas a alta especificidade da videoceloscopia (100%) é capaz de excluir todos os falsos positivos, ou seja, machos que foram sexados como fêmeas. Entretanto, mesmo com a alta sensibilidade (94,7%), deve-se levar em conta a possibilidade

de ocorrerem falsos negativos, ou seja, deixar de identificar fêmeas. Por outro lado, para macho, padrão oposto foi observado, excluindo-se todos os falsos negativos, identificando todos os machos do grupo. Em contrapartida, identificou-se erroneamente um macho, o que representa um pequeno número de falsos positivos (fêmeas sexadas como machos).

Em fêmeas, a alta especificidade e alta sensibilidade da videoceloscopia estão diretamente relacionadas às características de desenvolvimento gonadal e aspectos macroscópicos das gônadas. Todos os animais identificados como fêmeas, por meio da videoceloscopia, apresentavam gônadas bem desenvolvidas e com presença de ovócitos. Tais características indicam que, possivelmente, os animais se encontravam em estágio de maturação gonadal inicial ou final, o que facilita o reconhecimento macroscópico das gônadas. Por outro lado, a fêmea não identificada pela videoceloscopia apresentava gônadas pequenas, translúcidas e sem ovócitos, além de grande quantidade de gordura celomática. Com isso, é possível que este animal fosse sexualmente imaturo ou em estágio de regressão, o que pode justificar a ineficácia da técnica para este animal.

Em machos, a especificidade foi menor do que a sensibilidade, corroborando o já demonstrado para fêmeas. O falso positivo é justificado pelo fato de que, por ser uma fêmea possivelmente imatura, as características macroscópicas dos ovários se assemelham aos do testículo, induzindo ao erro na sexagem. Por outro lado, a exclusão de todos os falsos negativos pode ser atribuída ao fato de que, independente do estágio de desenvolvimento gonadal, a morfologia do testículo não varia bruscamente como ocorre em fêmeas, especialmente em animais em fase de maturação sexual (CARVALHO et al., 2017). Com isso, a sensibilidade da videoceloscopia se torna maior, permitindo identificar corretamente todos os machos da população.

Na literatura, existem poucos relatos sobre as características macroscópicas para determinação do estágio de desenvolvimento gonadal em *A. ocellatus*. Entretanto, as características aqui identificadas vão ao encontro ao relatado por Carvalho et al. (2017), o que nos permite fazer as inferências acima. Entretanto, seria extremamente interessante, em uma futura investigação, avaliar a eficácia da videoceloscopia em diferentes estágios de desenvolvimento gonadal, caracterizando macroscopicamente cada uma delas.

Para outras espécies de peixes, os trabalhos com videoceloscopia trazem apenas uma abordagem da eficiência da técnica para fêmeas e machos, não considerando a validação da técnica em termos de especificidade e sensibilidade. Por exemplo, em *catfish* (*Lophiosilurus alexandri*) para os animais identificados como fêmeas, a eficácia da técnica foi de 100%, enquanto que para machos foi de 66,6%. Segundo os autores, uma grande quantidade de

gordura celomática foi observada nos machos identificados erroneamente, o que pode dificultar a visualização das gônadas. Outros autores também relataram a limitação da sexagem por videoceloscopia associado ao grande depósito de gordura da cavidade celomática, como observado em esturjão (*Husohuso*) e salmonídeos (*Salvelinusfontinalis*) (CHAVES et al., 2015; SWENSON; ROSENBERGER; HOWELL, 2007).

Assim como observado em *A. ocellatus*, outros autores também relatam que o estágio de desenvolvimento gonadal pode afetar a eficácia da videoceloscopia. Em salmonídeos (*Salvelinus fontinalis*), o erro na sexagem de um macho foi atribuído a sua imaturidade sexual, o que torna difícil sua identificação (SWENSON; ROSENBERGER; HOWELL, 2007). De maneira semelhante, Chaves et al. (2015) também relataram que a sexagem precoce pode interferir na eficácia da videoceloscopia (CHAVES et al., 2015). Além disso, foi observado em esturjão (*Huso huso*) que as características macroscópicas dos ovários, observadas por videoceloscopia, influenciam na eficácia da técnica de sexagem (FALAHATKAR; POURSAEID, 2014).

