

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**TÉCNICAS PARA SEXAGEM
PRECOCE EM PACAMÃ**
(Lophiosilurus alexandri, STEINDACHNER, 1876)

REINALDO MELILLO FILHO

Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2016

REINALDO MELILLO FILHO

TÉCNICAS PARA SEXAGEM PRECOCE EM PACAMÃ

(*Lophiosilurus alexandri*, STEINDACHNER, 1876)

Dissertação apresentada à UFMG
como requisito parcial para obtenção
do grau de Mestre em Zootecnia.

Área: Produção Animal / Aquacultura

Orientador: Ronald Kennedy Luz

Belo Horizonte

Escola de Veterinária - UFMG

2016

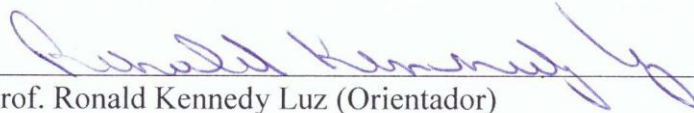
M522t Melillo Filho, Reinaldo, 1986-
Técnicas para sexagem precoce em Pacamã (*Lophiosilurus alexandri*, Steindachner, 1876)
/ Reinaldo Melillo Filho. – 2016.
44 p. : il.

Orientador: Ronald Kennedy Luz
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

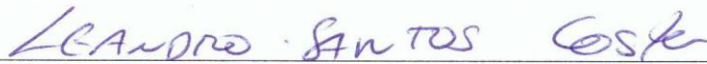
1. Pacamã (Peixe) – Reprodução – Teses. 2. Pacamã (Peixe) – Cirurgia – Teses. 3. Produção animal – Teses. 4. Sexagem – Teses. I. Luz, Ronald Kennedy. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 639.3


DISSERTAÇÃO defendida e aprovada em...29/01/2016... pela Comissão Examinadora composta pelos seguintes membros:



Prof. Ronald Kennedy Luz (Orientador)



Prof. Leandro Santos Costa



Prof. Fábio Pereira Arantes

“A realidade toda de um objeto não pode ser captada por um investigador humano, quiçá, nem todos juntos alcançarão um dia desvendar todo o mistério do objeto investigado. Isto, porém não invalida o esforço humano na busca da verdade, na procura incansável de decifrar os enigmas do universo.”

-Aloízio S. Ferreira e Márvio L. T. de Abreu, 2007.

DEDICATÓRIA

Ao meu orientador Ronald, por me retornar à vida acadêmica, incentivar e tornar possível.

Agradecimentos

Aos meus pais, minha família e amigos por todo o apoio com que sempre pude contar;

À Cristina, pelo amor e companheirismo;

Ao Dr. Roberto Melado e toda a equipe Fênix, pela amizade;

Ao professor Ronald Kennedy Luz, pela orientação, amizade e confiança no meu trabalho;

Ao professor Valentim Arabicano Gheller, pela co-orientação e amizade;

Ao colega Glaucio Vinício Chaves, pelo repasse de técnicas e pela participação direta nos trabalhos;

A todos os amigos do LAQUA que de alguma forma colaboraram para a realização dos experimentos;

A CAPES pela concessão da bolsa de Mestrado;

Ao CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro;

Muito obrigado.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1. COLORAÇÃO POR ACETATO-CARMIM.....	11
2.2. AVALIAÇÃO DE CARACTERES SEXUAIS SECUNDÁRIOS.....	12
2.3. ULTRASSONOGRAFIA.....	13
2.4. SEXAGEM POR ANÁLISES LABORATORIAIS.....	14
2.5. ENDOSCOPIA.....	14
2.6. O PACAMÃ.....	16
2.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17
3. OBJETIVOS.....	21
3.1. OBJETIVO GERAL.....	21
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
4. ARTIGO.....	22
4.1. ABSTRACT.....	23
4.2. INTRODUCTION.....	24
4.3. MATERIALS AND METHODS.....	25
4.4. EXPERIMENT 1 – COELIOSCOPY.....	25
4.5. EXPERIMENT 2 – COELIOTOMY.....	29
4.6. EXPERIMENT 3 - SEXING BY CANNULATION.....	30
4.7. BIOMETRIC INDEX.....	30
4.8. STATISTICAL ANALYSIS.....	30
4.9. RESULTS.....	31
4.9.1. EXPERIMENT 1.....	31
4.9.2. EXPERIMENT 2.....	33
4.9.3. EXPERIMENT 3.....	33
4.10. DISCUSSION.....	35
4.11. CONCLUSION.....	37
4.12. ACKNOWLEDGEMENTS.....	38
4.13. REFERENCES.....	38
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Values for sexing accuracy, weight, length, anesthesia induction time, procedure time, recovery time, gonadosomatic index (GSI), viscerosomatic fat index (VFI) and intestinal coefficient (IC) of <i>Lophiosilurus alexandri</i> submitted to sexing by coelioscopic technique.....	32
Tabela 2- Values for sexing accuracy, weight, length, anesthesia induction time, procedure time, recovery time), gonadosomatic index (GSI), viscerosomatic fat index (VFI), and intestinal coefficient (IC) of <i>Lophiosilurus alexandri</i> submitted to sexing by coeliotomy technique.....	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1a- System directs the solution to the small reservoir to the gills being recovered.....	26
Figura 1b- Veress needle insertion on the mid ventral line, 1 cm cranial...	27
Figura 1c- Trocater insertion on the right ventrolateral region, 2 cm	27
Figura 1d- Use of endoscopy for sexing <i>Lophiosilurus alexandri</i> by coelioscopy.....	28
Figura 2- Incision for sexing by coeliotomy.....	29
Figura 3- Interior view of the coelomic cavity of male (3a) and female (3b).....	31
Figura 4- Picture of <i>Lophiosilurus alexandri</i> intersexual gonad in anatomical position.....	33

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar técnicas de sexagem em juvenis de *Lophiosilurus alexandri*. Foram testadas as técnicas de celioscopia, que é realizada com o uso de equipamento para vídeo cirurgia, celiotomia que consistiu em procedimento cirúrgico para visualização direta das gônadas e sexagem por sonda uretral, que se baseia na identificação do sexo pela comparação entre as papilas genitais. Utilizando a técnica de celioscopia, a sobrevivência 30 dias após os procedimentos foi de 100%. Os peixes voltaram a se alimentar 10 dias após a cirurgia. A técnica apresentou 100% de confirmação para os indivíduos identificados como fêmeas, enquanto que para aqueles identificados como machos a confirmação foi de 66,6%. Não foi verificada diferença significativa para tempo de indução à anestesia e tempo de recuperação para machos e fêmeas. Contudo, o tempo de procedimento foi maior para os machos devido a dificuldade em observar as gônadas, fato que pode ser atribuído a grande quantidade de gordura visceral nos machos e ao coeficiente intestinal maior que 1, apesar de ser um peixe carnívoro. O índice gonadossomático foi maior nas fêmeas. Para a técnica de celiotomia, após 30 dias da cirurgia, a sobrevivência também foi de 100%. Foram verificados dois animais interssexo. A técnica foi eficiente para a sexagem com 96,3% de confirmação para machos e 93,9% para fêmeas. Os peixes voltaram a se alimentar entre 10 a 14 dias após a cirurgia. Não foi verificado diferenças significativas para tempo de indução anestésica, procedimento cirúrgico para visualização das gônadas e tempo de retorno da anestesia, entre machos e fêmeas ($P>0,05$). A técnica de sonda uretral foi menos eficiente, com 67,8 e 81,8% de confirmação para machos e fêmeas, respectivamente. Concluímos que a técnica de celiotomia é recomendada para sexagem de ambos os sexos e a celioscopia para identificar fêmeas juvenis de *L. alexandri*.

Palavras chaves: pacamã, reprodução, sexagem, peixe carnívoro, cirurgia em peixes

ABSTRACT

This study aimed to evaluate sexing techniques for juvenile *Lophiosilurus alexandri*. The following techniques were tested: Coelioscopy, performed with the use of video surgery equipment; coeliotomy, consisting of a surgical procedure for direct visualisation of the gonads, and sex determination by a urethral probe, based on sex identification by the comparison between the genital papillae. Using coelioscopy, survival was 100%, 30 days after the procedure. The fish restarted eating 10 days after surgery. This technique presented 100% confirmation for individuals identified as females, while for those identified as males confirmation was 66.6%. There was no significant difference between males and females for anesthesia induction and recovery time. However, the procedure took longer for males due to the difficulty in observing the gonads, which can be attributed to the large amount of visceral fat in males and to an intestinal coefficient larger than 1, despite it being a carnivorous fish. The gonadosomatic index was higher in females. As for the coeliotomy technique, 30 days after surgery, the survival rate was also 100%. Two intersex animals were found. This technique was efficient for sexing males with 96.3% accuracy and females with 93.9% accuracy. The fish restarted eating between 10 and 14 days after surgery. Significant differences between males and females were not found for anesthesia induction time, duration of the surgical procedure to visualise the gonads and anesthesia recovery time ($p > 0.05$). The urethral probe technique was less efficient, with 67.8 and 81.8% accuracy for males and females, respectively. We conclude that coeliotomy is recommended for sexing *L. alexandri* juvenile and coelioscopy, to identify females of *L. alexandri* juvenile.

