

Katina Roubedakis Ramos

**Anestésicos, fauna parasitária e estado de saúde de  
*Octopus maya* (Cephalopoda: Octopodidae)**

Tese submetida ao Programa de Pós  
Graduação em Aquicultura da  
Universidade Federal de Santa Catarina  
para a obtenção do Grau de Doutora em  
Aquicultura

Orientador: Dr. Maurício Laterça Martins

Florianópolis  
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Ramos, Katina Roumbedakis

Anestésicos, fauna parasitária e estado de saúde de  
Octopus maya (Cephalopoda: Octopodidae) / Katina  
Roumbedakis Ramos ; orientador, Maurício Laterça Martins -  
Florianópolis, SC, 2016.

154 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós  
Graduação em Aquicultura.

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. Saúde. 3. Parasitos. 4. Anestesia.  
5. Bem-estar. I. Laterça Martins, Maurício . II.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós  
Graduação em Aquicultura. III. Título.

**Anestésicos, fauna parasitária e estado de saúde de *Octopus maya*  
(Cephalopoda: Octopodidae)**

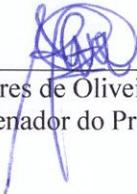
Por

KATINA ROUMBEDAKIS RAMOS

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de

**DOCTOR EM AQUICULTURA**

e aprovada em sua forma final pelo Programa de  
Pós-Graduação em Aquicultura.



---

Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.  
Coordenador do Programa

Banca Examinadora:

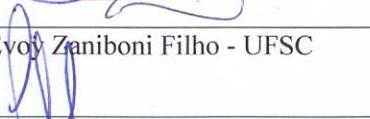


---

Dr. Mauricio Laterça Martins – *Orientador*

---

Dra. Erica Alves Gonzalez Vidal - UFPR



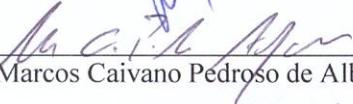
---

Dr. Evoy Zaniboni Filho - UFSC



---

Dr. José Luiz Pedreira Mouriño - UFSC



---

Dr. Marcos Caivano Pedroso de Albuquerque - UFSC



---

Dr. Maurício Gustavo Coelho Emerenciano - UDESC



À minha mãe, Iolita, por sempre me apoiar e acreditar nos meus sonhos!



## AGRADECIMENTOS

Certa vez, li uma frase de Antístenes, um filósofo da Grécia Antiga, que dizia “A gratidão é a memória do coração”. Hoje, com o coração cheio de memórias, agradeço:

primeiramente ao meu amigo e orientador Maurício Laterça Martins, por toda sua contribuição na minha formação acadêmica e profissional, pela confiança desde o primeiro dia em que nos conhecemos, por estar sempre presente mesmo nas ausências (tanto na minha quanto na sua), pelas horas de conversas no Skype e por me apoiar nos projetos desafiadores com animais marinhos nos últimos 7 anos;

ao Dr. Carlos Rosas Vázquez, meu orientador durante o doutorado sanduíche na *Universidad Nacional Autónoma de México* (UNAM), Sisal, Yucatán, México, por ter me recebido de braços abertos nos mares de lá. Meu agradecimento pela confiança, pela oportunidade de aprendizado, por seu eterno bom humor e por me permitir fazer parte da “família pulpito”. Gracias Doc! Não poderia deixar de agradecer também à Maru, por sempre me receber com um sorriso no rosto;

à Dra. Cristina Pascual, que carinhosamente me recebeu e me orientou durante meu primeiro estágio na UNAM e por me ensinar as técnicas de coleta e análise de hemolinfa;

à minha amiga Marina Nunes Alexandre, por compartilhar um pouco da vida mexicana comigo na Península de Yucatán, por aprender comigo e me ensinar, pela valiosa ajuda durante a realização dos experimentos, pelos nossos ceviches de domingo, por todas as vezes que contemplamos juntas os entardeceres na volta de bike para casa e, acima de tudo, por abraçar o mundo “pulpo” comigo! Valeu parceirinha!

à Dra. Maité Mascaró pelo auxílio nas análises estatísticas e pela paciência, didática e bom humor para me tentar fazer entender um pouquinho deste mundo dos números;

aos amigos do “Club Pulpito”, em especial a Karen Ortega, Sol Cante, Liliana Cubillos, por serem minhas eternas companheiras; a Claudia Caamal, Viri Gomez, Lupita Pazos, Juan Estefanell, Fernando Tercero, Miriam Palezytna, Luz Chavacan, Nathaly Casanova, Ariadna Sánchez-Garcia, Estefany Lopez, Adriana Rueda e Érika Escalante, por se tornarem minha família sisaleña;

à Doña Sílvia e Don António, “mis papás sisaleños”, pelo apoio na elaboração de alimento artificial, por me ensinarem de maneira incrível e prazerosa a pescar e cuidar dos polvos e por todo o carinho;

às técnicas dos laboratórios Pulpo e Central da UNAM Claudia Caamal, Elisa Chan, Karla Herrera e Ariadna Sánchez, pela amizade, pelos ensinamentos e pelo apoio durante as coletas;

aos amigos do Laboratório AQUOS pelos momentos agradáveis e pela amizade;

à Dra. Érica A. G. Vidal, Dr. Maurício G. C. Emerenciano, Dr. Evoy Zaniboni Filho, Dr. José Luiz P. Mouriño, Dr. Marcos C. P. Albuquerque por aceitarem compor a banca e por disponibilizarem parte do seu tempo para fazerem suas contribuições à minha tese;

aos professores e funcionários do Departamento de Aquicultura e do Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, em especial ao Carlito, pela atenção e prestatividade;

à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo do doutorado, ao Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE – CAPES) pela concessão da bolsa de estudo do doutorado sanduíche e aos projetos CAPES Ciências do Mar 43/2013, UNAM PAPIIT IT20070013 e IN215113 pelo apoio financeiro;

à todas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, no planejamento, execução e finalização deste trabalho;

por último, mas não menos importante, agradeço à minha mãe Iolita, à minha irmã Juliana, ao meu marido Cassio e aos meus sogros César e Rosa, por sempre me apoiarem, mesmo quando estávamos “longe dos olhos, mas perto do coração”. Amo vocês!



*“Pies, para que los quiero,  
si tengo alas para volar”.*

*Frida Kahlo*



## RESUMO

Este estudo teve como objetivo aumentar o conhecimento sobre anestésicos, fauna parasitária e estado de saúde de *Octopus maya*. Para tanto, foram realizados quatro experimentos: o primeiro teve como objetivo avaliar o estado de saúde de fêmeas pós-desova; o segundo e o terceiro, determinar o agente anestésico e a concentração que devem ser utilizados para a manipulação de curto prazo de juvenis e adultos; e o quarto objetivou avaliar os possíveis efeitos dos anestésicos nos parâmetros de hemolinfa. No primeiro experimento, foram analisadas as variáveis fisiológicas, metabólicas, imunológicas e parasitológicas após 1, 10, 20, 30 e 40 dias pós-desova (DPD) a fim de detectar possíveis diferenças no estado de saúde das fêmeas em relação ao tempo. A partir dos dados obtidos, foi possível concluir que, apesar de evidentes alterações nas variáveis fisiológicas, aliado a um aumento nos índices de glicose, indicando que as fêmeas de *O. maya* usam suas próprias reservas durante este período, pode-se observar uma adaptação das fêmeas e uma compensação imunológica que permitiu às fêmeas manterem-se saudáveis até 40 DPD. Adicionalmente, foi descrita pela primeira vez a fauna parasitária de fêmeas de *O. maya* pós-desova, com registro de *Aggregata* sp. no ceco, intestino e brânquias, e larvas de cestóides *Prochristianella* sp. na massa bucal. No experimento referente ao uso de agentes anestésicos para manipulação de curto prazo de juvenis, avaliou-se o efeito a curto e longo prazo da exposição às diferentes substâncias e concentrações, analisando o consumo de oxigênio antes, durante e depois da anestesia, o comportamento e o crescimento dos animais. Posteriormente, os melhores agentes anestésicos foram selecionados e seu efeito avaliado em adultos. Em juvenis, observou-se que os agentes anestésicos e a manipulação acarretaram alterações no consumo de oxigênio e ingestão de alimento, entretanto, em geral, não foram suficientes para ocasionar efeito a longo prazo no crescimento dos animais. Em adultos, etanol foi o agente anestésico que apresentou os melhores resultados. Assim, para a manipulação de curto prazo (até 3 min) de juvenis e adultos de *Octopus maya*, não é necessário o uso de agentes anestésicos. Em espécimes adultos de grande tamanho, nos quais a manipulação pode ser dificultada, sugere-se o uso de etanol 3,0%. Por último, no quarto experimento, analisaram-se o efeito dos agentes anestésicos em parâmetros de hemolinfa comumente utilizados para avaliar o estado nutricional e de saúde em polvos. Os resultados deste experimento permitem concluir que os agentes anestésicos, em geral, alteraram a

osmolalidade da água do mar e os parâmetros de hemolinfa avaliados e, portanto, recomenda-se cautela no uso destas substâncias quando estes parâmetros forem requeridos.

**Palavras-chave:** Aquicultura, saúde, parasitos, anestesia, bem-estar.

## ABSTRACT

This study aimed to increase the knowledge about anesthetics, parasite fauna and health status of *Octopus maya*. To achieve this objective, four experiments were carried out: the first one aimed to evaluate the health status of post spawning females; the second and the third, determine the anesthetic agent and concentration that should be used for short-term manipulation of juveniles and adults; and the fourth aimed to evaluate the possible effects of the anesthetic agentes on the hemolymph parameters. In the first experiment, the physiological, metabolic, immunological and parasitological variables in 1, 10, 20, 30 and 40 days after spawning (DAS) were analyzed to detect possible differences in the health status in relation to the time. Our results seem to indicate that although the evident changes in the physiological variables, combined with an increase in the glucose levels, indicating that *O. maya* females use their own reserves during this period, we can observe an adaptation of the animals and an immunological compensation which allowed themselves to maintain healthy until 40 DAS. In addition, we present for the first time the parasite fauna of post spawning *O. maya*, with the register of *Aggregata* sp. in the caecum, intestine and gills, and cestodes larvae *Prochristianella* sp. in the buccal mass. In the experiment of the use of anesthetic agentes for short-term manipulation of juveniles, we evaluated the short and long term effects of the exposure to the different substances and concentrations, analyzing the oxygen consumption before, during and after anesthesia, the behavior and the growth of the animals. Afterwards, the best anesthetic agents were selected and tested in adults. In the juveniles, we observed that the anesthetic agents and the manipulation resulted in changes on the oxygen consumption and in the food intake of the animals, however, in general, they were not enough to cause a long term effect on the growth of the animals. In adults, etanol was the anesthetic agent with the best results. Therefore, for short term manipulation of *Octopus maya* juveniles and adults (< 3min) it's not necessary the use of anesthetic agents; in specimens of big size, in which the handling can be difficulted, we suggest the use of etanol 3.0%. Lastly, in the fourth experiment, we analyzed the possible effects of the anesthetic agents on the hemolymph parameters commonly used to evaluate the nutritional and health status in octopuses. The results of this experiment, allowed us to conclude that the anesthetic agents, in general, changed osmolality and the hemolymph parameters evaluated and, thus, we recommend

caution in the use of these substances when these parameters are required.

**Keywords:** Aquaculture, health, parasites, anesthesia, welfare.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

- Figura 1:** Fêmeas de polvos com suas massas de ovos durante o cuidado parental. **A.** *Octopus insularis*; **B.** *Octopus maya*. Figura 1 A gentilmente cedida por Tatiana Leite. ....30
- Figura 2:** **A.** *Octopus vulgaris*; **B.** *Octopus insularis*. Figuras gentilmente cedidas por Tatiana Leite.....33
- Figura 3:** Ciclo de vida de *Aggregata* sp. A etapa de merogonia ocorre em um crustáceo decápode (hospedeiro intermediário) e as etapas de gamogonia e esporogonia ocorrem no polvo (hospedeiro definitivo). 1. Esporozoíto; 2-6. Desenvolvimento do merozoíto; 7. Merozoíto; 8-10. Desenvolvimento do macrogameta; 11. Macrogameta no momento da fertilização; 12-15. Desenvolvimento do microgameta; 16. Microgameta; 17. Zigoto; 18-20. Desenvolvimento do oocisto; 21. Oocisto contendo os esporocistos em desenvolvimento; 22-24. Desenvolvimento dos esporocistos; 25. Esporocistos contendo os esporozoítos (Adaptado de HOCHBERG,1990).....38
- Figura 4:** Distribuição geográfica de *Octopus maya*. ....46
- Figura 5:** *Octopus maya* (Adaptado de JEREB et al., 2014). ....47
- Figura 6:** **A.** Barcos de pesca de *Octopus maya* na costa de Sisal, Yucatán, México; **B.** Espécime de *Octopus maya* sendo capturado por pesca de “gareteo”. ....48
- Figura 7:** Cultivo de *Octopus maya* na *Universidad Nacional Autónoma de México* (UNAM, Unidad Académica Sisal), Sisal, Yucatán, México. **A.** Acondicionamento de espécimes selvagens de *Octopus maya* nas instalações da UNAM; **B.** Incubação artificial de ovos de *Octopus maya*. ....50
- Figura 8:** Cultivo de *Octopus maya* na *Universidad Nacional Autónoma de México* (UNAM, Unidad Académica Sisal), Sisal, Yucatán, México. **A.** Espécime recém-eclodido de *Octopus maya*; **B.** Juvenis de *Octopus maya* (setas). ....50

## CAPÍTULO II

**Fig. 1.** Variáveis fisiológicas (média  $\pm$  desvio padrão) de fêmeas de *Octopus maya* em diferentes dias pós-desova. PCT: peso corporal total; IHS: índice hepatossomático; IGS: índice gonadossomático; CO: capacidade osmótica..... 65

**Fig. 2.** Variáveis metabólicas (média  $\pm$  desvio padrão) em fêmeas de *Octopus maya* em diferentes dias pós-desova. Prot: proteínas; Glic: glicose; Acgl: acilglicerídeos; Col: colesterol; HC: concentração de hemocianina..... 66

**Fig. 3.** Variáveis imunológicas (média  $\pm$  desvio padrão) em fêmeas de *Octopus maya* em diferentes dias pós-desova. FOT: atividade de fenoloxidase total; FOplas: atividade de fenoloxidase em plasma; FODh: atividade de fenoloxidase em degranulado de hemócitos; FOsis: atividade de fenoloxidase em plasma e degranulado de hemócitos; OD<sub>490</sub>: densidade óptica em 490 nm; Hgl: atividade aglutinante; CTH: contagem total de hemócitos..... 67