A biopsia gonadal apresentou uma menor eficácia (83%) de execução, resultando na coleta inadequada de cinco amostras, o que pode ser atribuído a diferentes fatores. Em primeiro lugar, deve-se considerar que não foi utilizada a técnica de insuflação da cavidade celomática, a menor distensão da mesma dificultou a visualização e acesso aos tecidos. Em segundo lugar, considera-se como limitante a grande quantidade de tecido adiposo da cavidade celomática que, muitas vezes, dificulta a identificação da gônada e sua subsequente coleta. Em esturjões, a melhor visualização da cavidade celomática e acesso às gônadas têm sido atribuídos ao uso da insuflação da cavidade com solução salina (FALAHATKAR et al., 2011; HERNANDEZ-DIVERS et al., 2004).

Corroborando com os resultados acima, em esturjão (*Scaphirhynchus*) de 36 biópsias gonadais realizadas, cinco delas foram perdidas e, segundo os autores, isso pode estar associado ao tamanho pequeno das gônadas e ao fato destas serem tecidos extremamente frágeis, o que contribui para a perda do tecido no momento da coleta ou processamento das amostras (DIVERS et al., 2009).

Após a realização da celotomia, confirmou-se o sexo destes cinco animais por análise histológica, sendo todos eles machos. Assim como o já observado e descrito no procedimento de videoceloscopia, as próprias características morfológicas dos testículos, como seu pequeno tamanho, podem dificultar a sua coleta por meio de biopsia. Além disso, a menor eficiência da técnica de biopsia comparada à videoceloscopia pode estar associada também a maior

dificuldade da técnica, uma vez que é um procedimento mais invasivo e requer habilidade extra para a coleta do tecido (BOONE et al., 2008).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados aqui demonstrados indicam, primeiramente, que o protocolo anestésico utilizado é eficaz e seguro para a realização de técnicas cirúrgicas em *A. ocellatus*, evidenciado por rápida indução e recuperação, além de boa manutenção anestésica. Além disso, validam e certificam a videoceloscopia e biopsia gonadal como técnicas seguras para a identificação do sexo nesta espécie. Esta inferência se dá, primeiramente, pelo tempo de realização dos procedimentos, relativamente rápido, além da ausência de complicações pós-operatórias significativas, ausência de mortalidade e por não influenciar negativamente, por um período prolongado, os diferentes parâmetros comportamentais.

Adicionalmente, com o propósito de selecionar machos e fêmeas, por exemplo, para formação de um plantel de reprodutores, é desejável a utilização de uma técnica com alta especificidade, identificando corretamente o maior número de animais possíveis. Assim sendo, a videoceloscopia apresenta-se como excelente ferramenta de sexagem especialmente para as fêmeas, dado a eficácia de 100%, sendo a imaturidade sexual uma limitação para a execução dessa técnica. Por outro lado, para machos, a videoceloscopia seria ideal para a triagem inicial dos indivíduos de uma população, uma vez que apresenta 100% de sensibilidade. Entretanto, por apresentar menor especificidade (94,7%) é aconselhável, após triagem inicial, a utilização de outra técnica mais específica para confirmar se os animais sexados como machos são realmente machos, como por exemplo, a biopsia gonadal. Por fim, dada a menor eficácia da biópsia gonadal (83%), ocasionada pela dificuldade em visualizar e coletar a gônada, seria interessante desenvolver e aprimorar a técnica cirúrgica para coleta das gônadas, utilizando insuflação da cavidade celomática, reduzindo a possibilidade de erros em investigações futuras.

7 CONCLUSÕES

O óleo de cravo, nas doses de 140 mg/L e 70 mg/L para indução e manutenção anestésica, respectivamente, pode ser utilizado com eficácia e segurança para a anestesia cirúrgica em *A. ocellatus*, considerando um sistema de recirculação anestésica. As técnicas cirúrgicas de videoceloscopia e biopsia gonadal apresentam alto nível de segurança e eficácia em animais maduros sexualmente. Além disso, ambas as técnicas foram validadas como métodos de sexagem para *A. ocellatus*, sendo que a videoceloscopia é altamente específica para fêmeas e altamente sensível para machos. Por outro lado, a biopsia gonadal apresenta uma menor eficácia para identificação do sexo, sendo necessário o aprimoramento da técnica em investigações futuras.