Keywords: pacamã; reproduction; sexing; carnivorous fish; fish surgery

1. INTRODUÇÃO

A identificação do sexo em peixes é fundamental para o desenvolvimento de estratégias de manejo nos programas de reprodução na aquicultura (Rota e Marques, 2007). O dimorfismo sexual é facilmente identificado em algumas espécies de peixes como em lebiste *Poecilia reticulata*, na qual os machos apresentam tamanho menor e coloração mais intensa do que as fêmeas (Barreiro-Buceta, 2013). Entretanto, várias espécies de importância na aquicultura não apresentam dimorfismo sexual, ou este só aparece de forma secundária, ou seja, durante a maturidade sexual, como é o caso do padrão de coloração em pirarucu *Arapaima gigas* (Monteiro et al., 2010) e diferenças na anatomia da papila genital em tilápia *Oreochromis niloticus* (Yasui et al., 2006). Há espécies que atingem a maturidade sexual após alcançarem um grande tamanho corporal, nesse caso, os custos para se formar e manter o plantel de reprodutores é alto (Godinho, 2007). Metodologias como técnicas ultrassonográficas e cirúrgicas são utilizadas como alternativas para identificação sexual precoce em peixes, o que pode gerar economia para o produtor (Masoudifard et al., 2011; Chaves et al., 2015). Desta maneira, quando a seleção de reprodutores é realizada em peixes juvenis, torna possível adiantar a seleção dos indivíduos que apresentam desempenho zootécnico superior, minimizando a ocupação das estruturas de cultivo, o uso de mão de obra e os custos com alimentação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A revisão a seguir aborda técnicas utilizadas para sexagem em peixes, tanto para monitoramento da eficiência de inversão sexual, quanto aquelas utilizadas para segregar machos e fêmeas tendo em vista o manejo reprodutivo.

2.1. Coloração por acetato-carmim

Esta técnica é muito utilizada para a tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). Pode ser empregada com maior acurácia em peixes com comprimento mínimo de 3 cm e 0,5 g de peso médio (Makino et al., 2009). Consiste na retirada de uma amostra representativa de animais em cada lote. Depois de abatidos, o par de gônadas é identificado. Em seguida, algumas gotas de solução de Bouin são aplicadas diretamente nas gônadas. Este procedimento endurece o tecido gonadal facilitando a sua remoção.

Então, se estende as gônadas sobre uma lâmina de vidro onde são instiladas algumas gotas da solução de acetato-carmim. Em seguida, uma lamínula é colocada sobre este material fazendo-se uma leve pressão e é realizado exame ao microscópio de luz. O tecido gonadal dos machos é caracterizado pela presença de cistos que contêm espermatogônias e espermátócitos, enquanto que, nas gônadas das fêmeas, é verificada presença de ovócitos no estágio perinucleolar (Wassermann e Afonso, 2002; Makino et al., 2009).

A tilápia-do-nilo (*O. niloticus*) é uma das espécies mais cultivadas no Brasil, recomendando-se o cultivo de lotes monossexo, devido ao fato de o macho apresentar maior crescimento e melhor conversão alimentar do que a fêmea, como também para evitar problemas como cópula e desova que podem resultar em excesso populacional nos viveiros (Dias-Koberstein et al., 2007). A masculinização é realizada com o uso de 17 α -metiltestosterona adicionado à ração, na fase de alevinagem (Gayão et al., 2013). A eficiência deste processo de inversão sexual é avaliada através do método de coloração por acetato-carmim. Contudo, por ser necessário o sacrifício dos animais, é uma técnica que não poderia ser usada para formar planteis de reprodutores.

2.2. Avaliação de caracteres sexuais secundários

Em peixes, os caracteres sexuais secundários são variados: ex.: coloração, tubérculos na cabeça, glândulas cutâneas e outros (Godinho, 2007). Estas características são utilizadas para diferenciação sexual de algumas espécies de grande interesse para aquicultura brasileira, como o pirarucu (*A. gigas*) e a tilápia-do-nilo (*O. niloticus*).

O manejo reprodutivo do pirarucu (*A. gigas*) esbarra na falta de estudos para melhor compreensão de sua complexa estratégia reprodutiva. Na época de acasalamento, os machos exibem uma cor vermelha intensa em escamas abdominais, enquanto que, a cor vermelha é menos intensa nas fêmeas (Chu-Koo et al., 2008). Lopes e Queiroz (2009) analisaram a área e a intensidade de coloração, mas não conseguiram identificar o sexo corretamente nessa espécie. Desta forma, esta característica não é confiável para diferenciar os sexos (Carreiro et al., 2011). Contudo, Monteiro et al. (2010) relataram sucesso na identificação sexual de pirarucu em período reprodutivo (animais acima de 3 anos), através de uma mancha alaranjada na região inferior da cabeça, presente somente nos machos.

As tilápias apresentam dimorfismo sexual secundário permanente, representado principalmente, pela papila urogenital distinta entre os sexos, o que facilita o manejo

reprodutivo desta espécie. Na fêmea, a papila apresenta duas aberturas distintas, o orifício urinário e a saída do oviduto. Nos machos, existe somente uma abertura, que servirá para a liberação de sêmen e a excreção da urina (Yasui et al., 2006). Makino et al. (2009) utilizando Azul de Metileno a 1% para evidenciar a papila, conseguiram realizar a sexagem de forma eficaz em peixes com comprimento acima de 5 cm, o que ocorre entre 60 e 90 dias de idade.

2.3. Ultrassonografia

A ultrassonografia é uma técnica que permite identificar estruturas moles em diversas profundidades do organismo de maneira não invasiva. Essa técnica baseia-se na captação dos sons refletidos (ecos) ao passarem por tecidos de composições diferentes. Esses ecos são transformados em imagens, que aparecem na tela do aparelho de ultrassom como uma variação de sombras em cinza, preto e branco e podem ser facilmente interpretadas (Crepaldi et al., 2006).

Para espécies de peixes que não apresentam dimorfismo sexual secundário, a ultrassonografia está se destacando como alternativa aos métodos mais invasivos e complexos, como as técnicas baseadas em cirurgia, que podem comprometer a saúde destes animais e seu sucesso reprodutivo (Rota e Marques, 2007). Nos países onde a piscicultura já é consagrada como uma atividade empresarial, a utilização do ultrassom é rotineira em centros de pesquisas, principalmente na reprodução e permite a visualização das estruturas reprodutivas sem retirar o peixe da água, o que é uma grande vantagem, uma vez que se elimina qualquer interferência do ar na imagem gerada, proporcionando uma maior nitidez (Crepaldi et al., 2006).

Masoudifard et al. (2011) relataram a identificação sexual em esturjão (*Huso huso*) com exatidão acima de 96%, tanto para machos quanto para fêmeas utilizando o ultrassom. Entretanto, a presença da bexiga natatória e gases intestinais podem obstruir a visualização ultrassonográfica em outra espécie de esturjão (*Scaphirhynchus sp.*) (Divers et al., 2009). Na sexagem da tuvira (*Gymnotus sp.*) o uso do ultrassom apresentou 98% de acerto, com custo unitário inferior a R\$ 0,70 por peixe (Rota e Marques, 2007). Contudo, o uso do ultrassom requer experiência do operador para analisar as imagens, sendo que em peixes mais jovens, a acurácia diminui como verificado em esturjão russo (*Acipenser gueldenstaedtii*) (Hurvitz et al., 2007). Além disso, em arenque (*Clupea harengus pallasii*), a sexagem e a classificação do estágio reprodutivo com esta técnica só foram possíveis mediante um desenvolvimento mínimo

das gônadas, ou seja, quando estas apresentaram aumento de volume devido à proximidade do período reprodutivo, o que facilitou sua visualização (Bonar et al., 1989).

2.4. Sexagem por análises laboratoriais

Técnicas genéticas e moleculares estão sendo desenvolvidas para identificação do sexo em peixes. Uma das metodologias utilizadas é a identificação de marcadores moleculares associados aos cromossomos sexuais, através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (Vale et al., 2014).

Porém, esta técnica não se aplica a todas as espécies. O pirarucu (*A. gigas*) por exemplo, não apresenta diferenciação cromossômica entre machos e fêmeas, apresentando um número diplóide $2n = 56$ em ambos os sexos (Porto et al., 1992; Marques et al., 2006). Esturjões (*H. huso*) jovens não contem cromossomos sexuais, tornando impossível a identificação genética dos sexos numa fase precoce da vida (Wuertz et al., 2006; McCormick et al., 2008).

Como alternativa, Chu-Koo et al. (2008) buscaram determinar o sexo em pirarucu (*A. gigas*) por meio de detecção da proteína vitelogenina (Vtg) e mensuração dos níveis de esteróides sexuais 17β – estradiol (E2) e 11 – Ketotesterona (11KT), em amostras de sangue. Os resultados mostraram que é possível distinguir machos de fêmeas com seis anos de idade por meio da concentração de Vtg (100% de eficácia) e da proporção dos hormônios 11KT/E2 (95% de eficácia). Os autores afirmaram, ainda, que essa metodologia também se aplica em peixes com três anos de idade. No entanto, ainda não existe uma metodologia que permita distinguir machos e fêmeas antes de atingirem a primeira maturação gonadal.