## CAPÍTULO IV

**Fig. 1.** Cronograma experimental da avaliação dos diferentes agentes anestésicos em juvenis de *Octopus maya*..... 99

**Fig. 2.** Consumo de oxigênio antes, durante e depois da exposição de juvenis de *Octopus maya* aos diferentes agentes anestésicos e nos controles. Controle 1: sem agente anestésico e sem manipulação; Controle 2: sem agente anestésico e com manipulação; Mix: cloreto de magnésio associado a etanol..... 104

**Fig. 3.** Porcentagem de juvenis de *Octopus maya* em que ocorreu a indução completa à anestesia quando submetidos aos diferentes agentes anestésicos e concentrações. Hip: hipotermia; EtOH: etanol; MgCl<sub>2</sub>: cloreto de magnésio; Mix: cloreto de magnésio associado a etanol; OC: óleo de cravo..... 105

**Fig. 4.** Ingestão de alimento por juvenis de *Octopus maya* após exposição aos diferentes agentes anestésicos e nos controles. Controle 1: sem agente anestésico e sem manipulação; Controle 2: sem agente anestésico e com manipulação; Hip: hipotermia; EtOH: etanol; MgCl<sub>2</sub>: cloreto de magnésio; Mix: cloreto de magnésio associado a etanol; OC: óleo de cravo. .... 107

**Fig. 5.** Crescimento dos juvenis de *Octopus maya* expostos aos diferentes agentes anestésicos e concentrações. Controle 1: controle, sem agente anestésico e sem manipulação; Controle 2: controle, sem agente anestésico e com manipulação; Hip: hipotermia; EtOH: etanol; MgCl<sub>2</sub>: cloreto de magnésio; Mix: cloreto de magnésio associado a etanol; OC: óleo de cravo..... 108

## CAPÍTULO V

**Fig. 1.** Concentração de hemocianina e metabólitos plasmáticos (média ± desvio padrão) em *Octopus maya* expostos a diferentes agentes anestésicos. Hip: hipotermia; EtOH: etanol; MgCl<sub>2</sub>: cloreto de magnésio; Mix: cloreto de magnésio associado o etanol; HC: concentração de hemocianina; Prot: proteínas; Acgl: acilglicerídeos; Col: colesterol; Glic: glicose; Lact: lactato. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ )..... 129

**Fig. 2.** Capacidade osmótica (CO) e parâmetros imunológicos (média ± desvio padrão) em *Octopus maya* expostos aos diferentes agentes anestésicos. Hip: hipotermia; EtOH: etanol; MgCl<sub>2</sub>: cloreto de magnésio; Mix: cloreto de magnésio associado a etanol; CTH: contagem total de hemócitos; FOplas: atividade de fenoxidase em plasma; FOsis: atividade de fenoxidase em sistema (plasma e degranulado de hemócitos); Hgl: atividade aglutinante. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ). ..... 130



## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO III

**Tabela 1** Peso corporal total e índices hepatossomático e gonadossomático de fêmeas de *Octopus maya* em diferentes dias pós-desova (DPD). N: polvos analisados; PCT: peso corporal total, seguido pelo desvio padrão com valores mínimo e máximo entre parênteses; IHS: índice hepatossomático; IGS: índice gonadossomático. .... 84

**Tabela 2** Prevalência total e nos diferentes órgãos por *Aggregata* sp. em fêmeas de *Octopus maya* em diferentes dias pós-desova (DPD). P: prevalência (%); PI: polvos infectados; PE: polvos examinados. .... 85

**Tabela 3** Índices parasitológicos de cestoides *Prochristianella* sp. na massa bucal de fêmeas de *Octopus maya* em diferentes dias pós-desova (DPD). PI: polvos infectados; PE: polvos examinados; P: prevalência (%); AM: abundância média; IMI: intensidade média de infecção, seguido pelo desvio padrão com os valores mínimo e máximo entre parênteses. .... 85

### CAPÍTULO IV

**Tabela 1** Tempos de indução e recuperação em juvenis de *Octopus maya* expostos a diferentes agentes anestésicos e concentrações. [C]: concentração. PCT: peso corporal total (média  $\pm$  desvio padrão). Controle 1: sem agente anestésico e sem manipulação; Controle 2: sem agente anestésico e com manipulação; Hip: hipotermia; EtOH: etanol; MgCl<sub>2</sub>: cloreto de magnésio; Mix: cloreto de magnésio associado a etanol; OC: óleo de cravo. .... 106

**Tabela 2** Tempos de indução e de recuperação em adultos de *Octopus maya* expostos a diferentes agentes anestésicos e concentrações. [C]: concentração; PCT: peso corporal total (média  $\pm$  desvio padrão). Hip: hipotermia; EtOH: etanol; MgCl<sub>2</sub>: cloreto de magnésio; Mix: cloreto de magnésio associado a etanol. .... 109

## CAPÍTULO V

**Tabela 1** Variáveis fisiológicas em adultos de *Octopus maya* expostos aos diferentes agentes anestésicos e concentrações. AA: agente anestésico; [C]: concentração; PCT: peso corporal total (média  $\pm$  desvio padrão); IGS: índice gonadossomático; IHS: índice hepatossomático; Hip: hipotermia; EtOH: etanol; MgCl<sub>2</sub>: cloreto de magnésio; Mix: cloreto de magnésio associado a etanol. ....127

**Tabela 2** Tempos de indução e osmolalidade das substâncias testadas e da hemolinfa de *Octopus maya* expostos aos diferentes agentes anestésicos e concentrações. AA: agente anestésico; [C]: concentração; mOsm: osmolalidade (média  $\pm$  desvio padrão); AM: água do mar; Hip: hipotermia; EtOH: etanol; MgCl<sub>2</sub>: cloreto de magnésio; Mix: cloreto de magnésio associado a etanol. ....127

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[C] – concentrações

Acgl – acilglicerídeos

AM – abundância média

ANOVA – análise de variância

CO – capacidade osmótica

Controle 1 – sem agente anestésico e sem manipulação

Controle 2 – sem agente anestésico e com manipulação

CTH – contagem total de hemócitos

DPD – dias pós-desova

EtOH – etanol

FO – fenoloxidase

FOT – atividade de fenoloxidase total

FOplas – atividade de fenoloxidase em plasma

FOsis – atividade de fenoloxidase em plasma e degranulado de hemócitos

Glic – glicose

Hip – hipotermia

HC – concentração de hemocianina

Hgl – atividade aglutinante

IGS – índice gonadossomático

IHS – índice hepatossomático

IMI – intensidade média de infecção

L-DOPA – L-3,4- diidroxifenilalanina

MgCl<sub>2</sub> – cloreto de magnésio

Mix – cloreto de magnésio associado a etanol

OC – óleo de cravo

OD – oxigênio dissolvido

OD<sub>490</sub> – densidade óptica em 490 nm

P – prevalência

Pgl – Peso da glândula digestiva

Prot – proteínas

PBS – solução salina tamponada com fosfato

PCT – peso corporal total

PE – polvos examinados

PI – polvos infectados

proFO – pró-fenoloxidase

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

UNAM – Universidad Nacional Autónoma de México

ROIs – espécies reativas de oxigênio

RNIs – espécies reativas de nitrogênio

## SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	27
1. INTRODUÇÃO .....	29
1.1 Aspectos gerais.....	29
1.2 Captura de polvos .....	30
1.3 Espécies com potencial de cultivo.....	32
1.4 Cultivo de polvos .....	33
1.5 Alguns aspectos éticos na manipulação de cefalópodes.....	34
1.6 Agentes patogênicos.....	36
1.6.1 Vírus.....	36
1.6.2 Bactérias.....	36
1.6.3 Fungos.....	37
1.6.4 Parasitos .....	37
1.7 Sistema imune de cefalópodes.....	39
1.8 Conclusões e perspectivas .....	43
2. ESPÉCIE DE ESTUDO: <i>Octopus maya</i> .....	45
2.1 Classificação taxonômica .....	45
2.2 Distribuição geográfica .....	45
2.3 Características gerais.....	45
2.4 Captura .....	47
2.5 Cultivo.....	48
3. JUSTIFICATIVA.....	51
4. OBJETIVOS.....	53
4.1 Objetivo geral.....	53
4.2 Objetivos específicos.....	53
5. FORMATAÇÃO DA TESE.....	55
CAPÍTULO II .....	57

Estado de saúde de fêmeas de <i>Octopus maya</i> (Cephalopoda: Octopodidae) pós-desova na Península de Yucatán, México.....	57
RESUMO .....	59
1. Introdução .....	59
2. Materiais e métodos .....	60
2.1 Coleta e manutenção dos animais .....	60
2.2 <i>Coleta e preparo de hemolinfa</i> .....	61
2.3 <i>Variáveis fisiológicas</i> .....	61
2.4 <i>Variáveis metabólicas</i> .....	62
2.5 <i>Variáveis imunológicas</i> .....	62
2.6 <i>Análises estatísticas</i> .....	63
3. Resultados .....	64
3.1 <i>Variáveis fisiológicas</i> .....	64
3.2 <i>Variáveis metabólicas</i> .....	64
3.3 <i>Variáveis Imunológicas</i> .....	64
4. Discussão .....	68
5. Conclusão.....	72
6. Agradecimentos .....	72
7. Referências.....	72
CAPÍTULO III.....	79
Fauna parasitária de fêmeas de <i>Octopus maya</i> (Cephalopoda: Octopodidae) pós-desova na península de Yucatán, México.....	79
RESUMO.....	81
1. Introdução .....	81
2. Material e métodos .....	82
3. Resultados .....	83
4. Discussão .....	86
5. Conclusão.....	88

6. Agradecimentos.....	89
7. Referências.....	89
CAPÍTULO IV.....	93
Respostas fisiológicas e comportamentais de <i>Octopus maya</i> (Voss e Solís, 1966) expostos à diferentes agentes anestésicos e concentrações.....	93
RESUMO.....	95
1. Introdução.....	96
2. Materiais e métodos.....	96
2.1 Agentes anestésicos e concentrações.....	97
2.2 Critérios para anestesia.....	98
2.3 Experimento 1: Anestesia em juvenis.....	98
2.3.1 Consumo de oxigênio.....	99
2.3.2 Comportamento.....	100
2.3.3 Crescimento.....	100
2.4 Experimento 2: Anestesia em adultos.....	100
2.5 Análises estatísticas.....	101
3. Resultados.....	101
3.1 Experimento 1: Anestesia em juvenis.....	101
3.1.1 Consumo de oxigênio.....	101
3.1.2 Comportamento.....	104
3.1.3 Crescimento.....	107
3.2 Experimento 2: Anestesia em adultos.....	108
4. Discussão.....	109
5. Conclusão.....	113
6. Agradecimentos.....	114
7. Referências.....	114
CAPÍTULO V.....	119

Avaliação de diferentes agentes anestésicos sobre os parâmetros de hemolinfa de <i>Octopus maya</i> (Cephalopoda: Octopodidae).....	119
1. Introdução .....	121
2. Materiais e métodos .....	122
2.1 Animais .....	122
2.2 Agentes anestésicos e critérios para anestesia.....	123
2.3 Coleta e preparo da hemolinfa .....	123
2.4 Análise da hemolinfa.....	124
2.5 Índices biométricos .....	126
2.6 Análises estatísticas .....	126
3. Resultados .....	126
4. Discussão .....	131
5. Conclusão.....	135
6. Agradecimentos .....	136
7. Referências.....	136
6. CONCLUSÕES GERAIS .....	141
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	143
8. REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO.....	145

## CAPÍTULO I

### INTRODUÇÃO GERAL

**A primeira parte da introdução geral desta Tese foi publicada como um capítulo de livro: ROUMBEDAKIS, K.; MARTINS, M. L. Cap. 17 - Sanidade de polvos: Estado atual e perspectivas. In: TAVARES-DIAS, M.; MARIANO, W. S. (Org.). *Aquicultura no Brasil: novas perspectivas. Vol 1. Aspectos Biológicos, Fisiológicos e Sanitários de Organismos Aquáticos*. 1ed. São Carlos, SP: Pedro & João Eds, 2015, v. 1, p. 329-353.**



# 1. INTRODUÇÃO

## Sanidade de polvos: Estado atual e perspectivas

### 1.1 Aspectos gerais

A classe Cephalopoda é dividida em duas subclasses: Nautiloidea, que possui apenas dois gêneros, *Nautilus* e *Allonautilus*, os únicos representantes vivos com concha externa, e Coleoidea, que compreende as lulas, sépias, polvos e “vampiros” (JEREB et al., 2014). Segundo estes autores, os cefalópodes compreendem quase 1.000 espécies vivas atualmente descritas, entretanto, estima-se que existam pelo menos outras 100 espécies não descritas. Dentre a ordem Octopoda, à qual pertencem os polvos, destaca-se o gênero *Octopus* que compreende mais de 200 espécies (JEREB et al., 2014), distribuídas principalmente em águas rasas tropicais. Os polvos desempenham papel fundamental nas relações tróficas dos ecossistemas marinhos, tanto como predadores de uma diversa fauna bentônica, como presas importantes de diversas espécies que estão no topo da cadeia alimentar (GUERRA, 1992).

Em cefalópodes coleóides, o ciclo de vida é, em geral, curto podendo variar de 6 a 36 meses (MANGOLD, 1983). Estes animais são semélparos, ou seja, apresentam apenas um evento reprodutivo durante a vida (MANGOLD, 1983; BOYLE; RODHOUSE, 2005). Os polvos da família Octopodidae são dioicos e apresentam dimorfismo sexual: quando sexualmente maduros, os machos apresentam um braço diferenciado, o hectocótilo, através do qual transferem os espermatóforos para o oviduto da fêmea durante a cópula (BOYLE; RODHOUSE, 2005). Após a transferência, os espermatóforos se rompem e liberam o esperma, que é armazenado na espermateca da glândula ovidutal onde ocorre a fecundação (FROESCH; MARTHY, 1975).