REFERÊNCIAS

- ALAM, M. A.; NAKAMURA, M. Determination of sex and gonadal maturity in the honeycomb grouper, *Epinephelus merra*, through biopsy. **Aquaculture International**, London, v. 16, n. 1, p. 27–32, Feb. 2008.
- ANDERSON, E. T. et al. Gross and histologic evaluation of 5 suture materials in the skin and subcutaneous tissue of the California sea hare (*Aplysia californica*). **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS**, Memphis, v. 49, n. 1, p. 64–68, Jan. 2010.
- ANNETT, J. Acquisition of skill. **British Medical Bulletin**, London, v. 27, n. 3, p. 266–271, Sept. 1971.
- ASHLEY, P. J. et al. Effect of noxious stimulation upon antipredator responses and dominance status in rainbow trout. **Animal Behaviour**, London, v. 77, n. 2, p. 403–410, Feb. 2009.
- BAKER, T. R. et al. Comparative analgesic efficacy of morphine sulfate and butorphanol tartrate in koi (*Cyprinus carpio*) undergoing unilateral gonadectomy. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 243, n. 6, p. 882–890, Sept. 2013.
- BEECHING, S.C. Functional groups in the social behavior of a cichlid fish, the Oscar, *Astronotus ocellatus*. **Behavioural Processes**, Amsterdam, v. 39, n. 1, p. 85–93, Jan. 1997.
- BERLINSKY, D. L.; SPECKER, J. L. Changes in gonadal hormones during oocyte development of striped bass, *Morone saxatilis*. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 9, n. 1, p. 51–62, Mar. 1991.
- BOONE, S. S. et al. Comparison between coelioscopy and coeliotomy for liver biopsy in channel catfish. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 233, n. 6, p. 960–7, Sept. 2008.
- BRYAN, J. L. et al. Estimation of gonad volume, fecundity, and reproductive stage of shovelnose sturgeon using sonography and endoscopy with application to the endangered pallid sturgeon. **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, v. 23, n. 4, p. 411–419, Aug. 2007.
- CARVALHO, A. F. S. et al. Identification of sex in *Astronotus ocellatus* through the evaluation of aggressive behavior and sexual steroid plasma level. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 481, p. 239–244, Dec. 2017.
- CHAVES, G. V. et al. Coelioscopy technique for gender in surubim hybrid *Pseudoplatystoma corruscans* × *Pseudoplatystoma reticulatum*. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 46, n. 4, p. 1007–1012, 2015.
- CHU-KOO, F. et al. Gender determination in the Paiche or Pirarucu (*Arapaima gigas*) using plasma vitellogenin, 17beta-estradiol, and 11-ketotestosterone levels. **Fish Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 35, n. 1, p. 125–136, Mar. 2009.

COOKE, S. J. et al. Behavioral and physiological assessment of low concentrations of clove oil anaesthetic for handling and transporting largemouth bass (*Micropterus salmoides*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 239, n. 1/4, p. 509-529, Sept. 2004.

_____. Effects of suture material on incision healing, growth and survival of juvenile largemouth bass implanted with miniature radio transmitters: case study of a novice and experienced fish surgeon. **Journal of Fish Biology**, London, v. 62, n. 6, p. 1366–1380, June 2003.

CREPALDI, D. V. et al. A ultra-sonografia na piscicultura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 39, n. 3/4, p. 174-181, jul./dez. 2006.

DAVIS, K. B.; GRIFFIN, B. R. Physiological responses of hybrid striped bass under sedation by several anesthetics. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 233, n. 1/4, p. 531–548, Apr. 2004.

DIVERS, S. J. et al. Field endoscopy for identifying gender, reproductive stage and gonadal anomalies in free-ranging sturgeon (*Scaphirhynchus*) from the lower Mississippi River. **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, v. 25, Suppl. 2, p. 68–74, Sept. 2009.

ENGELHORN, R. Speed and accuracy in the learning of a complex motor skill. **Perceptual and Motor Skills**, Louisville, v. 85, n. 3, p. 1011–1017, Dec. 1997.