2.5. Endoscopia

O endoscópio é constituído por um tubo fino contendo fibras ópticas para transmitir a luz de uma fonte externa, para iluminação de órgãos internos que são vistos através uma microcâmera de vídeo ou ocular ligado ao tubo (Swenson et al., 2007).

A identificação do sexo de peixes por endoscopia, também conhecida como celioscopia, se baseia na diferenciação macroscópica das estruturas reprodutivas, que são visualizadas inserindo-se o endoscópio através de uma pequena incisão abdominal, o que permite uma precisa avaliação tecidual e a classificação das gônadas como ovários ou testículos (Stetter, 2006).

Endoscópios têm sido utilizados com sucesso para esta finalidade em diversas espécies de peixe, incluindo truta (*Salvelinus fontinalis*) (Swenson et al., 2007), pirarucu (*A. gigas*) (Carreiro et al., 2011), esturjão (*H. huso*) (Falahatkar et al., 2011), enguia europeia (*Anguilla Anguilla*) (Macrì et al., 2014) e surubim (*Pseudoplatystoma* sp.) (Chaves et al., 2015), com índices de acerto que variam de 94% a 100%.

A preparação para a cirurgia com antissepsia de pele, feita como em mamíferos, não é recomendada para peixes, devido aos efeitos prejudiciais que a retirada do muco, rico em imunoglobulinas, pode causar (Stetter, 2010). Entretanto, para realização da cirurgia é necessário submeter o animal à anestesia. A indução anestésica é realizada por dissolução do princípio ativo escolhido na água, o que promove a absorção branquial do anestésico e sedação do peixe, que então pode ser retirado da água para realização do procedimento cirúrgico, que dura em média de 3 a 4 minutos (Falahatkar et al., 2011; Macrì et al., 2014; Chaves et al., 2015). Diversas substâncias podem ser utilizadas, sendo as mais frequentemente escolhidas a tricaina metanossulfonato e o eugenol (Murray, 2002). A manutenção da anestesia e a manutenção da respiração podem ser realizadas através de uma mangueira inserida na boca do peixe, promovendo a irrigação dos arcos branquiais com água e anestésico, conforme realizado por Macrì et al. (2014) e Chaves et al. (2015).

Os ovários se apresentam em formato sacular, alongados, de coloração rosada a amarelada, variando em função do *status* reprodutivo da fêmea, enquanto que, o formato dos testículos é variável em função da espécie e a coloração é esbranquiçada (Falahatkar et al., 2011). Estas características podem limitar a capacidade de distinção entre a gordura visceral e os testículos, o que dificulta a identificação do sexo em peixes que possuem muita gordura na cavidade celomática (Swenson et al., 2007; Falahatkar et al., 2011).

Para a sutura, após o procedimento, são empregados um ou dois pontos em padrão simples, sendo recomendada a utilização de fio cirúrgico monofilamento, que pode ser constituído por nylon, dentre outros materiais de uso comum em cirurgias e a retirada dos pontos não é necessária, pois estes são naturalmente expulsos pelo organismo (Murray, 2002). A recuperação é realizada retornando com o peixe para a água em um tanque provido de oxigenação suplementar. Neste momento é recomendado realizar manipulação do animal para estimular a passagem de água através das brânquias, o que acelera a recuperação da anestesia (Chaves et al., 2015).

Os índices de mortalidade relatados para esta técnica foram de 3,3% em truta (*Salvelinus fontinalis*) (Swenson et al., 2007) e 3,8% em pintado (*Pseudoplatystoma* sp.) (Chaves et al., 2015). Já, pra pirarucu (*A. gigas*) (Carreiro et al., 2011), esturjão (*H. huso*) (Falahatkar et al., 2011) e enguia europeia (*A. Anguilla*) (Macrì et al., 2014) não foi observada mortalidade associada ao procedimento.

2.6. O pacamã

O *Lophiosilurus alexandri* (Steindachner, 1876) é um peixe conhecido na bacia do rio São Francisco como pacamã, pacumã, pacamão ou niquin (Campeche et al. 2011). Pertence à ordem Siluriforme, é carnívoro, apresenta carne de excelente sabor, sem espinhos intramusculares e também vem despertando interesse do mercado de peixes ornamentais, o que tem incentivado sua introdução na aquicultura (Ribeiro et al., 2013, Lucanus & Mischook, 1997). Em sua região de ocorrência é muito cobiçado, o que gera forte pressão sobre os estoques naturais e o coloca na lista oficial de espécies em risco de extinção (Brasil, 2014). Foi introduzido na bacia do rio Doce, mas seu efeito sobre as espécies nativas não foi estudado (Barros et al., 2007).

Esta espécie apresenta desova parcelada e comportamento sedentário (Travassos, 1959). Libera seus ovos no substrato arenoso, onde o macho é geralmente o responsável pelo cuidado parental (Sato et al., 2003). Macroscopicamente, as gônadas de pacamã são pares e franjadas nos machos e pares e saculiformes nas fêmeas (Barros et al., 2007). A idade de primeira maturação gonadal nesta espécie ainda não foi descrita. Sua larvicultura já é realizada com sucesso através do emprego de alimento vivo (Melillo Filho et al., 2014).

Alguns autores afirmam que pacamã não apresenta dimorfismo sexual (Travassos, 1959; Sato et al., 2003) entretanto, Lopes et al. (2013) descreveram diferenças sutis entre as papilas urogenitais de machos e fêmeas adultos, que podem ser observadas a partir da inserção de uma sonda uretral na papila, com o intuito de identificar a presença do oviduto nas fêmeas (terceiro orifício).

2.7. Referências bibliográficas

BARREIRO-BUCETA P. Selección sexual en *Poecilia reticulata* (Guppys). Anales Universitarios de Etología, v.7, p.62- 68, 2013.

BARROS MDM, CRUZ RJG, JÚNIOR VCV, SANTOS JE. Reproductive apparatus and gametogenesis of *Lophiosilurus alexandri* Steindachner (Pisces, teleostei, Siluriformes) Rev. Bras. Zool., v. 24 (1), p. 213-221, 2007.

BONAR SA, THOMAS BP, PAULEY GB, MARTIN RW. Use of ultrasonic images for rapid no lethal determination of sex and maturity of Pacific Herring. Aquacult. Res., v.32, p.113-120, 1989.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Portaria MMA nº 445, de 17 de dezembro de 2014. Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção – Peixes e Invertebrados Aquáticos.

CAMPECHE DFB, BALZANA L, FIGUEIREDO RCR. Peixes nativos do Rio São Francisco adaptados para cultivo Petrolina: Embrapa Semiárido, v. 244, p. 1-20, 2011.

CARREIRO CRP, FURTADO-NETO MAA, MESQUITA PEC, BEZERRA TA. Sex determination in the giant fish of Amazon Basin, *Arapaima gigas* (Osteoglossiformes, Arapaimatidae), using laparoscopy. Acta Amazon., v.41, n.3, p.415 -420, 2011.

CHAVES GV, GHELLER VA, TEIXEIRA EA, LUZ RK. Coelioscopy technique for gender in surubim hybrid *Pseudoplatystoma corruscans* x *Pseudoplatystoma reticulatum*. Aquacult. Res., v.46, p.1007-1012, 2015.

CHU-KOO F, DUGUÉ R, AGUILAR MA. et al. Gender determination in the Paiche or Pirarucu (*Arapaima gigas*) using plasma vitellogenin, 17 β -estradiol, and 11-ketotestosterone levels. Fish Physiol. Biochem., v.35, p.125-136, 2008.

CREPALDI DV, TEIXEIRA EA, FARIA PM et al. A ultrassonografia na piscicultura. Rev. Bras. Reprod. Anim., v.30, n.3/4, p.174-181, 2006.

DIAS-KOBERSTEIN TCR, NETO AG, STÉFANI MV et al. Reversão sexual de larvas de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) por meio de banhos de imersão em diferentes dosagens hormonais. Rev. Acad., v.5, n.4, p.391-395, 2007.

DIVERS SJ, BOONE S S, HOOVER J J et al. Field endoscopy for identifying gender, reproductive stage and gonadal anomalies in free-ranging sturgeon (*Scaphirhynchus* sp.) from the lower Mississippi River. J. Appl. Ichthyol., v.25, Supl. 2, p.68-74, 2009.

FALAHATKAR A, GILANI MHT, FALAHATKAR S, ABBASALIZADEH A. Laparoscopy, a minimally-invasive technique for sex identification in cultured great sturgeon *Huso huso*. Aquaculture, v.321, p.273-279, 2011.

GAYÃO ALBA, BUZOLLO H, FÁVERO GC et al. Histologia hepática e produção em tanques-rede de tilápia-do-nilo masculinizada hormonalmente ou não masculinizada. Pesq. Agropec. Bras., v.48, n.8, p.991-997, 2013.

GODINHO HP. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aqüicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. Rev. Bras. Reprod. Anim., v.31, n.3, p.351-360, 2007.