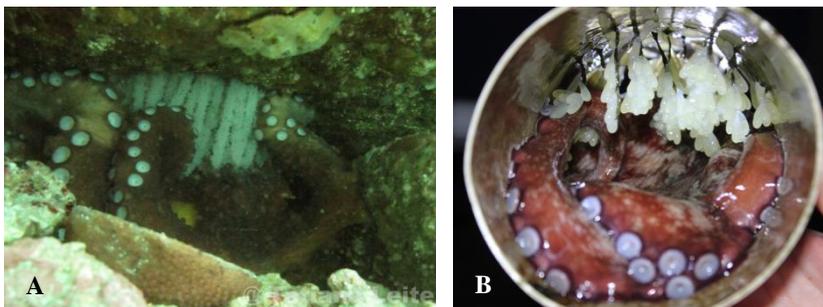
O desenvolvimento embrionário é direto e, em espécies de águas rasas, dura geralmente entre um e dois meses dependendo da temperatura da água (FORSYTHE; HANLON, 1988). Após a postura, a fêmea dedica-se exclusivamente à sua manutenção (Figuras 1 A e B). O cuidado parental inclui a proteção da massa de ovos de possíveis predadores, aeração e limpeza dos ovos e eliminação de embriões mortos (VIDAL et al., 2014). Durante este período a fêmea não se alimenta, necessitando de reservas endógenas (GUERRA, 1992; ROCHA, 2003), o que acarreta mudanças fisiológicas e sua condição se deteriora drasticamente podendo ser observada uma diminuição

corporal, culminando com sua morte após a eclosão dos ovos (GUERRA, 1992).

Após a eclosão, as paralarvas, geralmente permanecem no plâncton onde se alimentam até se estabelecerem no substrato e iniciarem a fase bentônica (BOYLE; RODHOUSE, 2005). Este período é relativamente curto devido à alta taxa de crescimento destes animais (ROCHA, 2003). Em algumas espécies com ovos de maior tamanho (Figura 1 B), o animal recém eclodido se integra imediatamente ao habitat do adulto, sem passar pela fase planctônica (SWEENEY et al., 1992).

Após a reprodução, os polvos passam por uma etapa conhecida como senescência caracterizada como um estágio normal do ciclo de vida e geralmente ocorre antes da morte: em machos ocorre após a cópula e nas fêmeas durante a incubação dos ovos ou logo após sua eclosão (ANDERSON et al., 2002). A senescência não é uma doença ou o resultado de uma doença, embora doenças também possam ocorrer durante este estágio (PASCUAL et al., 2010). Quatro condições ou atividades são indicadoras deste estágio: perda de apetite ou ausência de alimentação levando à perda de peso, retração da pele ao redor dos olhos, atividade indireta ou não coordenada e ocorrência de lesões na pele (ANDERSON et al., 2002).

**Figura 1:** Fêmeas de polvos com suas massas de ovos durante o cuidado parental. **A.** *Octopus insularis*; **B.** *Octopus maya*. Figura 1 A gentilmente cedida por Tatiana Leite.



## 1.2 Captura de polvos

Os cefalópodes apresentam grande valor como fonte de proteína para o consumo humano. O abastecimento do mercado mundial está baseado quase que exclusivamente na captura de espécimes do

ambiente, dependendo da disponibilidade de animais e da frequência da pesca. A captura de cefalópodes tem aumentado significativamente nas últimas décadas, devido ao declínio de estoques de peixes, superando 4 milhões de toneladas e representando 3% do comércio mundial de pescados em 2012 (FAO, 2014). Conseqüentemente, a importância da captura de polvos também tem aumentado, principalmente na Europa, onde são consumidos em larga escala e possuem alto valor comercial.

Seguindo a tendência mundial, os polvos tornaram-se excelentes potenciais pesqueiros no Brasil devido à redução da captura de pescados tradicionais aliada à expansão pesqueira sobre os cefalópodes. Até o início dos anos 2000, os polvos eram capturados principalmente como fauna acompanhante durante a pesca de arrasto-de-fundo de camarões (GASALLA et al., 2005), sendo, em 2003, implementada a pesca de polvo com espinhéis de pote pela frota comercial paulista (ÁVILA-DA-SILVA et al., 2006). Este método se assemelha a tradicional pesca de espinhel para peixes e é composta por uma linha principal, na qual se prendem, em intervalos regulares, linhas secundárias que possuem em suas extremidades potes ao invés de anzóis. Dentro de cada pote é colocado cimento para que sirva de lastro quando submerso. O número de potes e o tempo de permanência na água são variáveis. Esta arte de pesca utiliza a estratégia do animal em procurar refúgio no pote para se proteger, sendo considerada de baixo impacto sobre o fundo oceânico (ÁVILA-DA-SILVA et al., 2014).

Após a implementação da técnica de pesca de espinhel com potes, de alta produtividade e voltada em grande parte para exportação, observou-se um aumento da captura do polvo sem precedentes (ÁVILA-DA-SILVA et al., 2006). Em Santa Catarina, as primeiras viagens de embarcações com espinhéis de potes para polvos foram registradas em 2005 (ÁVILA-DA-SILVA et al., 2014). As capturas do polvo *Octopus vulgaris* compõem quase a totalidade da produção da frota comercial no Sudeste-Sul brasileiro, entretanto, outras espécies da família Octopodidae também são capturadas (ÁVILA-DA-SILVA et al., 2014). A captura de polvos na região Sudeste-Sul é maior quando comparada ao Nordeste, porém, proveem quase que exclusivamente da pesca industrial (ÁVILA-DA-SILVA et al., 2014).

Segundo HAIMOVICI et al. (2014), no Nordeste, a pesca de polvo ocorre principalmente nos estados da Bahia, Ceará e Rio Grande do Norte e é mais diversificada, envolvendo mais modalidades de pesca e um número maior de pescadores, sendo *Octopus insularis* a espécie que corresponde à maior parte das capturas. Estes autores descrevem, além da pesca de espinhel de potes, outras duas modalidades de pesca

praticadas na região: coleta dos polvos sobre recifes rasos e mergulho próximo a estes, sem o uso de embarcações, para consumo próprio e complementação de renda, e pesca de mergulho de pequena escala, realizada com pequenas embarcações a vela ou motorizadas, frequentemente para complementar a pesca da lagosta.

### 1.3 Espécies com potencial de cultivo

*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 (Figura 2 A) é uma das espécies mais importantes no que diz respeito à captura e valor comercial (VAZ-PIRES et al., 2004). Ocorre em águas tropicais, subtropicais e temperadas do Oceano Atlântico ao Mar Mediterrâneo (MANGOLD, 1997). No Brasil, ocorre ao longo de toda a costa e é a espécie de polvo mais explorada nas regiões Sudeste e Sul (ÁVILA-DA-SILVA et al., 2014), sendo raramente pescada em ambientes rasos do Nordeste (HAIMOVICI et al., 2014). Habita desde a costa até a plataforma continental, alcançando 200 m de profundidade (RODRÍGUEZ et al., 2006), em temperaturas que variam de 7 a 32°C e salinidade entre 32 e 40 (GUERRA, 1992). É comum em águas rasas, recifes de coral ou rochas, onde sua predominância depende da abundância de alimentos e abrigos (MANGOLD, 1983).

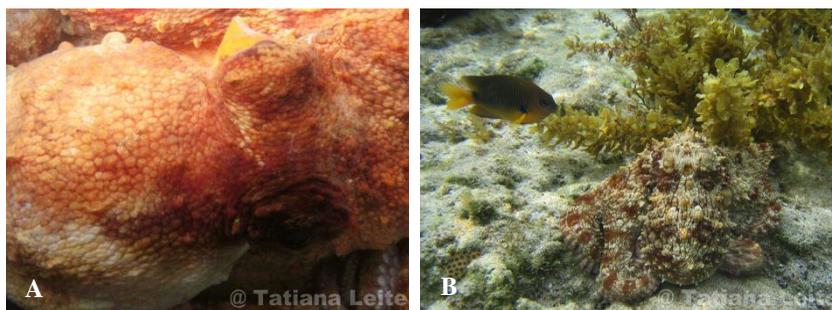
*Octopus vulgaris* tem sido alvo de diversos estudos relacionados aos aspectos biológicos e de cultivo, em razão do elevado valor de mercado e do grande potencial que representa como espécie alternativa para a aquicultura (MAZÓN et al., 2007). É uma das espécies promissoras para o cultivo por uma série de fatores como alta taxa de conversão alimentar, com capacidade de incorporar de 40 a 60% do alimento ingerido (WELLS, 1978; MANGOLD, 1983); rápido crescimento, atingindo taxas de crescimento diário entre 3 a 10% (LEE et al., 1998; DOMINGUEZ et al., 2002), com ganhos de 0,5 a 1,0 kg/mês (GARCÍA-GARCÍA; AGUADO GIMÉNEZ, 2002); alto conteúdo proteico, aproximadamente 70 a 90% do peso seco da composição corporal (O'DOR; WELLS, 1987; LEE, 1994); alta fecundidade, podendo produzir de 100 a 500 mil ovos por fêmea (WELLS, 1978; MANGOLD, 1983; IGLESIAS et al., 2000) e fácil adaptação e manutenção em cativeiro (VAZ-PIRES et al., 2004; RODRÍGUEZ et al., 2006). Além destas características, apresenta ciclo de vida curto, em torno de 12 a 18 meses e aceita alimentos de baixo valor comercial (IGLESIAS et al., 2000).

*Octopus insularis* Leite e Haimovici, 2008 (Figura 2 B), havia sido anteriormente identificada como *O. vulgaris*, entretanto, verificou-se a presença de diferenças morfológicas e genéticas de espécimes

coletados no Nordeste do Brasil em relação a *O. vulgaris* provenientes do Mediterrâneo e do Sul do Brasil, confirmando a presença desta nova espécie (LEITE et al., 2008). Devido à sua proximidade com *O. vulgaris*, esta espécie possivelmente também possua potencial para o cultivo.

É uma espécie bentônica costeira de águas rasas cuja distribuição conhecida até a presente data abrange o Nordeste e Norte do Brasil, incluindo todas as ilhas oceânicas brasileiras (LEITE et al., 2008), sendo considerada a principal espécie alvo da pesca nestas regiões (HAIMOVICI et al., 2014). Ocupa fundos duros como recifes, rochas, cascalho e platô biogênico composto por cascalho, areia, esponjas e algas (HAIMOVICI et al., 2014). Possui tamanho médio a grande, com manto e cabeça largos e braços relativamente pequenos e grossos, com tamanho de 3 a 5 vezes o comprimento do manto e é mais robusta quando comparada com *O. vulgaris* (LEITE et al., 2008).

**Figura 2:** A. *Octopus vulgaris*; B. *Octopus insularis*. Figuras gentilmente cedidas por Tatiana Leite.



#### 1.4 Cultivo de polvos

Os cefalópodes vêm sendo utilizados como organismos modelo para pesquisas nas áreas de neurociência, fisiologia e etologia, por isso são frequentemente mantidos sob condições de laboratório ou aquários (BOLETZKY; HANLON, 1983). O cultivo de cefalópodes também tem sido realizado com fins ornamentais, principalmente polvos e sépias, devido ao rápido crescimento global desta indústria (VIDAL et al., 2014) e por estarem entre os animais mais carismáticos em aquários (VILLANUEVA et al., 2014). Além disso, os polvos são considerados um dos grupos de invertebrados marinhos mais atraentes para a aquicultura (VIDAL et al., 2014) por apresentarem rápido crescimento

combinado às altas taxas de conversão alimentar e por possuírem altas fontes proteicas e grande aproveitamento, sendo 80 a 85% do peso corporal total aproveitável para consumo humano (LEE, 1994).

O cultivo de cefalópodes em pequena escala é atualmente possível para algumas espécies como *Sepioteuthis lessoniana*, *Sepia officinalis*, *O. maya* e *O. vulgaris* (somente crescimento de subadultos em gaiolas), sendo essas espécies consideradas como modelos de cultivo ao redor do mundo e candidatas preferenciais para a aquicultura (VIDAL et al., 2014). Segundo VILLANUEVA et al. (2014), estas espécies foram as mais amplamente estudadas nas últimas décadas e, conseqüentemente, as que acumularam maior literatura científica. Estes autores destacam que os maiores desafios enfrentados atualmente para o desenvolvimento dos cultivos são o controle da reprodução e o desenvolvimento de uma dieta artificial sustentável.

O cultivo de polvos encontra-se em fase de desenvolvimento e, nas últimas décadas, diversas tentativas foram realizadas visando conhecer as técnicas para a produção em larga escala, entretanto, o cultivo desde a fase de ovo até subadulto tem sido realizado com sucesso somente em escala experimental (IGLESIAS et al., 2000). Com exceção de *O. maya* que tem sido cultivado em laboratório, inclusive por várias gerações consecutivas (HANLON; FORSYTHE, 1985), o cultivo de polvos é restrito à engorda de subadultos capturados na pesca (MAZÓN et al., 2007). Na Espanha, o cultivo de *O. vulgaris* é baseado na engorda de subadultos capturados no ambiente, mantidos em tanques ou em gaiolas flutuantes e alimentados com peixes, crustáceos e moluscos, provenientes da fauna acompanhante da pesca, até atingirem o peso comercial (GARCÍA-GARCÍA; VALVERDE, 2006). No Brasil, um estudo foi conduzido com a engorda de polvos subadultos em gaiolas flutuantes leves, econômicas e de fácil manejo, demonstrando o potencial desta atividade para a diversificação da malacocultura (TEIXEIRA et al., 2014).

### **1.5 Alguns aspectos éticos na manipulação de cefalópodes**

A ética e o bem estar na manipulação de cefalópodes é um tema que tem recebido considerável atenção nos últimos anos, sendo esta classe de animais recentemente incluída na legislação de bem estar na União Europeia juntamente com os vertebrados [“Directive 2010/63/EU” (EU, 2010)]. Procedimentos éticos que levem em consideração a possibilidade destes animais em presenciarem situações de dor e sofrimento devem ser implementados. Desta maneira, em situações de manutenção de cefalópodes para pesquisa ou em locais

públicos, é necessário promover boas práticas de bem estar animal. Assim, sugere-se a utilização da política dos 3 R's: "*reduction*" (redução do número de animais em experimentos, por exemplo), "*refinement*" (ou seja, utilizando espécies para as quais os detalhes de manejo e alimentação são bem conhecidos e controláveis, reduzindo as chances de sofrimento e morte dos animais) e "*replacement*" (pela substituição de cultivo de células apropriadas ou modelos de computador, sempre que possível) (*vide* revisões MOLTSCHANIWSKYJ et al., 2007; VIDAL et al., 2014).

No cultivo em laboratório, o manejo dos animais é utilizado com frequência em procedimentos como transporte, medição e/ou pesagem, classificação e marcação, extração de hemolinfa, entre outros. Nestes procedimentos, os anestésicos são geralmente utilizados a fim de facilitar o manejo, prevenir lesões, reduzir o estresse e promover o bem-estar dos animais. Os anestésicos mais comumente utilizados em cefalópodes são uretano, etanol, cloreto de magnésio e água fria (*vide* revisão de GLEADALL, 2013 a). A utilização do uretano (MESSENGER, 1968; ANDREWS; TANSEY, 1981) reduziu desde que foi considerado cancerígeno.