ENQUIST, M.; JAKOBSSON, S. Assessment of lighting ability in the cichlid fish *Nannacara anomala*. **Ethology**, Berlin, v. 72, p. 143-153, 1986.

EVANS, A. F.; FITZPATRICK, M. S.; SIDDENS, L. K. Use of ultrasound Imaging and steroid concentrations to identify maturational status in adult steelhead. **North American Journal of Fisheries Management**, Bethesda, v. 24, n. 3, p. 967–978, Aug. 2004.

FALAHATKAR, B. et al. Laparoscopy, a minimally-invasive technique for sex identification in cultured great sturgeon *Huso huso*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 321, n. 3/4, p. 273–279, Dec. 2011.

_____. Sex identification and sexual maturity stages in farmed great sturgeon, *Huso huso* L. through biopsy. **Iranian Journal of Veterinary Research**, Shiraz, v. 14, n. 2, p. 133–139, 2013.

FALAHATKAR, B.; POURSAEID, S. Gender identification in great sturgeon (*Huso huso*) using morphology, sex steroids, histology and endoscopy. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, Berlin, v. 43, n. 2, p. 81–89, Apr. 2014.

FELDBERG, E.; PORTO, J. I. R.; BERTOLLO, L. A. C. Chromosomal changes and adaptation of cichlid fishes during evolution. In: VAL, A. L.; KAPOOR, B. G. **Fish adaptations**. New York: Science Publishers, 2003. p. 285-308.

FIDDES, M. *Fish anaesthesia*. In: LONGLEY, L. (Ed.). **Anaesthesia of exotic pets**. Edinburgh: Elsevier Saunders, 2008. p. 261-78.

FONTENELE, O. Contribuição para o conhecimento da biologia do apaiari, *Astronotus cellatus* (Spix) (Pisces, Cichlidae), em cativeiro. Aparelho de reprodução, hábitos de desovae prolificidade. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 4, p. 467-484, 1982.

FONTENOT, D. K.; NEIFFER, D. L. Wound management in teleost fish: Biology of the healing process, evaluation, and treatment. **The Veterinary Clinics of North America. Exotic Animal Practice**, Philadelphia, v. 7, n. 1, p. 57–86, Jan. 2004.

GILDERHUS, P. A.; MARKING, L. L. Comparative efficacy of 16 anesthetic chemicals on rainbow trout. **North American Journal of Fisheries Management**, Bethesda, v. 7, n. 2, p. 288–292, Apr. 1987.

GUARDIOLA, F. A. et al. Comparative analysis of the humoral immunity of skin mucus from several marine teleost fish. **Fish and Shellfish Immunology**, London, v. 40, n. 1, p. 24–31, Sept. 2014.

GURGEL, J. J. S.; FREITAS, J. V. F. Aproveitamento final do pescado dos açudes do Nordeste brasileiro após beneficiado. **Boletim Técnico DNOCS**, Fortaleza, v. 31, n. 1, p. 37-44, 1973.

HARMS, C. A. Anaesthesia in fish. In: FOWLER, M. E.; MILLER, R. E. (Ed.). **Zoo and wild animal medicine**. 4th ed. Philadelphia: Saunders, 1999. p. 158–163.

HARMS, C. A. et al. Behavioral and clinical pathology changes in koi carp (*Cyprinus carpio*) subjected to anesthesia and surgery with and without intra-operative analgesics. **Comparative Medicine**, Memphis, v. 55, n. 3, p. 221–226, June 2005.

HARMS, C. A. Fish. In: FOWLER, M. E.; MILLER, R. E. (Ed.). **Zoo and wild animal medicine**. 5th ed. Saint Louis: Saunders, 2003. p. 2–20.

HARMS, C. A.; LEWBART, G. A. Surgery in fish. **The Veterinary Clinics of North America. Exotic Animal Practice**, Philadelphia, v. 3, n. 3, p. 759–774, Sept. 2000.

HARMS, C. A. Surgery in fish research: common procedures and postoperative care. **Lab Animal**, New York, v. 34, n. 1, p. 28–34, Jan. 2005.

HERNANDEZ-DIVERS, S. J. et al. Endoscopic sex determination and gonadal manipulation in Gulf of Mexico sturgeon (*Acipenser oxyrinchus desotoi*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, Lawrence, v. 35, n. 4, p. 459–470, Dec. 2004.