HURVITZ A, JACKSON K, DEGANI G et al. Use of endoscopy for gender and ovarian stage determinations in Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) grown in aquaculture. Aquaculture, v.270, p.158-166, 2007.

LOPES JP, FRANÇA FL, NETO MAS. O domínio na produção de alevinos de pacamã – Propagação na Chesf permite repovoamento no rio São Francisco. Pan. da Aquic., v.23, nº136, pg 24-29, 2013

LOPES K, QUEIROZ HL. Avaliação do conhecimento tradicional dos pescadores da RDSM. Uakari, v.5, n.2, p.59-66, 2009.

LUCANUS O, MISCHOOK SN. Interesting imports. Trop. Fish Hob. Nep., v.45, p.24-28, 1997.

MACRÌ F, RAPISARDA G, STEFANO C et al. Coelioscopic investigation in european eels (*Anguilla anguilla*). J. Exot. Pet Med., v.23, p.147-151, 2014.

MAKINO LC, NAKAGHI LSO, PAES MCF et al. Efetividade de métodos de identificação sexual em tilápias-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) revertidas sexualmente com hormônio em ração com diferentes granulometrias. Biosci. J., v.25, n.2, p.112-121, 2009.

MARQUES DK, VENERE PC, GALETTI PM. Chromosomal characterization of the bonytongue *Arapaima gigas* (Osteoglossiformes: Arapaimidae), Neotrop. Ichthyol., v.4, p.215-218, 2006.

MASOUDIFARD MAR, VAJHI M, MOGHIM RM et al. High validity sex determination of three years old cultured Beluga Sturgeon (*Huso huso*) using ultrasonography. J. Appl. Ichthyol., v.27, p.643-647, 2011.

McCORMICK CR, BOS DH, DEWOODY JA. Multiple molecular approaches yield no evidence for sex-determining genes in lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*). J. Appl. Ichthyol., v.24, p.643-645, 2008.

MELILLO FILHO R, TAKATA R, SANTOS AEH et al. Draining system and feeding rate during the initial development of *Lophiosilurus alexandri* (Steindachner, 1877), a carnivorous freshwater fish. Aquacult. Res., v.45, p.1913-1920, 2014.

MONTEIRO LBB, SOARES MCF, CATANHO MTJ, HONCZARYK A. Aspectos reprodutivos e perfil hormonal dos esteróides sexuais do pirarucu, *Arapaima gigas* (Schinz, 1822), em condições de cativeiro. Acta Amaz., v.40, p.435-450, 2010.

MURRAY MJ. Fish Surgery. Semin. Avian. Exotic. Pet Med., v.11, n.4, p.246-257, 2002.

PORTO JIR, FELDBERG E, NAKAYAMA CM, FALCÃO JN. A checklist of chromosome numbers and karyotypes of Amazonian freshwater fishes. Rev. Hydrobiol. Trop., v.25, p.287-299, 1992.

RIBEIRO PAP, MIRANDA FILHO KC, MELILLO FILHO R et al. Efeito anestésico do eugenol em juvenis de pacamã. *Pesq. Agropec. Bras.* v.48, p.1136-1139, 2013.

ROTA MA, MARQUES DKS. Uso da ultra-sonografia na determinação do sexo de peixes nativos. 2007. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2007_4/ultrassonografia/index.htm>. Acesso em: 9/2/2015

SATO Y, FENRICH-VERANI N, NUÑER APO et al. Padrões reprodutivos de peixes da bacia do São Francisco. Em: Godinho, H.P.; Godinho, A.L. Águas e peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais. Editora PUC Minas, Belo Horizonte, p. 229-274, 2003.

STETTER M. Laparoscopic reproductive sterilization of waterfowl. *Proceedings of the AAZV, AWV, AZA/NAG Joint Conference.* Tampa, FL, p.290-293, 2006.

STETTER M. Minimally invasive surgical techniques in bony fish (Osteichthyes). *Vet. Clin. Exot. Anim.*, v.13, p.291-299, 2010.

SWENSON EA, ROSENBERGER AE, HOWELL PJ. Validation of endoscopy for determination of maturity in small salmonids and sex of mature individuals. *Trans. Am. Fish. Soc.*, v.136 p.994-998, 2007.

TRAVASSOS H. Nótula sobre o pacamã *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1876. *Atlas da Sociedade de Biologia* v.4, p.1-2, 1959.

VALE L, DIEGUEZ R, SÁNCHEZ L et al. A sex-associated sequence identified by RAPD screening in gynogenetic individuals of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Mol. Biol. Rep.*, v.41, p.1501-1509, 2014.

YASUI GS, SANTOS LC, FILHO OPR et al. Cultivo monossesual de tilápias: importância e obtenção por sexagem e inversão sexual. *Cad. Téc. Vet. Zootec.*, v.51, p. 37-61, 2006.

WASSERMANN GJ, AFONSO LOB. Validation of the aceto-carminic technique for evaluating phenotypic sex in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry. Cienc. Rural, v.32, n.1, p.133-139, 2002.

WUERTZ S, GAILLARD S, BARBISAN F et al. Extensive screening of sturgeon genomes by random screening techniques revealed no sex-specific marker. Aquaculture, v.258, p.685-688, 2006.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Realizar a sexagem em juvenis de pacamã *Lophiosilurus alexandri*.

3.2. Objetivos específicos

- Realizar a sexagem em pacamã pela técnica de celoscopia;
- Realizar a sexagem em pacamã pela a técnica de celiotomia;
- Realizar a sexagem em pacamã pela técnica de diferenciação de papila urogenital com o uso de sonda uretral;
- Avaliar o retorno à alimentação e sobrevivência como parâmetros para mensurar o efeito do estresse às técnicas de celiotomia e celoscopia.

4. ARTIGO

**Early sexing techniques in *Lophiosilurus alexandri* (Steindachner, 1876),
a freshwater carnivorous catfish**

Reinaldo Melillo Filho^a, Valentim Arabicano Gheller^b, Glauco Vinício Chaves^c,
Walisson de Souza e Silva^a, Deliane Cristina Costa^a, Luis Gustavo Figueiredo^a, Gustavo
Soares da Costa Julio^a, Ronald Kennedy Luz^{a*}

^aUniversidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Zootecnia, Laboratório de Aquacultura, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

^bUniversidade Federal de Minas Gerais, Laboratório de Obstetrícia Veterinária, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

^c Centro Universitário de Formiga, UNIFOR –MG, Formiga, Minas Gerais, Brazil.

*Author's address - Ronald K. Luz, Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento, Departamento de Zootecnia, Laboratório de Aquacultura. Avenida Antônio Carlos, 6627, CEP-30161-970, Belo Horizonte, MG, Brasil. E-mail address: luzrk@yahoo.com

4.1. Abstract

This study aimed to evaluate sexing techniques for juvenile *Lophiosilurus alexandri*. The following techniques were tested: Coelioscopy, performed with the use of video surgery equipment; coeliotomy, consisting of a surgical procedure for direct visualisation of the gonads, and sex determination by a urethral probe, based on sex identification by the comparison between the genital papillae. Using coelioscopy, survival was 100%, 30 days after the procedure. The fish restarted eating 10 days after surgery. This technique presented 100% confirmation for individuals identified as females, while for those identified as males confirmation was 66.6%. There was no significant difference between males and females for anesthesia induction and recovery time. However, the procedure took longer for males due to the difficulty in observing the gonads, which can be attributed to the large amount of visceral fat in males and to an intestinal coefficient larger than 1, despite it being a carnivorous fish. The gonadosomatic index was higher in females. As for the coeliotomy technique, 30 days after surgery, the survival rate was also 100%. Two intersex animals were found. This technique was efficient for sexing males with 96.3% accuracy and females with 93.9% accuracy. The fish restarted eating between 10 and 14 days after surgery. Significant differences between males and females were not found for anesthesia induction time, duration of the surgical procedure to visualise the gonads and anesthesia recovery time ($p > 0.05$). The urethral probe technique was less efficient, with 67.8 and 81.8% accuracy for males and females, respectively. We conclude that coeliotomy is recommended for sexing *L. alexandri* juvenile and coelioscopy, to identify females of *L. alexandri* juvenile.

Keywords: “pacamã”; reproduction; sexing; carnivorous fish; in-fish surgery

4.2. Introduction

The "pacamã" *Lophiosilurus alexandri*, a carnivorous fish belonging to the Siluriformes order, has high market value due to the flesh having no intramuscular bones and a flavour that is appreciated by the consumer. This species is also becoming popular in the ornamental fish market (Lucanus & Mischook, 1997). It is an important species of the São Francisco River Basin, both socially and ecologically. Its natural stocks are decreasing, and due to the fact that it has been considered an endangered species, it is commonly used in restocking programmes (Lins et al., 1997; Brazil, 2014). It presents a dorsoventrally flattened body shape, partial spawning, sedentary behaviour, a preference for lentic environments (Travassos, 1959), and parental care, with its eggs released on a sandy substrate (Sato et al., 2003). The larviculture of this species is already successful using different breeding systems (Tenório et al., 2006; Luz & Santos, 2008; Santos & Luz, 2008; Pedreira et al., 2009; Takata et al., 2014; Melillo Filho et al., 2014).