O etanol tem sido utilizado em concentrações de 1,5 a 3% diluído em água do mar com sucesso na anestesia de diversos cefalópodes (*vide* revisão de GLEADALL, 2013 a). Entretanto, alguns autores relataram reações adversas após a imersão inicial, como, por exemplo, tentativas de sair do tanque e liberação de tinta (FROESCH; MARTHY 1975; ANDREWS; TANSEY, 1981). Além disso, indução inadequada (incompleta) pode ocorrer em temperaturas baixas (GLEADALL, 2013 a), devido à redução do efeito narcotizante do etanol (MOORE et al., 1964). O cloreto de magnésio, assim como o etanol, é um anestésico de baixo custo e de fácil acesso e manipulação. Em cefalópodes, foi utilizado com sucesso em diversas espécies de diferentes sexos, idades e tamanhos (MESSENGER et al., 1985; GORE et al., 2005; SCIMECA, 2011) inclusive em anestesia de longa duração (MOONEY et al., 2010). A hipotermia, por sua vez, possui a vantagem de evitar o uso de drogas químicas e seus potenciais efeitos (GLEADALL, 2013 b), em contrapartida, pode ser difícil a manutenção da água na temperatura desejada, além dos animais apresentarem condição mais rígida do corpo dificultando operações cirúrgicas (ANDREWS; TANSEY, 1981). Alguns autores relataram que a água fria não produz anestesia adequada (GLEADALL, 2013 a) e questionaram sua utilização em procedimentos potencialmente dolorosos (WEST et al., 2007).

## 1.6 Agentes patogênicos

Estudos sobre parasitologia de cefalópodes são escassos. Revisões sobre os principais agentes patogênicos em cefalópodes foram publicadas na década de 90 (HANLON; FORSYTHE, 1990 a, b; HOCHBERG, 1990), entretanto, poucos dados foram publicados nas últimas duas décadas (CASTELLANOS-MARTÍNEZ; GESTAL, 2013). Os principais agentes patogênicos descritos na literatura são vírus, bactérias Gram-negativas do gênero *Vibrio*, fungos e parasitos.

### 1.6.1 Vírus

Estudos recentes foram conduzidos por RODRÍGUEZ-CANUL et al. (2012) em *O. maya* a fim de determinar a presença do vírus da mancha branca (WSSV), já que estes animais se alimentam de crustáceos, podendo, portanto agir como vetores do vírus. Embora *O. maya* selvagens não apresentem nenhum sinal de infecção, os autores infectaram experimentalmente 10 polvos via oral com camarões *Litopenaeus vannamei* positivos para o vírus e observaram que sete polvos contraíram o vírus quatro semanas após a infecção, demonstrando a possibilidade de *O. maya* servir como hospedeiro paratênico para o vírus.

### 1.6.2 Bactérias

Infecções causadas por *Vibrio* spp. tem sido descritas em várias espécies de cefalópodes (FORD et al., 1986; REIMSCHUESSEL et al., 1990; FARTO et al., 2003; SANGSTER; SMOLOWITZ, 2003; HARMS et al., 2006; SCIMECA, 2011). São detectadas principalmente na epiderme e/ou manto causando ulcerações e, em casos mais severos, os sistemas circulatório e reprodutivo podem ser afetados levando à morte em poucos dias (SANGSTER; SMOLOWITZ, 2003).

Estas bactérias são comuns em águas costeiras e têm sido detectadas em níveis mais elevados na parede dos tanques dos cultivos (ELSTON; LOCKWOOD, 1983; SANGSTER; SMOLOWITZ, 2003) quando comparado a condições naturais (FORD et al., 1986). Este fato reforça a possibilidade de ocorrência de infecções secundárias a ulcerações, especialmente se a injúria for causada por colisões no ambiente de cultivo (SANGSTER; SMOLOWITZ, 2003; HARMS et al., 2006). A utilização de boas práticas de manejo pode reduzir o estresse e evitar o aparecimento de injúrias, reduzindo possíveis infecções bacterianas.

### 1.6.3 Fungos

Registros de infecções causadas por fungos são raros em cefalópodes. *Cladosporium* sp. foi observado em uma espécie não identificada de polvo (SCIMECA, 2011) e em uma fêmea de *S. officinalis*, com infecção bacteriana local ocasionando ulceração (HARMS et al., 2006). Similarmente às infecções bacterianas, as infecções fúngicas em cefalópodes são infecções secundárias que ocorrem como resultado de um trauma ou pelo comprometimento do sistema imune (HARMS et al., 2006).

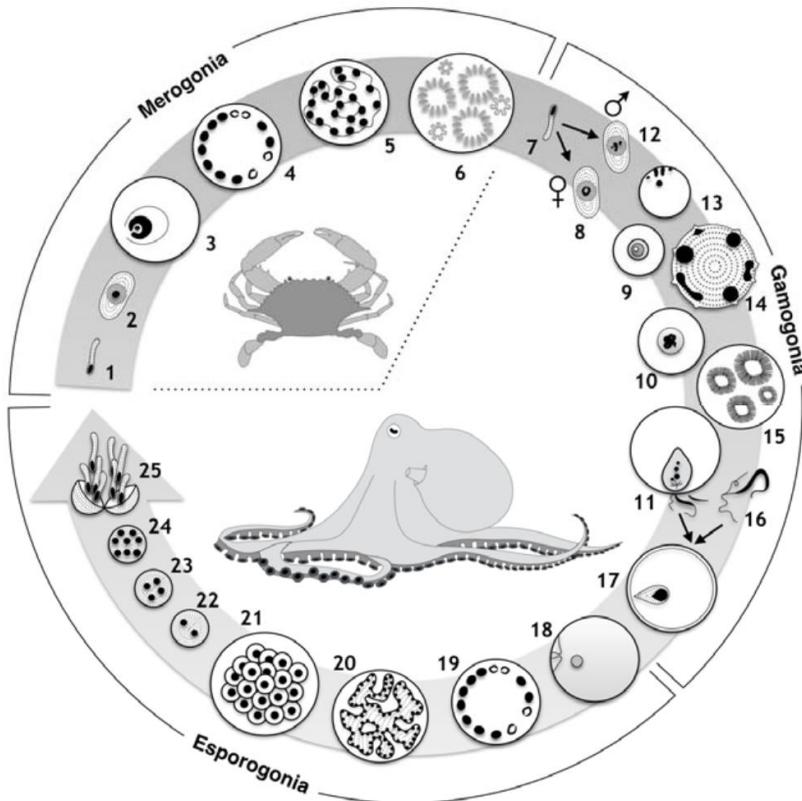
### 1.6.4 Parasitos

Os cefalópodes têm papel importante na transmissão de parasitos, uma vez que podem ser hospedeiros primários para protozoários, Dicyemida e crustáceos, bem como segundo ou terceiro hospedeiro intermediário para digenéticos, cestoides, acantocéfalos e nematoides (HOCHBERG, 1990). Algo em torno de 150 espécies de parasitos protozoários e metazoários estão relacionadas a um total de 650 espécies de cefalópodes (HOCHBERG, 1990), entretanto, esse número pode ser bem maior.

Os parasitos mais frequentemente observados em cefalópodes são os coccídeos do gênero *Aggregata* (Protozoa: Apicomplexa), parasitos intracelulares transmitidos por meio da cadeia alimentar, comumente relatados em várias espécies de cefalópodes mundialmente distribuídas (HOCHBERG, 1990). Atualmente, 10 espécies de *Aggregata* foram descritas infectando lulas, sépias e polvos, sendo descrito inclusive em uma espécie de polvo de águas profundas (CASTELLANOS-MARTÍNEZ; GESTAL, 2013).

*Aggregata* spp. têm ciclo de vida heteroxeno, com um crustáceo como hospedeiro intermediário para o desenvolvimento do estágio assexual do parasito (merogonia), enquanto os cefalópodes são os hospedeiros definitivos, nos quais ocorrem os estágios sexuais do parasito (gamogonia e esporogonia) (HOCHBERG, 1990) (Figura 3). Os estágios assexuais infectam o trato digestório de crustáceos (HOCHBERG, 1990) e os estágios sexuais são encontrados no trato digestório de cefalópodes, principalmente o ceco, sendo que, em infecções mais severas, podem infectar brânquias e musculatura do manto (PASCUAL et al., 1996; MLADINEO; BOCINA, 2007).

**Figura 3:** Ciclo de vida de *Aggregata* sp. A etapa de merogonia ocorre em um crustáceo decápode (hospedeiro intermediário) e as etapas de gamogonia e esporogonia ocorrem no polvo (hospedeiro definitivo). 1. Esporozoítio; 2-6. Desenvolvimento do merozoítio; 7. Merozoítio; 8-10. Desenvolvimento do macrogameta; 11. Macrogameta no momento da fertilização; 12-15. Desenvolvimento do microgameta; 16. Microgameta; 17. Zigoto; 18-20. Desenvolvimento do oocisto; 21. Oocisto contendo os esporocistos em desenvolvimento; 22-24. Desenvolvimento dos esporocistos; 25. Esporocistos contendo os esporozoítios (Adaptado de HOCHBERG,1990).



Infecções severas por *Aggregata octopiana* e *Aggregata eberthi* tem sido observadas nos tratos digestórios de *O. vulgaris* e *S. officinalis*, respectivamente, selvagens e cultivados em águas europeias (PASCUAL et al., 1996; GESTAL et al., 2002 a, b). GESTAL et al. (2002 a) observaram diversos efeitos histopatológicos decorrentes da infecção por *A. octopiana* no trato digestório de *O. vulgaris*, como hipertrofia celular com deslocamento nuclear, inflamação, fagocitose, ulceração e destruição parcial dos órgãos. Em polvos senescentes, PASCUAL et al. (2010) observaram predominância do parasito em estágio de esporogonia infectando amplamente os tecidos, fato que pode estar relacionado com a liberação de formas infectantes maduras para garantir a conclusão do ciclo de vida do parasito. Além disso, os autores observaram pouca infiltração de hemócitos ou reações fibróticas nos locais de infecção, demonstrando que o sistema imunológico nesta etapa da vida pode estar comprometido.

A coccidiose, doença causada por *Aggregata* spp., pode afetar negativamente as funções gastrointestinais causando diminuição ou mau funcionamento das enzimas de absorção, fenômeno conhecido como síndrome da má absorção (GESTAL et al., 2002 b). Apesar da coccidiose não ser a principal causa de morte, é provável que a síndrome da má absorção prejudique o desenvolvimento e crescimento dos animais (GESTAL et al., 2002 b).

Além de *Aggregata*, outros parasitos têm sido relatados em cefalópodes: outros protozoários e metazoários como Dicyemida, Monogenea, metacercárias e digenéticos adultos, cestoides, acantocéfalos, nematoides e crustáceos (OVERSTREET; HOCHBERG, 1975; HANLON; FORSYTHE, 1990 a, b; PASCUAL et al., 1996; GONZÁLEZ et al., 2003). Até a presente data, estes parasitos não parecem causar maiores problemas aos cefalópodes, entretanto, em condições de cultivo, pode ocorrer a sua proliferação, levando a infecções severas e prejuízos econômicos.

### **1.7 Sistema imune de cefalópodes**

Os cefalópodes constituem um grupo avançado de moluscos com sistema circulatório “fechado” bem desenvolvido, constituído por um coração sistêmico e dois corações acessórios (corações branquiais) que distribuem a hemolinfa por meio de artérias e capilares para todo o corpo, além da presença de um órgão hematopoiético, o corpo branco (FORD, 1992). A hemolinfa de cefalópodes é composta por uma fração líquida, constituída pelo plasma, rico em hemocianina e que contém diferentes fatores humorais, e por uma fração celular, constituída pelas

células circulantes ou hemócitos. O pigmento respiratório hemocianina é a proteína mais abundante na hemolinfa, podendo representar até 98% do total de proteínas hemolinfáticas (MALHAM et al., 1998 a). Os hemócitos, por sua vez, estão envolvidos em várias funções como reparação de tecidos, digestão de nutrientes, transporte e excreção (FORD, 1992).

Como em outros invertebrados, o sistema imune de cefalópodes conta com fatores celulares e humorais, que agem juntos na eliminação de micro-organismos invasores. Os fatores celulares são realizados pelos hemócitos que respondem pela fagocitose, formação de cápsulas e nódulos, infiltração ou atividades citotóxicas, isolamento e destruição de patógenos, enquanto as moléculas dissolvidas no plasma (lectinas, aglutininas e lisozimas) são importantes componentes da resposta humoral (FORD, 1992).

Em moluscos bivalves podem-se diferenciar dois tipos de hemócitos: os granulares ou granulócitos, que se caracterizam pela presença de abundantes grânulos citoplasmáticos e parecem ser as células imunologicamente mais reativas e os hemócitos hialinos ou hialinócitos, desprovidos ou com número muito reduzido de grânulos (VARGAS-ALBORES; BARRACCO, 2001). Até recentemente, apenas um tipo de hemócito havia sido identificado em cefalópodes (MALHAM et al., 1998 a; RODRÍGUEZ-DOMÍNGUEZ et al., 2006). Entretanto, CASTELLANOS-MARTÍNEZ et al. (2014) revelaram a existência de duas populações de hemócitos em *O. vulgaris*. Estes autores identificaram uma população predominante, os granulócitos grandes, com núcleo excêntrico em forma de U e citoplasma abundante com grânulos basofílicos e um segundo tipo de hemócitos, os granulócitos pequenos, redondos ou ovais, com núcleo acompanhando o formato da célula, ocupando quase sua totalidade, e citoplasma escasso contendo grânulos em pequeno número ou totalmente ausentes.

Em moluscos, os hemócitos tem papel importante na defesa interna pelo reconhecimento e eliminação de material não-próprio, bem como reparo da concha e de ferimentos (CHENG, 1975). O reparo de ferimentos envolve migração e agregação de hemócitos no local da injúria para prevenir o extravasamento de hemolinfa, até que as células epiteliais cresçam sobre o ferimento para completar a cicatrização (CHU, 2000). Em cefalópodes, os hemócitos são capazes de formar um agregado que é acompanhado por vasoconstrição e síntese de colágeno para ajudar a reparar a lesão (FÉRAL, 1988).