HILL, J. V.; FORSTER, M. E. Cardiovascular responses of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) during rapid anaesthetic induction and recovery. **Comparative Biochemistry and Physiology. C, Toxicology and Pharmacology**, New York, v. 137, n. 2, p. 167–177, Feb. 2004.

HOSKONEN, P.; PIRHONEN, J. Temperature effects on anaesthesia with clove oil in six temperate-zone fishes. **Journal of Fish Biology**, London, v. 64, n. 4, p. 1136–1142, Mar. 2004.

HURTY, C. A. et al. Evaluation of the tissue reactions in the skin and body wall of koi

(*Cyprinus carpio*) to five suture materials. **Veterinary Record**, London, v. 151, n. 11, p. 324–328, Sept. 2002.

HURVITZ, A. et al. Use of endoscopy for gender and ovarian stage determinations in Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) grown in aquaculture. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 270, n. 1/4, p. 158–166, Sept. 2007.

KOHN, Y. Y. et al. Sex identification in captive hapuku (*Polyprion oxygeneios*) using ultrasound imagery and plasma levels of vitellogenin and sex steroids. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 384/387, p. 87–93, Mar. 2013.

LEWBART, G. A. Current approaches to anesthesia and analgesia in fish. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE ECOLOGY AND MANAGEMENT OF ALIEN PLANT INVASIONS, 7., 2001, Fort Lauderdale. **Proceedings...** Fort Lauderdale: [s.n.], 2001. p. 19–20.

LEWBART, G. A. Fish. In: CARPENTER, J. W. (Ed.). **Exotic animal formulary**. 3rd ed. Saint Louis: Elsevier, 2005. p. 5–29.

LOKMAN, P. M. et al. Changes in steroid hormone profiles and ovarian histology during salmon pituitary induced vitellogenesis and ovulation in female New Zealand Longfinned eels, *Anguilla dieffenbachii* Gray. **The Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 289, n. 2, p. 119–129, Feb. 2001.

MARTIN, R. M. et al. Ultrasonic imaging, a potential tool for sex determination of live fish. **North American Journal Fisheries Management**, Bethesda, v. 3, n. 3, p. 258–264, July 1983.

MARTIN-ROBICHAUD, D. J.; ROMMENS, M. Assessment of sex and evaluation of ovarian maturation of fish using ultrasonography. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 32, n. 2, p. 113–120, Dec. 2001.

MATSUBARA, M. et al. Synthesis and possible function of 11-ketotestosterone during oogenesis in eel (*Anguilla* spp.). **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, v. 28, n. 1/4, p. 353–354, Mar. 2003.

MELILLO, R. et al. Theriogenology Early sexing techniques in *Lophiosilurus alexandri* (Steindachner, 1876), a freshwater carnivorous catfish. **Theriogenology**, Los Altos, v. 86, n. 6, p. 1523–1529, Oct. 2016.

METTAM, J. J. et al. The efficacy of three types of analgesic drugs in reducing pain in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Applied Animal Behaviour Science**, Amsterdam, v. 133, n. 3/4, p. 265–274, Sept. 2011.

MOCCIA, R. D. et al. The use of fine needle fibre endoscopy in fish for in vivo examination of visceral organs, with special reference to ovarian evaluation. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 40, p. 255–259, 1984.

MULCAHY, D. M. Surgical implantation of transmitters into fish. **ILAR Journal**, Washington, v. 44, n. 4, p. 295–306, 2003.

MUNDAY, L.; WILSON, S. K. Comparative efficacy of clove oil and other chemicals in anaesthetization of *Pomacentrus amboinensis*, a coral reef fish. **Journal of Fish Biology**, London, v. 51, n. 5, p. 931–938, Nov. 1997.

MURRAY, M. J. Endoscopy in sharks. **The Veterinary Clinics of North America. Exotic Animal Practice**, Philadelphia, v. 13, n. 2, p. 301–313, May 2010.

_____. Fish surgery. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, London, v. 11, n. 4, p. 246–257, 2002.

MUUSZE, B. et al. Hypoxia tolerance of Amazon fish. Respiratory and energy metabolism of the cichlid *Astronotus ocellatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: molecular and integrative physiology**, Oxford, v. 120, n. 1, p. 151–156, May 1998.