Sexual dimorphism in the urogenital papillae may be detected in *L. alexandri* adults from the third year of age (Lopes et al., 2013). However, an early sexing technique, performed on eight-month old fish, can generate savings for the breeder of USD 5.00 per fish, as it is not possible to perform sexing by secondary features, until fish reach sexual maturity (Burtle et al., 2003).

The assisted reproduction of a species is of fundamental importance and is hindered by sexual differentiation. In order to know the sex, it is usually necessary to kill the fish, which is prohibited for rare or endangered species (Wildhaber et al., 2005). Non-lethal methods for determining sex include sex hormone detection by radioimmunoassay of blood samples, ultrasound, and endoscopy (Ortenburger et al., 1996 ; Chu-Koo et al., 2009; Arantes et al., 2010). The detection of sex hormones is extremely expensive and cannot be carried out in a standard laboratory. The ultrasound technique has methodological limitations for its use in the field. The use of ultrasound requires a degree of expertise to analyse the images, and in young fish, accuracy decreases (Hurvitz et al., 2007). Furthermore, the presence of the swim bladder and intestinal gases can obstruct the view (Divers et al., 2009). The coelioscopy/endoscopy technique, however, was successfully performed in *Acipenser gueldenstaedtii* (Hurvitz et al., 2007), Salmonids (Swenson et al., 2007), and female of hybrids catfish (Chaves et al., 2015).

The aim of this study was to perform sexing in juveniles of *Lophiosilurus alexandri* using different methodologies.

4.3. Materials and Methods

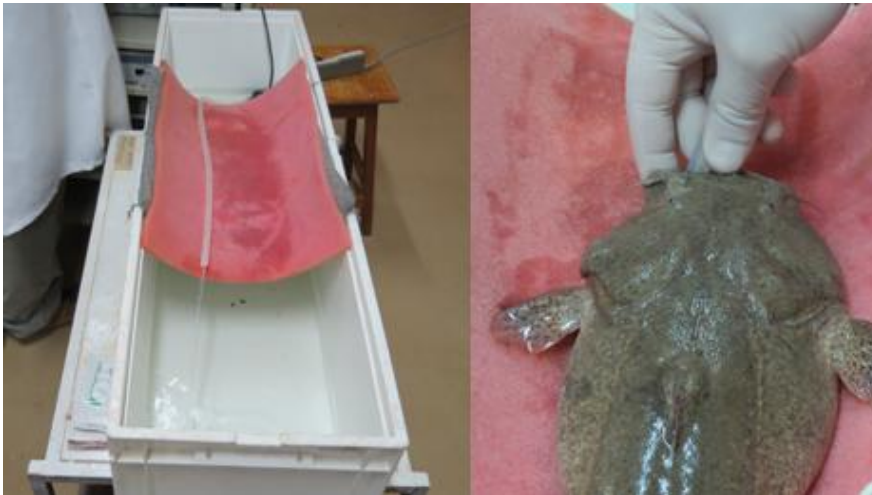
The studies were conducted in the Aquaculture Laboratory of the Department of Zootechnics, Veterinary School of the Federal University of Minas Gerais, Brazil (LAQUA/UFMG), with support from the Department of Veterinary Surgery and Clinical Care-UFMG and they were divided into three experiments following the methodology approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA /UFMG), protocol numbers. 153/2010 and 181/2014.

For the experiments, the animals produced at LAQUA were placed in circular tanks with a 400 L working volume, with supplemental aeration (dissolved oxygen > 5 mg/L), temperature of 28.0 ± 1.0 °C and heated water recirculation system. They were fed twice a day with commercial diet for carnivorous fish (40% crude protein).

4.4. Experiment 1 - Coelioscopy

This experiment was conducted in July 2013 with 34 specimens of *L. alexandri* with 36.3 ± 3.1 cm and 697.8 ± 205.0 g of length and weight, respectively. Previous to the procedures, the fish were fasted for 24 hours. The fish were individually placed in a tank for anesthesia with eugenol dissolved in the water at a dilution of 150 mg/L. During anesthesia induction and for animal identification, Partners & Quality Technology microchips were inserted, lateral to the dorsal fin. The animals were placed in dorsal decubitus on a padded surface on top of a supporting cast on a small water tank with anaesthetic. A recirculated water system with anaesthetic (100 mg of eugenol/L) was placed so the gills were constantly irrigated, providing oxygenation and maintaining anesthesia. The system, through an aquarium pump, directs the solution to the small reservoir to the gills being recovered (Figure 1a). To minimise irritation to the skin, no topical antiseptic was used.

Figure 1a. System directs the solution to the small reservoir to the gills being recovered



The equipment for coelioscopy consisted of a tower with a 14-inch Sony monitor, a Karl Storz electronic insufflator, a Telecam DX microcamera, a xenon light source with Karl Storz fibre optic cable, a CO₂ cylinder, and a JVC digital camcorder with cable to attach to the monitor. Video surgery equipment included a Veress needle to inflate the abdominal cavity, a 3-mm trocar specially made for the procedure; a 2.7 mm diameter rigid endoscope with 0° viewing angle. A small incision (2 mm) in the skin, craniocaudalis, was made between the pelvic fins of the fish, 1 cm cranial to the urogenital pore, for insertion of the Veress needle and insufflation with CO₂ (Figure 1b). The 3-mm trocar was inserted 2 cm cranially to the right pelvic fin (Figure 1c). The endoscope was directed to the chip reader for recording the identification of the animal and then inserted into the coelomic cavity, and after a brief general exam, the gonads were viewed (Figure 1d). The viewed structures were classified as male or female, and were recorded along with the number of the chip. The endoscope was then removed, followed by withdrawal of the Veress needle, and lastly the trocar. Before removing the trocar, a slight pressure was applied to the coelomic cavity, so that the maximum amount of CO₂ gas was expelled to return the fish to its normal density, thus avoiding excess buoyancy. After removing the trocar, the incision was sutured in standard single discontinuous with Nylon 3-0 (Shalom). Between each procedure, the equipment was cleaned using surgical gauze soaked in 4% chlorhexidine.

Figure 1b. Veress needle insertion on the mid ventral line, 1 cm cranial



Figure 1c. Trocater insertion on the right ventrolateral region, 2 cm



Figure 1d. Use of endoscopy for sexing *Lophiosilurus alexandri* by coelioscopy



For recovery from the procedure and anesthesia, the fish were placed in another tank with aeration and heating. In order to recover from anesthesia, the fish was manipulated and held against a flow of water to ensure ventilation, until they could move forward (Chaves et al., 2015). They were then placed in the original tanks.

The times for the induction of anesthesia, the procedure (which includes surgery up to the moment when the animals returned to the water), as well as recovery, when the animals presented hydrostatic equilibrium, were recorded individually.

After release in the tanks, the animals were fed daily for 30 days with 2% of the biomass divided into two meals at 8:00 am and 5:00 pm. We recorded when the animals restarted eating as well as mortality.

4.5. Experiment 2 - Coeliotomy

For this experiment, carried out in September 2014, 63 animals were used with an average weight of 369.6 ± 126.7 g and average length of 29.3 ± 3.1 cm. The procedures of fasting and anesthesia were the same as in experiment 1.

For the surgical procedures, routine instruments for coelomic cavity synthesis and diaeresis were used. These include a disposable scalpel blade n° 10, a Mayo-Hegar needle holder, and a toothless anatomical clamp. A 4 to 5 cm long "L" incision was made in the ventral region of the animal to facilitate viewing the surgical field (Figure 2). A 2 to 3 cm incision was made along the middle line of the animal, for 2 to 3 cm, and another 2 cm on the lower part of "L" to the right. When the coelomic cavity was accessed, anatomical forceps were used to remove the internal organs, allowing direct observation and classification of the gonads as testes or ovaries. After the observation, the synthesis of the cavity using a 3-0 (Shalon®) nylon thread and a continuous simple suture pattern in a single suture plan involving skin and muscles was done.

Figure 2. Incision for sexing by coeliotomy



Between each procedure, the surgical instruments were disinfected with chlorhexidine 4%. After the procedure in this experiment, a prophylactic antibiotics

therapy, consisting of sulphadoxine 70 mg/kg associated with trimethoprim-14 mg/kg (Borgal®), was injected intramuscularly into the dorsal region of the animals.

The times for the induction of anesthesia, the procedure and recovery was recorded as for Experiment 1. Additionally, similar procedures to the first experiment were adopted for the recovery of post-surgery animals, feeding, and observations

4.6. Experiment 3 - Sexing by cannulation

For this experiment, the animals of experiment 2 were used, in order to avoid killing other animals. After 30 days of observation, the 63 specimens of *L. alexandri* used in experiment 2 were euthanized by immersion in a eugenol 285 mg/L solution (396/2012 CETEA protocol) for sexing, using a urethral probe with 2 mm gauge. When this probe is inserted in the urogenital orifice of adult animals, it is possible to confirm three orifices in females (anus, urethra and oviduct) and two in males (anus and the urogenital hole), as described by Lopes et al. (2013). This sexing procedure was performed on euthanized animals, but this did not affect the results, which would otherwise have been performed on anaesthetised animals. In addition, this type of sexing is commonly used in fish farms, and it is known that it does not cause mortality. After that, the microchip was read for animal identification.