A fagocitose de agentes microbianos e material não-próprio é um importante mecanismo e constitui a primeira linha de defesa de

invertebrados (BARRACCO et al., 2008). Em cefalópodes, a atividade fagocítica foi verificada em hemócitos de *Eledone cirrhosa* imunoestimulados com *Vibrio anguillarum* (MALHAM et al., 1997) e em hemócitos de *O. vulgaris* imunoestimulados com zymosan (NOVOA et al., 2002; RODRÍGUEZ-DOMÍNGUEZ et al., 2006; CASTELLANOS-MARTÍNEZ et al., 2014). CASTELLANOS-MARTÍNEZ et al. (2014) observaram diferença na habilidade de fagocitose pelos dois tipos de hemócitos identificados em *O. vulgaris*, sendo que os granulócitos grandes apresentaram maior atividade fagocítica.

Quando a quantidade de micro-organismos invasores é maciça ou quando as partículas ou patógenos são de grande tamanho e a fagocitose não é possível, ocorre a formação de nódulos e cápsulas, respectivamente (BARRACCO et al., 2008). Em cefalópodes a formação de cápsulas foi observada em infecções causadas por helmintos e nematoides devido ao seu grande tamanho mesmo em formas larvais (SARDELLA et al., 2000) e em polvos infectados por *Aggregata* spp. (GESTAL et al., 2002 a).

Alterações no número, morfologia ou viabilidade dos hemócitos podem ser usados como indicadores da saúde (ELLIS et al., 2011), visto que variações podem ocorrer em animais parasitados ou expostos a algum tipo de estresse. MALHAM et al. (1998 a) realizaram sucessivas coletas de hemolinfa de *E. cirrhosa* (0, 2 e 4 horas) e observaram aumento significativo no número de hemócitos 2 horas após a primeira coleta, decaindo após 4 horas. Variações no número de hemócitos foram observadas em *E. cirrhosa* expostos ao ar por 5 minutos (MALHAM et al., 2002). Em *O. vulgaris*, aumento significativo na quantidade de hemócitos circulantes foi observado 4 horas após a infecção com lipopolissacarídeos de *Escherichia coli* quando comparados aos animais injetados com solução salina tamponada com fosfato (PBS) (LOCATELLO et al., 2013).

Durante as reações imune-celulares ocorre a produção e liberação de moléculas altamente tóxicas que auxiliam na morte e degradação do agente invasor, ocasionando aumento do consumo intracelular de oxigênio, chamado de *burst* respiratório, que resulta na produção de uma variedade de espécies intermediárias altamente reativas de oxigênio (ROIs) e de nitrogênio (RNIs) (BARRACCO et al., 2008). A produção de ROIs *in vitro* já foi relatada em hemócitos de *E. cirrhosa* imunoestimulados com *V. anguillarum* (MALHAM et al., 2002). NOVOA et al., (2002) observaram produção de ROIs e RNIs em hemócitos circulantes e células do corpo branco de *O. vulgaris* imunoestimulados com zymosan, demonstrando a capacidade de ambas

as células em reagir contra o agente estranho, como também observado em hemócitos de *O. vulgaris* imunoestimulados com zymosan (CASTELLANOS-MARTÍNEZ et al., 2014).

Os fatores humorais complementam a atividade celular. Dentre estes fatores destacam-se as lectinas, proteínas sem atividade catalítica, com capacidade de se ligar especificamente a carboidratos da superfície de diferentes células, incluindo micro-organismos, causando sua aglutinação (BARRACCO et al., 2008). A presença de uma lectina com especificidade à lactose foi descrita em *O. vulgaris* (RÖGENER et al., 1985). Em *O. maya*, ALPUCHE et al. (2010) descreveram uma lectina (OmA) homóloga à hemocianina do tipo A de *Octopus dofleini*, com especificidade à galactosamina, manose e fucose. Estes autores relataram elevada atividade hemaglutinante desta lectina na presença de eritrócitos e sugeriram ter um papel na resposta imune pelo reconhecimento e aglutinação de oligossacarídeos.

A lisozima é uma enzima liberada durante o processo de fagocitose capaz de romper polissacarídeos complexos ou peptidoglicanas das paredes bacterianas (BARRACCO et al., 2008). Maior atividade de lisozima foi observada nos hemócitos, na hemolinfa e em vários tecidos de polvos *E. cirrhosa* infectados com *V. anguillarum* quando comparado a animais não infectados (MALHAM et al., 1998 b). Similarmente, LOCATELLO et al. (2013) observaram maior atividade desta enzima no plasma de *O. vulgaris* após injeção de lipopolissacarídeos de *E. coli* em relação a animais injetados com PBS. A atividade de lisozima também foi detectada no tegumento e em órgãos do sistema circulatório de *S. officinalis* (LE PABIC et al., 2014).

Dentre as respostas humorais, um dos mais efetivos mecanismos imunes de invertebrados contra agentes estranhos é a ativação do sistema pró-fenoxidase. A ativação da forma inativa (proPO) para a enzima ativa (PO) ocorre pela ação de serino-proteases, iniciando uma cascata proteolítica cujo produto final é a melanina (BARRACCO et al., 2008). Em cefalópodes, a PO foi caracterizada no saco de tinta de *Illex argentinus* (NARAOKA et al., 2003) e *Octopus ocellatus* (FAN et al., 2009). Em embriões de *S. officinalis* no final da organogênese foi detectada a atividade de PO, sugerindo seu papel no sistema imune destes animais (LACOU-LABARTHE et al., 2009). Corroborando estes resultados, LE PABIC et al. (2014) observaram altas atividades de PO no tegumento, bem como nos órgãos dos sistemas respiratório e circulatório de *S. officinalis* nas formas zimogênica e ativa. Estes autores também relataram altas atividades de PO na glândula digestiva e seus apêndices e sugeriram que este órgão pode servir como reservatório de

proPO, entretanto, sugerem futuras investigações para definir o real papel da PO neste órgão, levando em consideração a detoxificação e metabolismo de hemocianina.

### **1.8 Conclusões e perspectivas**

Como já mencionado anteriormente, estudos hemato-imunológicos e parasitológicos em cefalópodes com potencial para cultivo, tanto com fins ornamentais ou aquicultura, são de fundamental importância devido ao crescente interesse por estes animais. Com o aumento dos cultivos, ocorre conseqüentemente um incremento na incidência de patologias causadas por bactérias e/ou parasitos, o que pode tornar-se um fator limitante e ameaçar a sustentabilidade dos cultivos. O conhecimento das doenças e agentes patogênicos e dos mecanismos de defesa em cefalópodes e o entendimento destas relações é vital para a manutenção e sucesso dos cultivos e para o diagnóstico e desenvolvimento de tratamentos específicos.

Vários aspectos do sistema imune deste grupo complexo de animais precisam ser investigados, como, por exemplo, a identificação de proteínas de reconhecimento padrão e peptídeos antimicrobianos, bem como as reações imune-celulares, os mecanismos líticos e degradativos e o sistema proPO. Estudos futuros relativos à infecção experimental com patógenos e resposta inflamatória frente a diferentes flogógenos normalmente utilizados em vertebrados merecem ser realizados para compreensão da cinética da resposta inflamatória dos hemócitos. Outra linha de pesquisa promissora é o estudo de substâncias imunoestimulantes em espécies consideradas prioritárias para a aquicultura, a fim de conferir uma maior imunocompetência em cefalópodes de interesse econômico.



## 2. ESPÉCIE DE ESTUDO: *Octopus maya*

### 2.1 Classificação taxonômica

Filo: Mollusca

Classe: Cephalopoda

Subclasse: Coleoidea

Superordem: Octobrachia

Ordem: Octopoda

Subordem: Incirrina

Família: Octopodidae

Subfamília: Octopodinae

Gênero: *Octopus*

Espécie: *Octopus maya* (Voss e Solís-Ramirez, 1966)

(ITIS, 2016)

### 2.2 Distribuição geográfica

*Octopus maya* é uma espécie endêmica da Península de Yucatán, México, e ocorre nos estados de Campeche, Yucatán e Quintana Roo, desde Ciudad del Carmen até Isla Mujeres (VOSS; SOLÍS-RAMÍREZ, 1966; ROSAS et al., 2014) (Figura 4). Habita águas rasas da plataforma continental, em profundidades que variam de 0-50 m (JEREB et al., 2014) e ocupa fundos lodosos ou calcários compostos por recifes, vegetação marinha constituída principalmente por *Thalassia testudinum*, conchas vazias de moluscos gastrópodes (*Strombus gigas*, *S. costatus* e *Pleuroploca gigantea*) e covas onde possam desovar e esconder-se de predadores (SOLÍS-RAMÍREZ, 1967).

### 2.3 Características gerais

*Octopus maya* é uma espécie grande e robusta, com braços longos, 3 a 4,5 vezes o comprimento do manto, podendo atingir comprimento e peso total de 130 cm e 5 kg, respectivamente (JEREB et al., 2014). Uma de suas características marcantes é a presença de ocelos, visíveis como uma mancha escura com uma mancha central clara (JEREB et al., 2014) dos lados esquerdo e direito entre o segundo e terceiro braços, abaixo dos olhos (Figura 5).

**Figura 4:** Distribuição geográfica de *Octopus maya*.



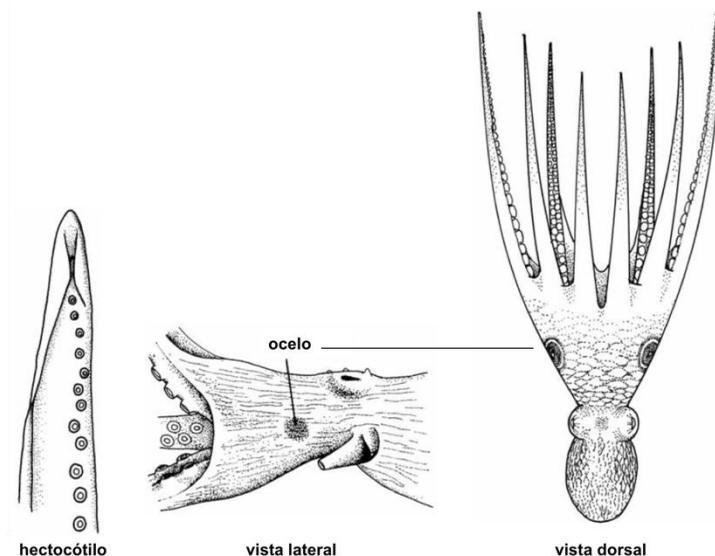
O ciclo de vida de *O. maya* é de 8 a 12 meses (HANLON; FORSYTHE, 1985). Estima-se que o pareamento ocorre a partir de setembro a outubro, meses em que frequentemente são encontradas fêmeas completamente maduras; entre novembro e dezembro se observam massas de ovos recém depositadas e, inclusive, fêmeas incubando; em dezembro pode-se observar duas regiões distintas em cada ovo, o embrião e o saco vitelínico, e em janeiro é frequente encontrar ovos recém eclodidos; por fim, em fevereiro esta situação se torna mais evidente, terminando assim o período normal reprodutivo da espécie (SOLÍS-RAMÍREZ, 1967).

A reprodução ocorre perto da costa onde cada fêmea geralmente deposita entre 1.500 e 2.000 ovos (SOLÍS-RAMÍREZ, 1967). Durante a cópula, como ocorre em outros octópodes, os machos inserem o hectocótilo na cavidade do manto da fêmea, através do qual transferem os espermatóforos para o oviduto (BOYLE; RODHOUSE, 2005). O esperma pode ser armazenado pela fêmea durante vários meses até a fecundação (ROCHA, 2003). Após a desova, as fêmeas de *O. maya* se dedicam exclusivamente ao cuidado e proteção dos ovos até sua eclosão, que ocorre entre 50 a 60 dias (ROSAS et al., 2014).

Possuem desenvolvimento direto e os ovos estão entre os maiores dentre as espécies de polvo, podendo atingir 17 mm de comprimento (VOSS; SOLÍS-RAMIREZ, 1966), que produzem juvenis de 6-7 mm de comprimento de manto (ROPER et al., 1984). Os animais apresentam hábito bentônico imediatamente após a eclosão. Nos primeiros meses de vida, em ambiente natural, se alimentam de presas vivas e sua dieta está

composta principalmente por zooplâncton, que inclui diversas espécies de isópodos, anfípodos e outras larvas de crustáceos (VAN HEUKELEN, 1977). A dieta dos adultos inclui siris (*Menippe mercenaria*), gastrópodes (*Nerita* sp.) e peixes. Dentre seus principais predadores destacam-se as garoupas (Serranidae) e as cavalas espanholas (Scombridae) (ROSAS et al., 2014).

**Figura 5:** *Octopus maya* (Adaptado de JEREB et al., 2014).



## 2.4 Captura

A pesca de *O. maya* é uma das mais importantes na região, gerando cerca de 15.000 empregos e mais de 27 milhões de dólares anuais (JURADO-MOLINA, 2010). A produção anual varia entre 10.000 e 20.000 toneladas, sendo que cerca de 70% deste total é exportado para a Europa e Ásia (ROSAS et al., 2014). Apesar da abundância deste recurso na Península de Yucatán, o aumento da pesca tem provocado uma diminuição das populações de maneira generalizada, o que pode provocar uma sobre exploração (CHÁVEZ, 1994; SOLÍS-RAMÍREZ, 1994).

A pesca de *O. maya* e de *O. vulgaris* no México é regulamentada pela legislação mexicana (NORMA Oficial Mexicana 008-PESC-1993 e 009-PESC-1993) que estabelece o tamanho mínimo de captura (110 mm de comprimento de manto), uma quota anual de pesca para cada espécie (que varia a cada ano) e a época de defeso nos estados de Campeche, Yucatán e Quintana Roo (16 de dezembro a 31 de julho de cada ano) (CONAPESCA, 2015).

A captura é realizada por pesca de “gareteo”, método em que se utiliza uma pequena embarcação na qual são colocadas duas varas ou “jimbás” de bambu, uma na proa e outra na popa (Figura 6 A). Ao longo destas varas, se prendem linhas de pesca de nylon e, no outro extremo livre, um siri (*Menippe mercenaria*, *Callinectes ornatus* ou *Libinia emarginata*) como isca. Peças de chumbo são presas cerca de 20 cm do siri para assegurar que não flutue. A embarcação é deixada à deriva ou “al garete” de tal maneira que seja levada por ação do vento e das correntes, arrastando a isca ao fundo. Quando o siri é capturado pelo polvo, se observa uma certa tensão na linha, e o pescador imediatamente a recolhe e captura o polvo com as mãos (SOLÍS-RAMÍREZ; CHÁVEZ, 1985) (Figura 6 B).

**Figura 6:** **A.** Barcos de pesca de *Octopus maya* na costa de Sisal, Yucatán, México; **B.** Espécime de *Octopus maya* sendo capturado por pesca de “gareteo”.