NAZERI, S. et al. Sexing of farmed immature beluga (*Huso huso*) using steroid hormone levels as indicators. **Comparative Clinical Pathology**, London, v. 23, n. 3, p. 631–635, May 2014.

NEIFFER, D. L.; STAMPER, M. A. Fish sedation, anesthesia, analgesia, and euthanasia: considerations, methods, and types of drugs. **ILAR Journal**, Washington, v. 50, n. 4, p. 343–60, 2009.

NEWBY, N. C.; WILKIE, M. P.; STEVENS, E. D. Morphine uptake, disposition, and analgesic efficacy in the common goldfish (*Carassius auratus*). **Canadian Journal of Zoology**, Ottawa, v. 87, n. 5, p. 388–399, Apr. 2009.

NEWMAN, D. M.; JONES, P. L.; INGRAM, B. A. Sexing accuracy and indicators of maturation status in captive Murray cod *Maccullochella peelii peelii* using non-invasive ultrasonic imagery. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 279, n. 1/4, p. 113–119, July 2008.

NORDGREEN, J. et al. Thermoreception in fish: effects of two different doses of morphine on thermal threshold and post-test behaviour in goldfish (*Carassius auratus*). **Applied Animal Behaviour Science**, Amsterdam, v. 119, n. 1/2, p. 101–107, June 2009.

OLSEN, Y. A.; EINARSDOTTIR, I. E.; NILSSEN, K. J. Metomidate anaesthesia in Atlantic salmon, *Salmo salar*, prevents plasma cortisol increase during stress. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 134, n. 1/2, p. 155–168, July 1995.

ORTENBURGER, A. I.; JANSEN, M. E.; WHYTE, S. K. Nonsurgical videolaparoscopy for de-termination of reproductive status of the Arctic charr. **The Canadian Veterinary Journal**, Guelph, v. 37, n. 2, p. 96–100, Feb. 1996.

PAIVA, M. P.; NEPOMUCENO, F. H. On the reproduction in captivity of the oscar, *Astronotus ocellatus* (Cuvier) according to the mating methods (Pisces- Cichlidae). **Amazoniana**, Manaus, v. 10, n. 4, p. 361–377, Jan. 1989.

PAVANELLI, G. C. Sanidade de peixes, rãs, crustáceos e moluscos. In: VALENTI, W. C. et al. **Aqüicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável**. Brasília: CNPQ, 2000. cap. 6, p.197-245.

POTTINGER, T. G. et al. Evaluation of biochemical methods for the non-destructive identification of sex in upstream migrating salmon and sea trout. **Journal of Fish Biology**, London, v. 67, n. 6, p. 1514–1533, 2005.

ROSS, L. G. Restraint, anaesthesia and euthanasia. In: WILDGOOSE, W. H. (Ed.). **Manual of ornamental fish**. 2nd ed. Quedgeley: BSAVA, 2001. p. 75–83.

SCHOETTGER, R. A.; STEUCKE, E. W. Using Baytex to control crayfish in ponds. **Progressive Fish Culturist**, Bethesda, v. 32, n. 1, p. 58–60, 1970.

SHACKLETON, M. A.; JENNIONS, M. D.; HUNT, J. Fighting success and attractiveness as predictors of male mating success in the black field cricket, *Teleogryllus commodus*: the effectiveness of no-choice tests. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, New York, v. 58, n. 1, p. 1–8, May 2005.

SHAFLAND, P. L.; PESTRAK, J. M. Lower lethal temperatures of fourteen non-native fishes in Florida. **Environmental Biology of Fishes**, Dordrecht, v. 7, n. 2, p. 149–156, Mar. 1982.

SLADKY, K. K.; CLARKE, E. O. Fish surgery: presurgical preparation and common surgical procedures. **The Veterinary Clinics of North America. Exotic Animal Practice**, Philadelphia, v. 19, n. 1, p. 55–76, Jan. 2016.

SLADKY, K. K. et al. Comparative efficacy of MS-222 (tri-caine methanesulfonate) and clove oil (eugenol) in red pacu (*Piaractus brachy-pomus*). **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 62, n. 3, p. 337–42, Mar. 2001.