4.7. Biometric index

After euthanasia, the animals used in experiment 1 and experiment 2-3 were weighed and their length was measured. After the microchip identification, the macroscopic confirmation of sex by the gonads was performed. In experiments 1 and 2-3, the weight of gonads and visceral fat were registered. For the animals of experiment 1, the intestine length was also measured. With these data, we calculated: the GSI, from the expression $GSI = 100 (WG/W)$, where W is the total weight of the animal and WG is the mass of the gonads; the viscerosomatic fat index (VFI) from the expression $VFI = 100 (Wfv / W)$ where W represents the total weight of the animal and Wfv is the mass of visceral fat, and the intestinal coefficient (IC) from $IC \text{ ratio} = \text{intestine length} / \text{total length of the animal}$.

4.8. Statistical analysis

In order to compare the effectiveness of sexing by the different methods, accurate data were analysed using Fisher's test. Data referring to weight, length, GSI,

viscerosomatic fat index, anesthesia time, procedure time, and recovery time were compared by ANOVA. For the statistical analysis, the anesthesia induction time was square-root transformed and recovery time was log10 transformed, prior to analysis.

4.9. Results

4.9.1. Experiment 1

Survival was 100% after 30 days from the procedure and the fish restarted eating 10 days after the procedure. Macroscopically, the gonads of pacamã are paired and fringed in males and paired and bag-shaped in females (Figure 3).

Figure 3. Interior view of the coelomic cavity of male (3a) and female (3b)

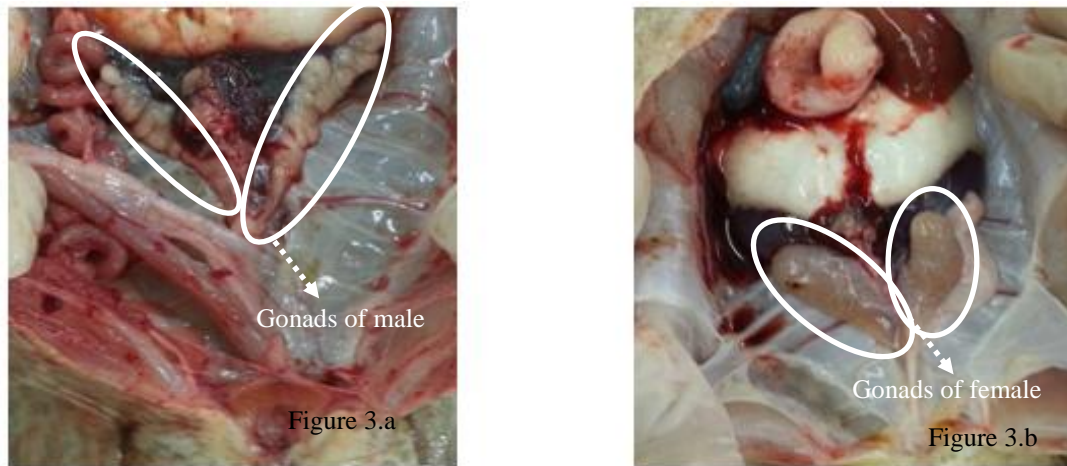


Table 1 shows the biometric and confirmation data of the coelioscopic technique. The technique is more efficient to identify females (100%) than males. No significant difference was observed for weight, length, anesthesia induction time, recovery time, and intestinal coefficient between males and females. The procedure time and the VFI were higher for males, whereas the GSI was higher in females.

Table 1. Values for sexing accuracy, weight, length, anesthesia induction time, procedure time, recovery time, gonadosomatic index (GSI), viscerosomatic fat index (VFI) and intestinal coefficient (IC) of *Lophiosilurus alexandri* submitted to sexing by coelioscopic technique

	n	Accurate Results (%)	Weight (g)	Length (cm)	Induction time (seconds)	Procedure time (seconds)	Recovery time (seconds)	GSI	IC	VFI
Female	22	100 a	729.9±235.4 a	36.5±3.6 a	113.2±37.5 a	282.9±218.3 b	115.5±48.4 a	1.43±1.1 a	1.2±0.2 a	1.3±0.4 b
Male	12	66.6 b	639.0±120.0 a	36.0±2.3 a	125.5±63.3 a	542.5±224.5 a	121.9±71.0 a	0.1±0.1 b	1.1±0.3 a	1.7±0.6 a
CV		*0.4	29.1	8.8	40.8	58.8	53.6	107.2	23.5	35.0

Within a column, superscripts indicate significant differences between means ($p < 0.05$).

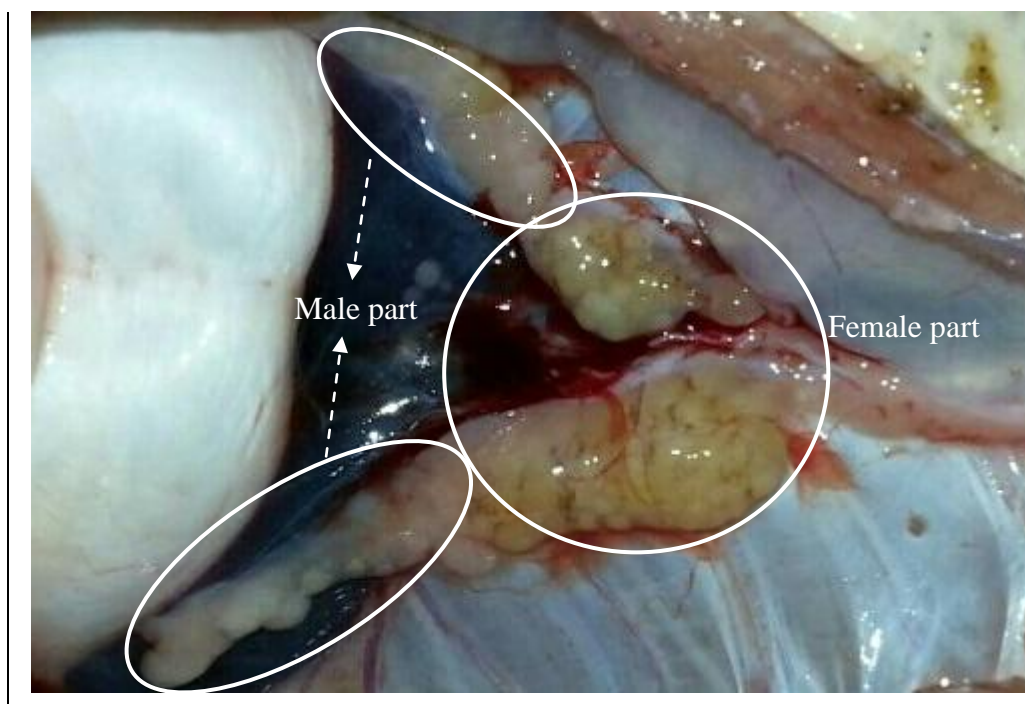
*Contingency coefficient

4.9.2. Experiment 2

There was no mortality during the 30 days of observation after surgery. The animals restarted eating 10 to 14 days after the procedure.

The coeliotomy sexing technique was efficient for sexing with a 96.3% accuracy for males and 93.9% for females (Table 2). When the animals were killed for macroscopic confirmation, two intersex individuals were found (Figure 4). No significant differences between males and females were observed for anesthesia induction time, surgical procedure time for viewing the gonads, and anesthesia recovery time. The weight and length of females were greater than the males. Nevertheless, there were no differences ($p > 0.05$) for the gonadosomatic and viscerosomatic fat indices.

Figure 4. Picture of *Lophiosilurus alexandri* intersexual gonad in anatomical position



4.9.3. Experiment 3

The urethral probe technique, despite being faster and less invasive, was less efficient, with 67.8 and 81.8% accuracy for males and females, respectively.

Table 2. Values for sexing accuracy, weight, length, anesthesia induction time, procedure time, recovery time), gonadosomatic index (GSI), viscerosomatic fat index (VFI), and intestinal coefficient (IC) of *Lophiosilurus alexandri* submitted to sexing by coeliotomy technique

	N1	Accurate results (%)	Weight (g)	Length (cm)	Induction time (seconds)	Procedure time (seconds)	Recovery time (seconds)	GSI	VFI
Male	28	96.3 a	297.9±98.8 b	28.4±3.2 b	147.0±38.7 a	470.7±131.4 a	204.0±139.4 a	0.1±0.1 a	1.8±0.4 a
Female	33	93.9 a	420.2±120.7 a	30.8±2.75 a	139.6±44.9 a	462.0±128.0 a	226.2±158.4 a	0.3±0.1 a	1.8±0.7 a
CV		0.08*	30.3	9.9	29.7	27.7	69.5	35.6	33.5

1 N total = 63 animals, of which 28 males, 33 females and two intersex individuals not considered for statistics

Sexing technique performed following the methodology described by Lopes et al. (2013) on euthanized animals with 285 mg/L eugenol.