## 2.5 Cultivo

*Octopus maya* tem sido cultivado no laboratório, inclusive por várias gerações consecutivas (SOLÍS-RAMIREZ, 1967; HANLON; FORSYTHE, 1985; VAN HEUKELEM, 1983). Apresenta crescimento rápido devido as suas elevadas taxas de ingestão e de conversão alimentar que variam entre 30 e 60% (HANLON; FORSYTHE, 1985), o

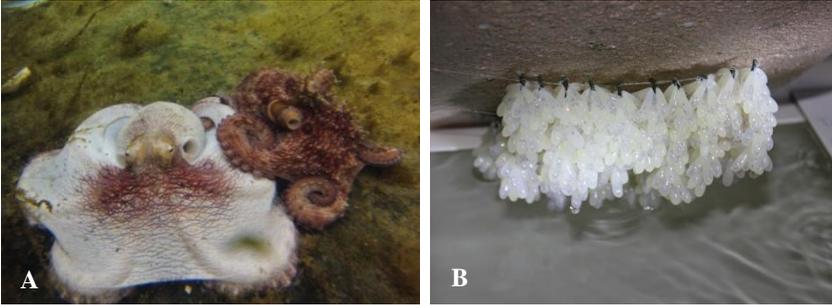
que lhes permite alcançar 1 kg em 4 meses e peso máximo em 9 meses quando cultivada a 25°C (VAN HEUKELEM, 1983). Aceita alimento morto ou preparado imediatamente após o nascimento e se adapta facilmente as condições de laboratório (ROSAS et al., 2007). Esta característica permite o uso de dietas preparadas em lugar das dietas vivas, reduzindo assim os custos de produção em 40 a 80% do custo inicial (HANLON et al., 1991).

Na *Universidad Nacional Autónoma de México* (UNAM), os primeiros estudos relacionados com o cultivo de *O. maya* começaram em 2004 (ROSAS et al., 2014). Entre 2006 e 2012, mais de 280 desovas foram realizadas a partir de fêmeas selvagens com peso médio de 815±16 g, das quais foram obtidos um total 250.000 ovos, que deram origem a juvenis recém eclodidos de 0.13± 0.001 g (N=553) (VIDAL et al., 2014).

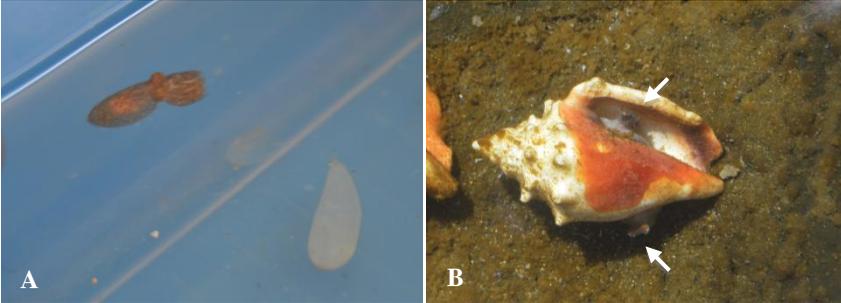
O cultivo de *O. maya* na UNAM ocorre a partir de animais coletados no ambiente, que são acondicionados em tanques externos de 12.000 L (Figura 7 A), em sistema de circulação contínua de água do mar, durante algumas semanas para que ocorra a cópula. Nestes tanques, machos e fêmeas são mantidos na proporção de 1:1 e alimentados duas vezes ao dia com siris congelados (*Callinectes* spp.). Tubos de PVC (4 polegadas de diâmetro) são utilizados nos tanques como refúgio, na proporção de pelo menos um tubo por animal. Após este período, as fêmeas são individualmente acondicionadas em tanques de 320 L, com fotoperíodo de 10:14 h luz vermelha-escuro, nos quais são adicionados tubos de PVC ou caixas específicas para oviposição, onde são mantidas até a desova. A desova completa dura aproximadamente 5 dias (*vide* revisões ROSAS et al., 2014; VIDAL et al., 2014).

Sob condições de laboratório, os ovos fertilizados são incubados artificialmente (Figura 7 B) e eclodem após 45-50 dias a 24±1°C (VIDAL et al., 2014). As crias recém-eclodidas (Figura 8 A) possuem saco vitelínico interno que é usado como combustível durante o estágio pós-eclosão, por esta razão, os animais não se alimentam nos primeiros 5-7 dias (ROSAS et al., 2014). O crescimento de juvenis é realizado em tanques externos, nos quais são colocadas conchas de *Melongena corona bispinosa* como refúgios (Figura 8 B). Espécimes recém eclodidos e juvenis de *O. maya* são alimentados com dieta artificial semiúmida à base de lula e siri (ROSAS et al., 2008; ROSAS et al., 2012), fornecida em conchas de bivalves, duas vezes ao dia.

**Figura 7:** Cultivo de *Octopus maya* na *Universidad Nacional Autónoma de México* (UNAM, Unidad Académica Sisal), Sisal, Yucatán, México. **A.** Acondicionamento de espécimes selvagens de *Octopus maya* nas instalações da UNAM; **B.** Incubação artificial de ovos de *Octopus maya*.



**Figura 8:** Cultivo de *Octopus maya* na *Universidad Nacional Autónoma de México* (UNAM, Unidad Académica Sisal), Sisal, Yucatán, México. **A.** Espécime recém-eclodido de *Octopus maya*; **B.** Juvenis de *Octopus maya* (setas).



### 3. JUSTIFICATIVA

Os polvos *Octopus* spp. têm sido objeto de muitos estudos, principalmente nas áreas de reprodução, nutrição, pesca, cultivo entre outras (*vide* revisões HANLON; FORSYTHE, 1985; VAZ-PIRES et al., 2004; ROCHA, 2003; HAIMOVICI et al., 2014; ROSAS et al., 2014; VIDAL et al., 2014). Entretanto, estudos sobre parâmetros de hemolinfa fauna parasitária, e anestésicos são escassos (*vide* revisões FORD, 1992; HOCHBERG, 1990; CASTELLANOS-MARTÍNEZ; GESTAL, 2013; CASTELLANOS-MARTÍNEZ et al., 2014; GLEADALL, 2013a).

A determinação dos parâmetros de hemolinfa em cefalópodes selvagens e cultivados de diferentes idades, sexos e tamanhos é importante para o estabelecimento de valores de referência e identificação de situações adversas, permitindo aperfeiçoar o monitoramento dos animais em cultivo. Além disso, a identificação da fauna parasitária de animais selvagens pode auxiliar no conhecimento de possíveis parasitos que, em situações de cultivo, podem causar enfermidades, resultando em perdas diretas da produção e aumento dos custos operacionais, como já observado em cultivos de peixes.

Em laboratório, os anestésicos são comumente utilizados em situações de rotina com a finalidade de facilitar o manejo, prevenir lesões, reduzir o estresse e promover o bem-estar dos animais. Diferentes espécies de cefalópodes podem reagir de maneira distinta a diferentes agentes anestésicos. Desta forma, estudos espécie-específicos são importantes para a determinação do anestésico ideal para cada espécie.

Como mencionado anteriormente, *O. maya* é uma espécie com grande potencial para a aquicultura, devido ao seu desenvolvimento direto, fácil adaptação em condições de cultivo e aceitação de alimento congelado ou dietas artificiais. Entretanto, até a presente data, poucos estudos relacionados a parâmetros de hemolinfa e fauna parasitária e nenhum estudo sobre anestésicos foram realizados para esta espécie. Estudos relacionados a estes temas em animais com potencial para o cultivo tornam-se essenciais diante do crescente potencial desta atividade nas últimas décadas.



## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

- Aumentar o conhecimento sobre anestésicos, fauna parasitária e parâmetros de hemolinfa em polvos *Octopus maya*.

### 4.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o estado de saúde de fêmeas de *O. maya* em diferentes tempos pós-desova;
- Analisar a fauna parasitária e determinar os índices parasitológicos em fêmeas de *O. maya* em diferentes tempos pós-desova;
- Avaliar o consumo de oxigênio, o comportamento e o crescimento de juvenis de *O. maya* expostos a diferentes agentes anestésicos e concentrações;
- Testar em adultos de *O. maya* as melhores concentrações de cada agente anestésico utilizado em juvenis;
- Avaliar se os anestésicos influenciam nos parâmetros de hemolinfa de *O. maya*.



## **5. FORMATAÇÃO DA TESE**

Esta Tese está dividida em cinco capítulos. O primeiro capítulo é referente a introdução geral e revisão de literatura. Os capítulos II, III, IV e V são referentes aos artigos científicos e estão formatados de acordo com as normas das revistas para as quais os artigos serão submetidos para publicação.



## CAPÍTULO II

### **Estado de saúde de fêmeas de *Octopus maya* (Cephalopoda: Octopodidae) pós-desova na Península de Yucatán, México**

Katina Roubedakis<sup>a\*</sup>, Cristina Pascual<sup>b</sup>, Carlos Rosas<sup>b</sup>, Maité Mascaró<sup>b</sup>, Maurício L. Martins<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Laboratório AQUOS – Sanidade de Organismos Aquáticos, Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Rod. Admar Gonzaga, 1346, 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil.*

<sup>b</sup>*Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación (UMDI), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Puerto de Abrigo s/n, Sisal, 97355, Hunucmá, Yucatán, México.*

\*Correspondência: Laboratório AQUOS – Sanidade de Organismos Aquáticos, Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Rod. Admar Gonzaga, 1346, 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil. *E-mail:* katina.roubedakis@gmail.com

#### **Highlights**

- Primeira descrição do estado de saúde de fêmeas de *O. maya* pós-desova.
- Avaliação de aspectos fisiológicos, metabólicos e imunológicos de *O. maya*.
- Fêmeas de *O. maya* são capazes de se adaptar e se manterem saudáveis até 40 dias pós-desova.

Artigo redigido de acordo com as normas da Revista **Fish and Shellfish Immunology** (Qualis A1, Fator de impacto: 2,674).



## RESUMO

Após a desova, fêmeas de octópodes (subordem Incirrina) geralmente param de se alimentar e apresentam cuidado materno dos ovos até sua eclosão, entretanto, pouca informação sobre a condição geral das fêmeas durante e após este período está disponível na literatura. Este estudo teve como objetivo avaliar o estado de saúde de fêmeas de *Octopus maya* em diferentes dias pós-desova (DPD). Foram avaliadas 25 fêmeas de *O. maya* considerando variáveis fisiológicas (peso corporal total, perda de peso corporal total, peso da glândula digestiva e gônada e capacidade osmótica), metabólicas (proteínas, glicose, colesterol, acilglicerídeos e concentração de hemocianina) e imunológicas (contagem total de hemócitos, atividade aglutinante e de fenoloxidase) e comparados os valores registrados em 1, 10, 20, 30 e 40 DPD. ANOVA de uma via e teste de Newman-Keuls foram utilizados para verificar diferenças significativas entre os diferentes DPD, com um nível de significância de 5%. Em relação às variáveis fisiológicas, pode-se observar uma maior perda de peso corporal com o passar dos DPD, aliado a um decréscimo dos índices hepatossomático e gonadossomático ( $p < 0,05$ ). Nas variáveis metabólicas, não foram observadas diferenças significativas na concentração de hemocianina e nos metabólitos plasmáticos, com exceção da glicose ( $p < 0,05$ ), que apresentou níveis mais elevados em fêmeas após 10 e 20 DPD. Já nas variáveis imunológicas, foi possível observar maior atividade aglutinante em fêmeas analisadas em 40 DPD ( $p < 0,05$ ) e um decréscimo significativo na contagem de hemócitos ( $p < 0,05$ ) a partir de 20 DPD. Nossos resultados indicam que apesar das evidentes alterações nas variáveis fisiológicas, aliadas a alterações nos índices de glicose, indicando que as fêmeas de *O. maya* usam suas próprias reservas durante este período, pode-se observar uma adaptação e uma compensação imunológica que permitiu às fêmeas manterem-se saudáveis até 40 DPD.

**Palavras-chave:** cefalópodes, hemolinfa, fisiologia, metabolismo, imunologia.

### 1. Introdução

*Octopus maya* (Voss e Solís-Ramirez, 1966) é uma espécie endêmica da Península de Yucatán e um dos recursos pesqueiros mais importantes da região [1]. Em geral, fêmeas de *O. maya* estão

funcionalmente maduras a partir de 300 g de peso corporal [2] e podem produzir de 1500 a 2000 ovos de mais de 17 mm de comprimento, que produzem juvenis de 6 – 7 mm de comprimento de manto [3].

Como outros octópodes (subordem Incirrina), após a desova, as fêmeas de *O. maya* se dedicam exclusivamente ao cuidado dos ovos até sua eclosão. O cuidado materno geralmente inclui a proteção da massa de ovos de potenciais predadores, ventilação através da expulsão de jatos de água, limpeza da superfície dos ovos e remoção de embriões mortos [4]. No laboratório, a incubação artificial tem sido utilizada na prevenção de perda de ovos com grande sucesso no cultivo de *O. maya* [5]. Sob estas condições, os ovos fertilizados eclodem após 45 – 50 dias a  $24 \pm 1$  °C [4].

Sob condições de laboratório, estudos considerando a condição nutricional [6, 7] e diferentes temperaturas de aclimação [8, 9] em fêmeas de *O. maya* no período pré-desova foram realizados. Entretanto, pouca informação sobre a condição geral das fêmeas durante o período de cuidado materno e pós-desova está disponível na literatura. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o estado de saúde de fêmeas de *O. maya* em diferentes dias pós-desova.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1 Coleta e manutenção dos animais

Espécimes de *O. maya* foram capturados utilizando linhas de pesca e siri como isca, na costa de Sisal (Península de Yucatán, México) e transportados em tanques circulares de 120 L com água do mar para o *Laboratório Experimental de Espécies Marinas da Universidad Nacional Autónoma de México* (UNAM/Sisal). No laboratório, machos e fêmeas (1:1) foram acondicionados em tanques circulares de 12.000 L, em sistema de fluxo aberto de água do mar, durante 2 semanas para aclimação e para assegurar que a cópula ocorreu. Tubos de PVC (4 polegadas de diâmetro) foram utilizados nos tanques como refúgio. Os polvos foram alimentados duas vezes ao dia com siris congelados (*Callinectes* spp.) [1].