SLOMAN, K. A. et al. Plasma cortisol concentrations before and after social stress in rainbow trout and brown trout. **Physiological and Biochemical Zoology**, Chicago, v. 74, n. 3, p. 383–389, May/June 2001.

SMALL, B. C. Anesthetic efficacy of metomidate and comparison of plasma cortisol responses to tricaine methanesulfonate, quinaldine and clove oil anesthetized channel catfish *Ictalurus punctatus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 218, n. 1/4, p. 177–185, Mar. 2003.

SMALL, B. C.; CHATAKONDI, N. Routine measures of stress are reduced in mature channel catfish during and after AQUIS anesthesia and recovery. **North American Journal of Aquaculture**, Bethesda, v. 67, n. 1, p. 72–78, Jan. 2005.

SNEDDON, L. U. Clinical anesthesia and analgesia in fish. **Journal of Exotic Pet Medicine**, New York, v. 21, n. 1, p. 32–43, Jan. 2012.

_____. The evidence for pain in fish: the use of morphine as an analgesic. **Applied Animal Behaviour Science**, Amsterdam, v. 83, n. 2, p. 153–162, Sept. 2003.

STETTER, M. D. Minimally invasive surgical techniques in bony fish (Osteichthyes). **The Veterinary Clinics of North America. Exotic Animal Practice**, Philadelphia, v. 13, n. 2, p. 291–299, May 2010.

_____. Use of rigid laparoscopy in Fish. In: AMERICAN ASSOCIATION OF ZOO VETERINARIANS ANNUAL CONFERENCE, 2002, Milwaukee. **Proceedings...** Milwaukee: [s.n.], 2002. p. 339-342.

STOSKOPF, M.; POSNER, L. P. Anesthesia and restraint of laboratory fish. In: FISH, R. E. et al. (Ed.). **Anesthesia and analgesia in laboratory animals**. 2nd ed. London: Elsevier, 2008. p. 519–534.

SWENSON, E. A.; ROSENBERGER, A. E.; HOWELL, P. J. Validation of endoscopy for determination of maturity in small salmonids and sex of mature individuals. **Transactions of the American Fisheries Society**, Bethesda, v. 136, n. 4, p. 994–998, Feb. 2007.

SZALAY, D. et al. Using operative outcome to assess technical skill. **American Journal of Surgery**, New York, v. 180, n. 3, p. 234–237, Sept. 2000.

TOBLER, M. Feigning death in the Central American cichlid *Parachromis friedrichsthalii*. **Journal of Fish Biology**, London, v. 66, n. 3, p. 877-881, Mar. 2005.

WAGNER, G. N. et al. Surgical implantation techniques for electronic tags in fish. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, London, v. 21, n. 1, p. 71–81, Mar. 2011.

WEBB, A.; MAUGHAN, M.; KNOTT, M. **Pest fish profiles. *Astronorus ocellatus* – Oscar**. James Cook: ACTFR, 2007. 3 p.

WEBER, E. P. et al. Anesthesia, diagnostic imaging, and surgery of fish. **Compendium: continuing education for veterinarians**, v. 31, n. 2, p. E11, Feb. 2009.

WEBER, E. S. Fish analgesia: pain, stress, fear aversion, or nociception? **The Veterinary Clinics of North America. Exotic Animal Practice**, Philadelphia, v. 14, n. 1, p. 21–32, Jan. 2011.

WILDHABER, M. L. et al. Gender identification of shovelnose sturgeon using ultrasonic and endo- scopic imagery and the application of the method to the pallid sturgeon. **Journal of Fish Biology**, London, v. 67, n. 1, p. 114–132, 2005.

WOOLSEY, J.; HOLCOMB, M.; INGERMANN, R. L. Effect of temperature on clove oil anesthesia in Steelhead fry. **North American Journal of Aquaculture**, Bethesda, v. 66, n. 1, p. 35–41, Jan. 2004.

ZAHL, I. H. et al. Anaesthesia of Atlantic cod (*Gadus morhua*) - Effect of pre-anaesthetic sedation, and importance of body weight, temperature and stress. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 295, n. 1/2, p. 52–59, Oct. 2009.