*Contingency coefficient

Within a column, superscripts indicate significant differences between means ($p < 0.05$).

4.10. Discussion

Studies related to *L. alexandri* reproduction are few and have been performed on captured animals based on the reproduction of adult individuals (Santos et al. 2013; Costa et al. 2015). Macroscopically, the pacamã gonads are paired and fringed in males and paired and bag-shaped in females, as described by Barros et al. (2007). To date, the age and size of the first gonadal maturation of this species are not known.

The coeliotomy technique showed high efficiency for sexing, with 96.3% accuracy for males and 93.9% for females. This result was similar to that obtained by other authors for the use of endoscopy for *Acipenser gueldenstaedtii* (Hurvitz et al., 2007), Salmonids (Swenson et al., 2007), and *Huso huso* (Falihatkar et al., 2011). Despite being more invasive, coeliotomy does not require the use of sophisticated devices and offers a clear and direct view of the tissue. An L-shaped incision allows for a greater operating field compared to a straight incision of the same size, facilitating visceral manipulation and allowing the removal of structures blocking the view of the gonads, such as the intestine and intracoelomic fat.

Coelioscopy presented 100% confirmation for individuals identified as females, while for those identified as males confirmation was 66.6%. Therefore, this technique was less effective in males compared to coeliotomy in juvenile *L. alexandri*. This result can be explained by the lower GSI in males, a great amount of intracoelomic fat, a long and coiled intestine (despite the carnivorous feeding habits), and the flattened shape of the body, which provides little space for intracoelomic handling of the endoscope. These characteristics of the species made it difficult to visualise the male gonads. This difficulty was reflected in the procedure time (540 seconds on average for males), which was longer than the average for females (280 seconds). The magnification of the image achieved by the endoscope lenses also increases the movement in the generated image. It requires great care in handling the device because any abrupt movement causes oscillation in the image thus affecting observation. There was no significant difference between males and females for weight, length, and anesthesia induction time.

The urethral probe technique was less efficient than the coelioscopy and celiotomy, with 67.8 and 81.8% accuracy for males and females, respectively. These results are lower than what have been found for adult animals of the same species, from the third year of life, with 100% correct identification (Lopes et al., 2013). This suggests that it is still difficult to view the urogenital papilla in juveniles with approximately 370 g and 30 cm of weight and length, respectively.

Survival 30 days after the procedures was 100% for both surgical techniques (coelioscopy and coeliotomy), equivalent to the results described for *Huso huso* (Falahatkar et al., 2011) and higher than those for catfish, 6.2 % mortality (Chaves et al., 2013), both using coelioscopy (endoscopy). This suggests that *L. alexandri* juveniles are resistant to anesthesia and surgical procedures. This resistance is confirmed since the time to restart eating was short. It was longer (14 days) for the coeliotomy technique, compared to the coelioscopy technique (10 days). The difference can be attributed to the more invasive nature of coeliotomy. The use of endoscopes allows gonad observation through a much smaller incision (2 to 3 mm), while the coeliotomy incision size (4 to 5 cm) causes more extensive tissue injury, requiring more time to complete healing. Furthermore, smaller animals were used for coeliotomy, which highlighted the difference of the incision size between the two techniques, in relation to the body size of the animals.

For the surgical procedures, eugenol proved to be an effective anaesthetic. This anaesthetic has been used successfully on *L. alexandri* juveniles smaller than the ones used in this study with different size classes and doses ranging from 20 to 120 mg/L (Ribeiro et al., 2013). Eugenol requires no "grace period", which is the waiting time after using the active ingredient before slaughtering the animal, in order to avoid the presence of residues in the flesh. This product is not carcinogenic or mutagenic, it is affordable, easily found on the market, has good efficiency at low dosages, besides being safe for the handler and the environment (Munday and Wilson, 1997; Iversen et al. 2003 ; Charoendat et al., 2009 ; Roubach et al., 2005). The anaesthetic procedures were safe and efficient, keeping anesthesia and induction times within the recommended range, which is: induction in 3 minutes or less, complete recovery in 10 minutes or less, and no mortality after 15 minutes (Schoettger and Julin 1967; Gilderhus and Marking 1987; Small, 2003). No differences in the anesthesia and recovery times between sexes were recorded.

The sex ratio in this study was 35.3% males and 64.7% females in experiment 1 and 45.9% males and 54.1% females in experiment 2. A predominance of females has also been recorded in fish of this species in a natural environment, with the proportion of 62.8% females and 37.2% males (Barros et al., 2007). In experiment 1, females and males had similar weight and length, while in experiment 2, females were larger than males. This difference indicates that size is not a reliable parameter for sexing pacamã.

In the literature, there are no data for this species relating to the size at first maturity. However, females in reproductive stage are reported to be between three to five years (Lopes et al., 2013). In another study with animals collected in nature, vitellogenic oocytes were found in fish weighing 0.6 to 3.5 kg, and smaller females had a lower GSI (Barros et al., 2007). Females of this species suitable for breeding and weighing 3.1 ± 0.9 kg present a GSI ranging from 1.5 to 2.9 (Sato, 1999). In this study, experiment 1 was conducted with larger animals than those used in experiment 2, so animals used in experiment 1 macroscopically presented more developed female gonads, with higher a GSI than males. In experiment 2, on the other hand, there was no GSI difference between males and females, suggesting little gonadal development in this weight range. This reinforces the importance of the coeliotomy technique for early sexing.

The VFI in experiment 1 (larger animals) was lower in females with a higher GSI, while in experiment 2, the VFI and GSI were the same for males and females. This result may be related to the fact that visceral fat and hepatic reserves of individuals are used during the gonadal development process, as observed in various fish species (Chellappa et al., 1995; Huntingford et al., 2001; Lima-Junior et al., 2002; Gurgel et al. 2008; Silva et al. 2008).

After the animals were killed for macroscopic confirmation, two intersex individuals were found. This was the first report of intersex *L. alexandri* individuals. The existence of intersex animals is normal in some fish species that present hermaphroditism, while all fish in the Cyprinidae family undergo an intersex stage before developing ovaries and, later, testes (Takahashi and Shimizu, 1983). However, several authors have reported that estrogenic substances found in wastewater entering rivers, either treated or untreated, cause intersexuality in fish (Purdom et al., 1994; Jobling and Sumpter, 1993; Desbrow et al., 1998; Tyler and Routledge, 1998). In this study, however, all animals were kept in the laboratory from birth, under the same conditions, and they were kept in a water recirculation system. This rules out the possibility that intersexuality occurred due to environmental contamination, and studies are needed to clarify this sort of occurrence.

4.11. Conclusion

Coeliotomy and coelioscopy are recommended for sexing juvenile *L. alexandri*. The coelioscopy technique, however, must be performed with great care to identify males accurately and to minimise errors.

4.12. Acknowledgements

We thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brasil), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-Brasil), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG-Brasil) and Pró-Reitoria de Pesquisa (PRPq-UFMG-Brasil). LUZ, R.K. received a research grant and a research fellowship from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq No. 305913/2012-3) and from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG No. PPM-00403/13)

4.13. References

ARANTES PA, SANTOS HB, RIZZO E et al. Profiles of sex steroids, fecundity, and spawning of the curimatã-pacu *Prochilodus argenteus* in the São Francisco River, downstream from the Três Marias Dam, Southeastern Brazil. Anim. Reprod. Sci., v.118, p.330-336, 2010.

BARROS MDM, CRUZ RJG, JÚNIOR VCV, SANTOS JE. Reproductive apparatus and gametogenesis of *Lophiosilurus alexandri* Steindachner (Pisces, Teleostei, Siluriformes). Rev. Bras. Zool., v.24, p.213-221, 2007.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Portaria MMA nº 445, de 17 de dezembro de 2014. "Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção - Peixes e Invertebrados Aquáticos".

BURTLE GJ, NEWTON GL, LEWIS GW, JACOBS, J. Ultrasound for sex determination of catfish, 2003. Available in <http://www.caes.uga.edu/commodities/animals/aquaculture/catfish/ultrasound.html>.
Acess:21/05/2014

CHAROENDAT U, AREECHON N, SRISAPOOME P, CHANTASART D. The efficacy of synthetic eugenol as an anesthetic for tilapia (*Oreochromis niloticus*). Kasetsart J. Nat. Sci., v.43, p.132-140, 2009.

CHAVES GV, GHELLER VA, TEIXEIRA EA, LUZ RK. Coelioscopy technique for gender in surubim hybrid *Pseudoplatystoma corruscans* x *Pseudoplatystoma reticulatum*. Aquacult Res., v.46, p.1007-1012, 2015.

CHELLAPPA S, HUNTINGFORD FA, STRANG RHC, THOMSON RY. Condition factor and hepatosomatic index as estimates of energy status in male three-spined stickleback. J. Fish Biol., v.47, p.775-787, 1995.

CHU-KOO F, DUGUÉ R, ALVÁN AM et al. Gender determination in the Paiche or Pirarucu (*Arapaima gigas*) using plasma vitellogenin, 17beta-estradiol, and 11-ketotestosterone levels. Fish Physiol Biochem, v.35, p.125-36, 2009.