Após este período as fêmeas foram aclimatadas individualmente em tanques retangulares de 320 L com recirculação contínua e aeração constante até a desova. Nestas condições, as fêmeas foram alimentadas com dietas artificiais balanceadas com base composta de siri (*Callinectes* spp.) de acordo com a exigência nutricional da espécie [7]

por pelo menos 15 dias até a desova. Após a desova, os ovos foram separados e incubados artificialmente e as fêmeas foram pesadas e mantidas nos tanques sem alimentação até as análises. As condições da água do mar nestes tanques foram de  $24,6 \pm 0,8$  °C, salinidade 35 – 38, oxigênio dissolvido  $6,34 \pm 0,25$  mg.L<sup>-1</sup>, pH  $7,42 \pm 0,2$  e fotoperíodo 10:14 h luz vermelha-escuro. A limpeza dos tanques foi realizada diariamente. Um total de 25 fêmeas foram analisadas considerando variáveis fisiológicas, metabólicas e imunológicas em 1, 10, 20, 30 e 40 dias pós-desova (DPD) (n=5 fêmeas / DPD).

## 2.2 Coleta e preparo de hemolinfa

Para a extração de hemolinfa, as fêmeas foram anestesiadas por hipotermia (16°C abaixo da temperatura do tanque de manutenção). Após os animais atingirem um estado de sedação (diminuição da taxa respiratória e perda da coloração e da postura normal), realizou-se cuidadosamente um corte longitudinal no manto até a liberação da aorta cefálica. A hemolinfa foi coletada diretamente da aorta cefálica utilizando-se um cateter conectado a um tubo Falcon de 5 mL e usada imediatamente ou mantida sob refrigeração (2 – 8 °C) até o uso.

A hemolinfa foi centrifugada a  $800 \times g$  por 5 min a 4 °C para separar o plasma, utilizado para avaliar os metabólitos plasmáticos e atividade aglutinante e de fenoloxidase. O *pellet* celular de cada amostra foi lavado duas vezes com solução SIC-EDTA (0,45 M NaCl, 10 mM KCl, 10 mM HEPES e 10 mM EDTA–Na<sub>2</sub>; pH 7,3) e centrifugado novamente como descrito acima. Posteriormente, ressuspendeu-se várias vezes o *pellet* celular com solução tampão de cacodilatos (10 mM ácido cacodílico, 10 mM CaCl<sub>2</sub>; pH 7,0) em volume semelhante e centrifugado a  $16.000 \times g$  por 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado para avaliar a atividade de fenoloxidase de degranulado de hemócitos e sistema (plasma e degranulado de hemócitos).

## 2.3 Variáveis fisiológicas

Após a anestesia, os animais foram pesados (peso corporal total) e subsequentemente à coleta de hemolinfa, procedeu-se a eutanásia por destruição do cérebro. A gônada e a glândula digestiva foram retiradas e pesadas separadamente para obtenção dos índices gonadossomático e hepatossomático, respectivamente, de acordo com Cortez et al. [10].

A pressão osmótica da hemolinfa e da água do mar do tanque de acondicionamento das fêmeas foram medidas utilizando um microosmômetro (20  $\mu\text{L}$ /amostra) (3 Mo-Plus, Advanced Instruments, USA). Os resultados foram expressos em  $\text{mOsm kg}^{-1}$ . A capacidade osmótica (CO) foi definida como a diferença entre a pressão osmótica da hemolinfa e do meio externo [11].

#### 2.4 Variáveis metabólicas

As concentrações de glicose, colesterol e acilglicerídeos no plasma foram determinadas, em triplicata, em microplacas de 96 poços com fundo chato utilizando-se kits cromogênicos comerciais específicos (ELITech Group<sup>®</sup>). Brevemente, adicionou-se 10  $\mu\text{L}$  de plasma a 200  $\mu\text{L}$  do reagente enzimático apropriado para cada amostra. A concentração de proteína também foi determinada em formato de microplacas de 96 poços com fundo chato. Entretanto, neste caso, o plasma foi previamente diluído (5  $\mu\text{L}$  de plasma em 2.000  $\mu\text{L}$  de água estéril) e posteriormente, adicionou-se 10  $\mu\text{L}$  desta solução a 200  $\mu\text{L}$  de uma solução comercial (Biorad Protein assay 500-0006), de acordo com o método de Bradford [12]. Albumina do soro bovino foi utilizada como padrão. Os valores de absorvância de cada metabólito plasmático foram registrados em um leitor de microplacas (Biorad model 550) e as concentrações ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) calculadas utilizando-se curvas padrões considerando o valor de diluição para cada amostra. Todos os metabólitos plasmáticos foram determinados em triplicata.

A concentração de hemocianina foi medida utilizando-se 10  $\mu\text{L}$  de hemolinfa diluída em 990  $\mu\text{L}$  de solução TRIS (0,1 M; pH 8,0) e mediu-se a absorvância em 335 nm (UV-SENSE; SLM AMINCO Mod DW). A concentração de hemocianina foi calculada usando um coeficiente de extinção de 17,26 calculado com base na subunidade funcional de 74 kDa [13, 14].

#### 2.5 Variáveis imunológicas

Para evitar a ativação do sistema imunológico por endotoxinas, todas as vidrarias foram lavadas previamente à utilização com Etoxa-clean (Sigma Chemical Co) e as soluções foram preparadas utilizando-se água livre de pirógenos. A contagem total de hemócitos foi realizada, em duplicata, em câmara de Neubauer a partir de hemolinfa fixada em Alsever (115 mM  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ , 30 mM  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ , 338 mM  $\text{NaCl}$ , 10 mM

EDTA.Na<sub>2</sub>; pH 7,0) formalina 4% em diluição de 1:3. As amostras foram mantidas sob refrigeração (2 – 8 °C) até as análises.

A atividade aglutinante foi avaliada utilizando-se sangue humano (tipo O+) obtido de um banco de sangue local. Antes do uso, os eritrócitos foram lavados três vezes com solução salina 0,9%, centrifugados a  $380 \times g$  à 25 °C por 5 min e então ajustado a um volume final de 2%. Amostras de 50 µL de plasma dos polvos foram adicionados em poços de uma microplaca de 96 poços com fundo em U e uma diluição serial de 2 vezes foi utilizada com solução salina 0,9% como diluente. O mesmo volume de solução de eritrócitos foi adicionado a cada poço e incubado por 2 – 3 h à temperatura ambiente. Nos controles, substituiu-se o plasma dos polvos por solução salina 0,9%. O título de atividade natural de aglutinação do plasma dos polvos foi expresso como o recíproco da diluição mais alta que mostrou um padrão visível de aglutinação [15].

As atividades de fenoloxidase (FO) total (FOT), plasmática (FOplas), em degranulado de hemócitos (FOdh) e sistema (plasma e degranulado de hemócitos) (FOsis) foram mensuradas por espectrofotometria, em triplicatas, em microplacas de 96 poços com fundo chato [16, 17]. A técnica foi ajustada para *O. maya*. Brevemente, para atividade de FOT, 50 µL de plasma (ou degranulado de hemócitos, no caso de FOdh) foram incubados com volume igual de tripsina (1 mg mL<sup>-1</sup>; Sigma) por 10 min à 37 °C. Posteriormente, 180 µL de L-DOPA (L-3,4-diidroxifenilalanina, 3 mg mL<sup>-1</sup>; Sigma) foram adicionados a cada poço e a microplaca incubada por mais 10 min a 37 °C. Para a atividade de FOplas e FOsis, utilizou-se o mesmo protocolo, entretanto, em FOplas, a tripsina foi substituída por água livre de pirógenos e em FOsis, por degranulado de hemócitos. Nos brancos, utilizou-se água livre de pirógenos em substituição à tripsina. A absorbância foi medida em 490 nm em leitor de microplacas (Biorad model 550). Os resultados foram expressos com o incremento de 0,001 em densidade óptica [16].

## 2.6 Análises estatísticas

Os dados das variáveis fisiológicas, metabólicas e imunológicas foram testados para normalidade utilizando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov, bem como para homocedasticidade das variâncias com o teste de Bartlett. ANOVA de uma via foi utilizada para verificar diferenças significativas entre os diferentes DPD. Na análise *post hoc* foi utilizado o teste de Newman-Keuls. Os dados foram analisados utilizando o

programa Statistica 5.0, considerando um nível de significância de 5% [18].

### **3. Resultados**

#### *3.1 Variáveis fisiológicas*

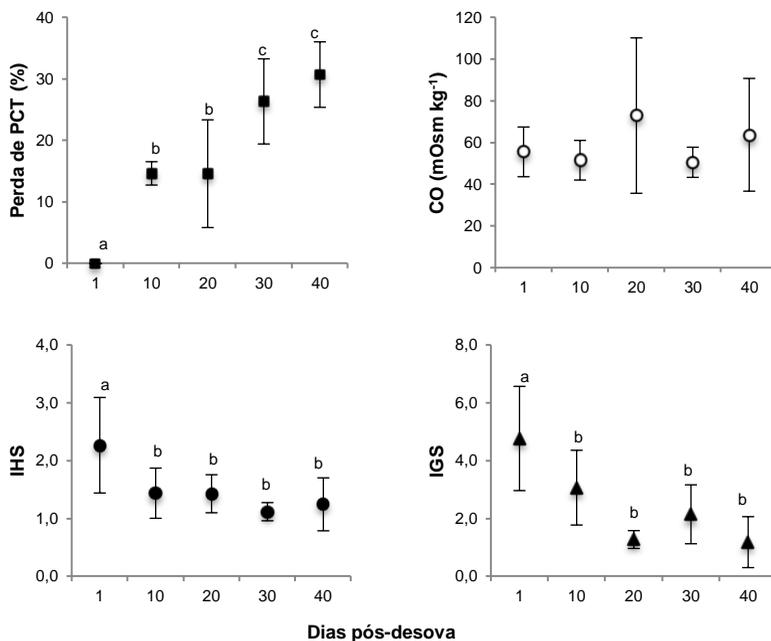
Após a desova, as fêmeas apresentaram peso corporal total médio de  $1.214,00 \pm 481,14$  g. Com o passar dos DPD foi possível observar o aumento gradativo da perda de peso corporal ( $p < 0,05$ ), atingindo um total de  $30,7 \pm 5,33\%$  em fêmeas analisadas em 40 DPD. Em ambos os índices hepatossomático e gonadossomático, ocorreu decréscimo a partir dos 10 DPD ( $p < 0,05$ ). A capacidade osmótica das fêmeas de *O. maya* foi similar durante todo o período (Fig. 1).

#### *3.2 Variáveis metabólicas*

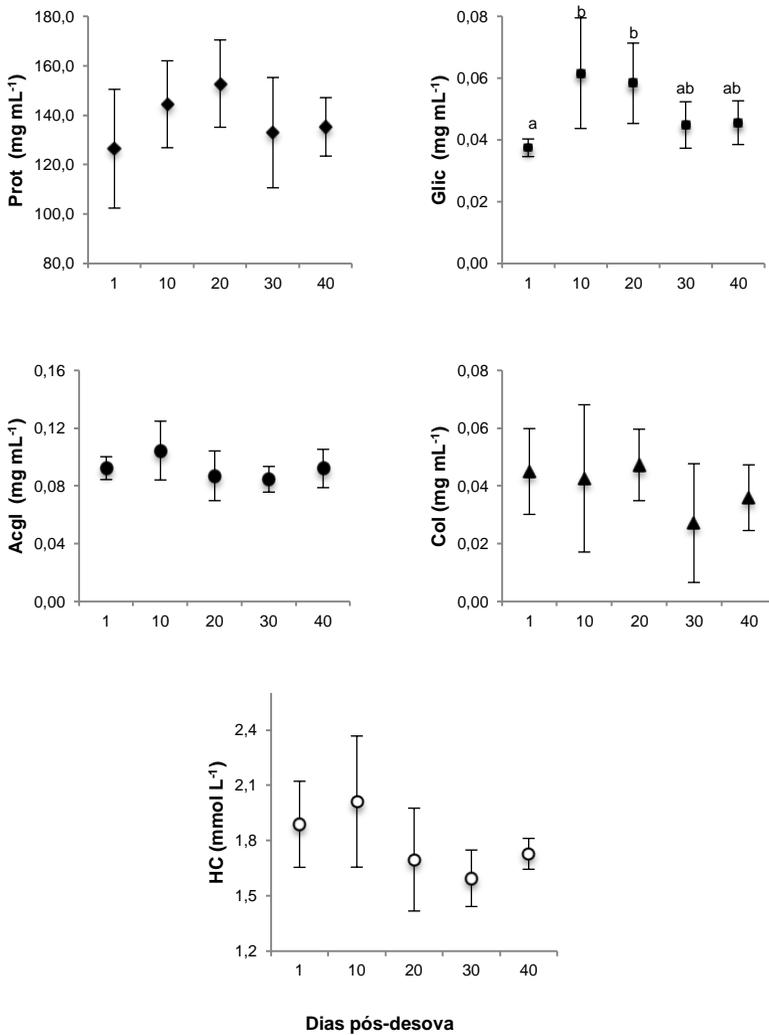
Em relação às variáveis metabólicas, não foram observadas diferenças significativas nos metabólitos plasmáticos, entre os diferentes DPD, com exceção da glicose ( $p < 0,05$ ), que apresentou níveis mais elevados em fêmeas após 10 e 20 DPD. A concentração de hemocianina foi similar durante todo o período pós-desova (Fig. 2).

#### *3.3 Variáveis Imunológicas*

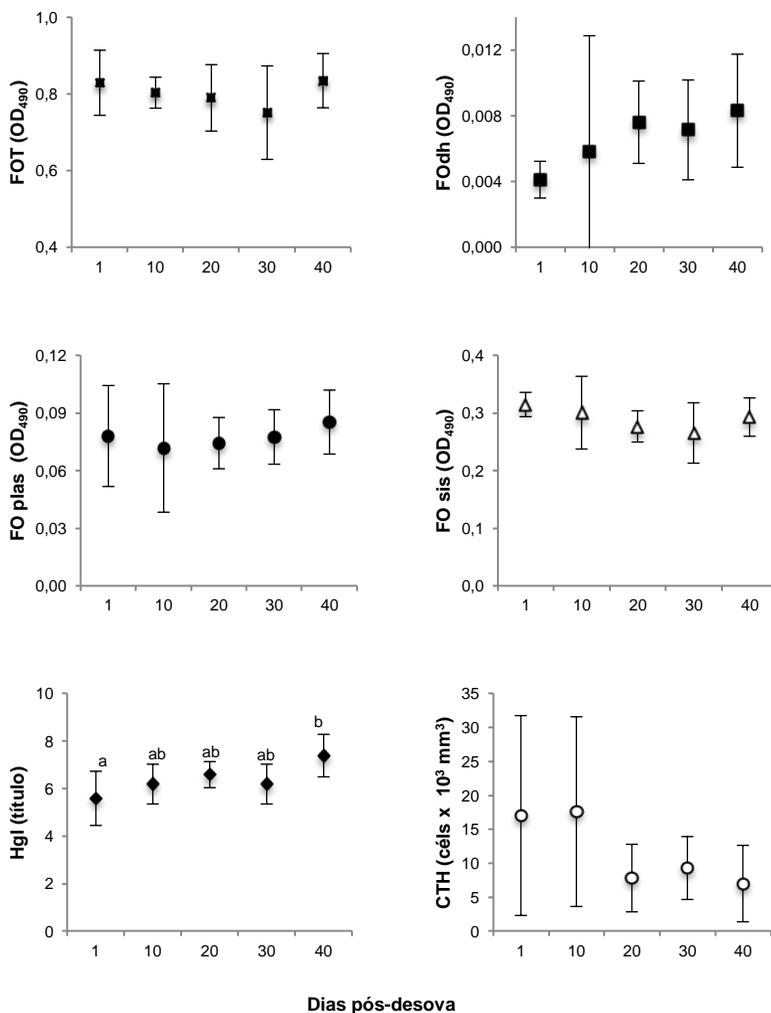
As atividades de FO (FOT, FODh, FOplas e FOsis) foram similares em todo o período experimental; já a atividade aglutinante, aumentou com o tempo pós-desova atingindo seu máximo em fêmeas analisadas em 40 DPD ( $p < 0,05$ ). O número total de hemócitos circulantes na hemolinfa apresentou grande variabilidade individual e foi similar nos diferentes DPD (Fig. 3).