COSTA DC, SILVA WS, MELILLO FILHO R et al. Capture, adaptation and artificial control of reproduction of *Lophiosilurus alexandri*: A carnivorous freshwater species. Anim. Reprod. Sci., v.159, p.148-154, 2015.

DESBROW C, ROUTLEDGE EJ, BRIGHTY GC et al. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. Environ. Sci. Technol., v.32, p.1549-1558, 1998.

DIVERS SJ, BOONE SS, HOOVER JJ et al. Field endoscopy for identifying gender, reproductive stage and gonadal anomalies in free-ranging sturgeon (*Scaphirhynchus* sp.) from the lower Mississippi River. J. Appl. Ichthyol., v.25, p.68-74, 2009.

FALAHATKAR B, GILANI MHT, FALAHATKAR S, ABBASALIZADEH A. Laparoscopy, a minimally-invasive technique for sex identification in cultured great sturgeon *Huso huso*. Aquaculture, v.321, p.273-279, 2011.

GILDERHUS PA, MARKING LL. Comparative efficacy of 16 anaesthetic chemicals on rainbow trout. N. Am. J. Fish. Manag., v.7, p.288-292, 1987.

GURGEL HDCB, ALBUQUERQUE CQ, LIMA DDS, BARBIERI G. Aspectos da biologia pesqueira em fêmeas de *Cathrops spixii* do estuário do rio Potengi, Natal/RN, com ênfase nos índices biométricos. Acta Sci., v.22, p.503-505, 2008.

HUNTINGFORD FA, CHELLAPPA S, TAYLOR AC, STRANG RHC. Energy reserves and reproductive investment in male three spined sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus*. Ecol. Freshwat. Fish, v.10, p.111-117, 2001.

HURVITZ A, JACKSON K, DEGANI G, LEVAVI-SIVAN B Use of endoscopy for gender and ovarian stage determinations in Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) grown in aquaculture. Aquaculture, v.270, p.158-166, 2007.

IVERSEN M, FINSTADA B, MCKINLEYC RS, ELIASSEN RA The efficacy of metomidate, clove oil, Aqui-S and Benzoak as anesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts, and their potential stress reducing capacity. Aquaculture, v.221, p.549-566, 2003.

JOBLING S, SUMPTER JJ. Detergent components in sewage effluent are weakly estrogenic to fish: An in vitro study using rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) hepatocytes. Aquat. Toxicol., v.127, p.361-372, 1993.

LIMA-JUNIOR SE, CARDONE IB, GOITEIN R. Determination of a method for calculation of allometric condition factor of fish. Acta Sci., v.24, p.397-400, 2002.

LINS LV, MACHADO ABM, COSTA CMR, HERRMANN G. Roteiro metodológico para elaboração da lista de espécies ameaçadas de extinção: contendo a lista oficial da fauna ameaçada de extinção em Minas Gerais. Publicações Avulsas da Fundação Biodiversitas, v.1, p.1-50, 1997.

LOPES JP, FRANÇA FL, NETO MAS. O domínio na produção de alevinos de pacamã – Propagação na Chesf permite repovoamento no rio São Francisco. Pan. da Aquicult., v.23, p.24-29, 2013.

LUCANUS O, MISCHOOK SN. Interesting imports. Trop. Fish Hob. Nep., v.45, p.24-28, 1997.

LUZ RK, SANTOS JCE. Densidade de estocagem e salinidade da água na larvicultura do pacamã. *Pesq. Agropec. Bras.*, v.43, p.903-909, 2009.

MELILLO FILHO R, TAKATA R, SANTOS AEH et al. Draining system and feeding rate during the initial development of *Lophiosilurus alexandri* (Steindachner, 1877), a carnivorous freshwater fish. *Aquacult. Res.*, v.45, p.1913-1920, 2014.

MUNDAY L, WILSON SK. Comparative efficacy of clove oil and other chemicals in anaesthetization of *Pomacentrus amboinensis*, a coral reef fish. *J. Fish Biol.*, v.51, p.931-938, 1997.

ORTENBURGER A, JANSEN ME, WHYTE SK. Nonsurgical videolaprosopy for determination of reproductive status of the Arctic charr. *Can. Vet. J.*, v.37, p.96-100, 1996.

PEDREIRA MM, LUZ RK, SANTOS JCE et al. Biofiltração da água e tipos de substrato na larvicultura do pacamã. *Pesq. Agropec. Bras.*, v.44, p.511-518, 2009.

PURDOM C, HARDIMAN P, BYE V et al. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem. Ecol.*, v.8, p.275-285, 1994.

RIBEIRO PAP, MIRANDA FILHO KC, MELILLO FILHO R et al. Efeito anestésico do eugenol em juvenis de pacamã. *Pesq. Agropec. Bras.*, v.48, p.1136-1139, 2013.

ROUBACH R, GOMES LC, FONSECA FAL, VAL AL. Eugenol as an efficacious anaesthetic for tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier). *Aquacult. Res.*, v.36, p.1056-1061, 2005.

SANTOS HB, SAMPAIO EV, ARANTES FP, SATO Y. Induced spawning and reproductive variables of the catfish *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1876 (Siluriformes: Pseudopimelodidae). *Neotrop. Ichthyol.*, v.11, p.607-614, 2013.

SANTOS JCE, LUZ RK. Effect of salinity and prey concentrations on *Pseudoplatystoma corruscans*, *Prochilodus costatus* and *Lophiosilurus alexandri* larviculture. *Aquaculture*, v.87, p.324-328, 2009.

SATO Y. Reprodução de peixes da bacia do rio São Francisco: indução e caracterização de padrões – Doctoral Thesis, Universidade Federal de São Carlos; 1999.

SATO Y, FENERICH-VERANI N, NUNER APON et al. Padrões reprodutivos de peixes da bacia do São Francisco. Em: Godinho HP, Godinho AL, editors. *Águas e peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais*. Editora PUC Minas, Belo Horizonte; p. 229-274, 2003.

SCHOETTGER RA, JULIN AM. Efficacy of MS-222 as an anesthetic on four salmonids. United States Department of Interior Resource Publication 19, Bureau of Sport Fisheries and Wildlife, Washington, D.C 1967.

SILVA GC, CASTRO ACL, GUBIANI EA. Estrutura populacional e indicadores reprodutivos de *Scomberomorus brasiliensis* Collette, Russo e Zavala-Camin, 1978 (Perciformes: Scombridae) no litoral ocidental maranhense. *Acta. Sci.*, v.27, p.383-389, 2008.

SMALL BC. Anesthetic efficacy of metomidate and comparison of plasma cortisol responses to tricaine methanesulfonate, quinaldine and clove oil anesthetized channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture*, v.218, p.177-185, 2003.

SWENSON EA, ROSENBERGER AE, HOWELL PJ. Validation of endoscopy for determination of maturity in small salmonids and sex of mature individuals. *Trans. Am. Fish Soc.*, v.136, p.994-998, 2007.

TAKAHASHI H, SHIMIZU M. Juvenile intersexuality in a cyprinid fish, the Sumatra barb, *Barbus tetrazona*. *Bull Faculty Fish Hokkaido University* v.34, p.69-78, 1983.

TAKATA R, SILVA WS, COSTA DC et al. Effect of water temperature and prey concentrations on initial development of *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1876

(Siluriformes: Pseudopimelodidae), a freshwater fish. Neotrop. Ichthyol., v.12, p.853-859, 2014.

TENÓRIO RA, SANTOS AJG, LOPES JP, NOGUEIRA EMS. Crescimento do niquim (*Lophiosilurus alexandri* Steindachner 1876), em diferentes condições de luminosidade e tipos de alimentos. Acta. Sci., v.28, p.305-309, 2006.

TRAVASSOS H. Nótula sobre o pacamã *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1876. Atlas Soc. Biol., v.4, p.1-2, 1959.

TYLER CR, ROUTLEDGE EJ. Estrogenic effects in fish in English rivers with evidence of their causation. Pure Appl. Chem., v.70, p.1795-1804, 1998.

WILDHABER ML, PAPOULIAS DM, DELONAY AJ et al. Gender identification of shovelnose sturgeon using ultrasonic and endoscopic imagery and the application of the method to pallid sturgeon. J. Fish Biol., v.67, p.114-132, 2005.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As técnicas de celiotomia e celioscopia são recomendadas para sexagem de juvenis de *L. alexandri*, porém, a técnica de celioscopia deve ser realizada com maior cuidado para acertar na identificação de machos e minimizar erros. A equipe deve ser treinada para realizar os procedimentos cirúrgicos com elevada acurácia e no menor tempo possível. Os índices de acurácia se referem à concordância entre a sexagem cirúrgica e a observação macroscópica da gônada após a dissecação.

Os procedimentos cirúrgicos apresentados neste artigo podem ser aplicados para outras finalidades além da sexagem como, por exemplo, para realização de biópsias em diversos tecidos e observação macroscópica do estágio de desenvolvimento gonadal.

A descrição de intersexualidade em pacamã realizada neste estudo é inédita. Entretanto, a causa deste tipo de ocorrência, em condições controladas, para esta espécie permanece desconhecida, tornando-se necessários novos estudos para elucidar.