**Fig. 1.** Variáveis fisiológicas (média  $\pm$  desvio padrão) de fêmeas de *Octopus maya* em diferentes dias pós-desova. PCT: peso corporal total; IHS: índice hepatossomático; IGS: índice gonadossomático; CO: capacidade osmótica.



**Fig. 2.** Variáveis metabólicas (média  $\pm$  desvio padrão) em fêmeas de *Octopus maya* em diferentes dias pós-desova. Prot: proteínas; Glic: glicose; Acgl: acilglicerídeos; Col: colesterol; HC: concentração de hemocianina.



**Fig. 3.** Variáveis imunológicas (média  $\pm$  desvio padrão) em fêmeas de *Octopus maya* em diferentes dias pós-desova. FOT: atividade de fenoloxidase total; FOplas: atividade de fenoloxidase em plasma; FODh: atividade de fenoloxidase em degranulado de hemócitos; FOsis: atividade de fenoloxidase em plasma e degranulado de hemócitos; OD<sub>490</sub>: densidade óptica em 490 nm; Hgl: atividade aglutinante; CTH: contagem total de hemócitos.

#### 4. Discussão

Durante o cuidado materno, as fêmeas de polvos têm sua vulnerabilidade e esforços metabólicos incrementados, o que leva a uma redução da sobrevivência pós-reprodutiva [19]. Usualmente, as fêmeas vivem até o desenvolvimento embrionário estar completo, mas em alguns casos, dependendo da condição da fêmea, pode ocorrer a morte antes da eclosão dos ovos, comprometendo a sobrevivência da prole [4]. Estudos sobre a condição geral das fêmeas durante o período pós-desova são escassos. Assim, no presente estudo, são apresentadas pela primeira vez informações sobre fêmeas de *O. maya* em diferentes dias pós-desova considerando variáveis fisiológicas, metabólicas e imunológicas.

No período que antecede a desova, o crescimento somático pode ser crucial para determinar os eventos subsequentes [20]. Durante período reprodutivo em polvos, é possível observar a mobilização dos recursos do tecido somático para o gamético, sendo a maturação final parcialmente atingida às custas do tecido muscular e da glândula digestiva [21, 22]. Entretanto, estudos mais recentes sugerem que a maturação final é alcançada preferencialmente por meio da alimentação em vez de produtos estocados [20, 23, 24].

Fêmeas de polvos possivelmente devem balancear a energia alocada para a produção dos ovos e ao mesmo tempo manter energia suficiente para incubá-los até sua eclosão [25]. Similarmente a outros octópodes, fêmeas de *O. maya* cessam a alimentação durante o cuidado materno. A ausência da alimentação acarreta no consumo das reservas endógenas [26, 27, 28], o que resulta em alterações fisiológicas que podem ser refletidas por visível perda de peso [29] e finalmente irão culminar com a morte das fêmeas após a eclosão dos ovos [4].

A perda de peso corporal em fêmeas de polvos pós-desova pode ser observada tanto em ambiente natural quanto em condições de laboratório ou aquário. No ambiente natural, observou-se perdas de 50 a 71% em fêmeas de *Enteroctopus dofleini* durante o cuidado materno [30]. Em laboratório, fêmeas de *Octopus mimus* perderam 25% do peso corporal total [10], enquanto fêmeas de *Octopus cyanea* perderam 36% [31]. Em *O. vulgaris* esta perda pode ser superior a 50% [32, 33]. Em condições de aquário, *E. dofleini* apresentaram perda média de 49,5%, enquanto fêmeas de *Octopus rubescens* perderam em média 50,3% do peso corporal total antes de morrerem [25].

No presente estudo, resultados semelhantes podem ser observados, já que fêmeas de *O. maya* apresentaram perda de peso

corporal gradativa com o passar do tempo, atingindo  $30,7 \pm 5,33\%$  em 40 DPD. Entretanto, esta perda provavelmente pode ser maior até o final do período de cuidado materno, já que a eclosão dos ovos geralmente ocorre em 45 – 50 DPD à  $24 \pm 1$  °C [1, 4] e as fêmeas usualmente morrem em 45 – 61 DPD [31].

O peso da glândula digestiva e condição em fêmeas de polvos geralmente aumenta significativamente com a maturação [10, 23, 34]. Por outro lado, a redução no peso da glândula digestiva e a deterioração na condição associada ao jejum e ao cuidado materno em espécimes pós-desova podem ser observados [10, 22, 34, 35, 36]. Adicionalmente, foi documentado um decréscimo de proteínas, carboidratos e lipídeos na glândula digestiva e músculo no período compreendido entre a desova e a eclosão dos ovos. Estas drásticas alterações bioquímicas e estruturais irreversíveis diminuem a expectativa de vida das fêmeas e estão fortemente relacionadas às mudanças degenerativas que ocorrem após a reprodução [35].

Situação semelhante pode ser observada com o peso da gônada e índice gonadossomático, ocorrendo aumento no período de maturação e o colapso após a incubação dos ovos [37, 38]. Similarmente, no presente estudo, foi possível observar o decréscimo em ambos os índices hepatossomático e gonadossomático em fêmeas de *O. maya* a partir de 10 DPD, sendo os resultados obtidos após 40 DPD similares aos obtidos em fêmeas de *O. vulgaris* pós-desova [37].

Os parâmetros de hemolinfa têm sido usados para monitorar a condição nutricional, fisiológica e imunológica em moluscos e crustáceos [i.e 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46]. Variáveis metabólicas, como metabólitos plasmáticos (proteínas, lipídeos, acilglicerídeos e colesterol) e concentração de hemocianina, podem auxiliar no monitoramento nutricional e do estado de saúde em camarões [40, 41, 47, 48]. Por outro lado, glicose [49, 50, 51] e lactato [50] têm sido propostos como indicadores de estresse nestes animais. Em *O. maya*, foram observadas diferenças nos metabólitos plasmáticos e concentração de hemocianina causadas pela composição da dieta, indicando que estes parâmetros podem refletir no estado nutricional e/ou fisiológico destes animais [43].

A capacidade osmótica é um indicador que permite avaliar os efeitos de diferentes fatores de estresse em camarões [39]. Nestes animais, variações nos valores de capacidade osmótica podem ocorrer com o tamanho, estado nutricional, estágio de desenvolvimento e de muda [11]. Em cefalópodes, a capacidade osmótica provavelmente também pode ser utilizada como um indicador de estresse, entretanto,

estudos devem ser realizados para o estabelecimento de valores de referência. No presente estudo, não foram encontradas diferenças significativas na capacidade osmótica em fêmeas de *O. maya* pós-desova, evidenciando que as fêmeas foram capazes de manter a homeostase desde o enfoque do balanço hidromineral.

Fêmeas em jejum ou senescentes utilizam a dissolução do tecido muscular como combustível, o que deixa a taxa metabólica em um nível alto anormal [21]. Em fêmeas de *Octopus tehuelchus* pós-desova, observou-se redução dos níveis de proteínas e fosfolipídeos no manto, glândula digestiva e braços, atribuídos ao jejum e aos esforços durante a incubação dos ovos [35]. Em camarões em jejum, um dos principais mecanismos utilizados para obtenção de energia na ausência da alimentação é o catabolismo de aminoácidos livres e lipídeos, o que diminui a concentração de proteína total no soro [52].

Além dos metabólitos plasmáticos, a concentração de hemocianina também está diretamente relacionada com o estado nutricional de camarões [53, 54]. A hemocianina é uma proteína que contém cobre e representa aproximadamente 98% do total de proteínas na hemolinfa de polvos [55]. Esta proteína serve como pigmento respiratório em artrópodes e moluscos e também como proteína de estocagem [56].

No presente estudo, os níveis dos metabólitos plasmáticos proteínas, colesterol e acilglicerídeos e a concentração de hemocianina foram similares nas fêmeas de *O. maya* em diferentes DPD. Por outro lado, pode-se observar maior nível de glicose em fêmeas após 10 e 20 DPD. A partir dos resultados obtidos das variáveis fisiológicas aliadas às metabólicas, pode-se concluir que as reservas do músculo, gônada e glândula digestiva permitem manter o catabolismo em fêmeas pós-desova de *O. maya*, fato que pode ser observado pela manutenção dos níveis de proteínas plasmáticas e concentração de hemocianina nos diferentes DPD. Além disso, o aumento do nível de glicose provavelmente é derivado da quebra das reservas energéticas por meio da gliconeogênese, comumente observada em animais durante períodos de jejum.

Similarmente a outros invertebrados, o sistema imune de cefalópodes está principalmente associado com a hemolinfa. A hemolinfa é composta por uma porção líquida, o plasma, e uma porção celular, constituída por hemócitos. Os hemócitos tem importante função nas defesas internas, reconhecendo e eliminando material não-próprio, além de atuarem na cicatrização [57], digestão de nutrientes, transporte e excreção [58]. Por outro lado, os fatores humorais no plasma incluem

moléculas de reconhecimento do não-próprio e efetores imunes como as lectinas, opsoninas, proteínas citolíticas e componentes do sistema pró-fenoloxidase (proPO) [vide revisões 59, 60].

Alterações no número, morfologia, e/ou viabilidade de hemócitos podem ser usados como indicativos do estado de saúde [61], já que estas alterações podem ocorrer em animais expostos a algum tipo de estresse ou parasitados. Malham et al. [55] realizaram repetidas amostras de hemolinfa (0, 2 e 4 h) em *Eledone cirrhosa* e observaram aumento significativo no número de hemócitos 2 h após a primeira amostragem, decrescendo após 4 h. Variações no número de hemócitos também foram observadas em *E. cirrhosa* expostos ao ar por 5 min [62].

Em *O. vulgaris*, aumento significativo no número de hemócitos foi observado 4 h após a injeção com lipopolissacarídeos de *Escherichia coli* quando comparados com animais injetados apenas com solução salina tamponada com fosfato [46]. No presente estudo, não foram observadas diferenças no número total de hemócitos circulantes na hemolinfa de fêmeas de *O. maya*, fato que pode estar relacionado com a alta variabilidade individual. Resultados semelhantes foram obtidos para *O. vulgaris* [63, 64].

Interações entre fatores celulares e humorais desempenham papel no sistema imune de invertebrados. Entre os fatores solúveis no plasma estão as aglutininas e opsoninas, que frequentemente são lectinas. Diferenças na atividade aglutinante foram observadas em ostras *Crassostrea gigas* selvagens e cultivadas [42]. Para a mesma espécie, Olafsen et al. [65] relataram atividade aglutinante aumentada em ostras infectadas por *Vibrio anguillarum*.

Fenoloxidasas, uma família de proteínas que contêm cobre, tem um papel ativo na imunidade inata, catalizando a produção de melanina pela oxidação ou hidroxilação de fenóis em quinonas [17]. Em cefalópodes, fenoloxidasas foram caracterizadas no saco de tinta de *Illex argentinus* [66] e *Octopus ocellatus* [67], bem como na hemocianina de *O. vulgaris* [68]. Atividades de fenoloxidase também foram identificadas em embriões e adultos de *Sepia officinalis* [17, 69, 70].

No presente estudo, pode-se observar uma compensação imunológica pelo incremento da atividade aglutinante em fêmeas analisadas em 40 DPD, apesar da redução da contagem total de hemócitos observada a partir de 20 DPD. Adicionalmente, não foram observadas diferenças nas atividades de fenoloxidase (total, plasmática e sistema) nos diferentes DPD, fato que pode estar relacionado à manutenção da concentração de hemocianina durante todo o período pós-desova.

## 5. Conclusão

Nossos resultados indicam que apesar das evidentes alterações nas variáveis fisiológicas, aliadas às alterações nos índices de glicose plasmática, indicando que as fêmeas de *O. maya* utilizaram suas próprias reservas durante o período pós-desova, pode-se observar certa adaptação e compensação imunológica que possivelmente tenham permitido às fêmeas manterem-se saudáveis até 40 DPD.

## 6. Agradecimentos

Este trabalho é parte da tese de doutorado de K. Roumbedakis. Os autores agradecem o apoio financeiro através dos projetos Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) Ciências do Mar 43/2013, UNAM PAPIIT IT20070013 e IN215113 e pela bolsa de Doutorado e Doutorado Sanduíche concedida a Roumbedakis, K. (6419/2014-03). Agradecemos ao Conselho Nacional Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de Produtividade em Pesquisa concedida a M.L. Martins. Agradecemos também pela assistência técnica Cláudia Caamal-Monsreal, Elisa Chan e Ariadna Sánchez (UMDI-SISAL).

## 7. Referências

- [1] C. Rosas, P. Gallardo, M. Mascaró, C. Caamal-Monsreal, C. Pascual, *Octopus maya*, in: J. Iglesias, L. Fuentes, R. Villanueva (Eds.), *Cephalopod culture*, Springer: Dordrecht, Heidelberg, New York, London, 2014, pp. 383–396.
- [2] A.I. Arkhipkin, Reproductive system structure, development and function in cephalopods with a new general scale for maturity stages, *J. Northwest Atl. Fish. Sci.* 12 (1992) 63–74.
- [3] C.F.E. Roper, M.J. Sweeney, C.E. Nauen, *FAO Species Catalogue. 3. Cephalopods of the World. An Annotated and Illustrated Catalogue of Species of Interest to Fisheries*, in: *FAO Fisheries Synopsis No. 125*, vol. 3. FAO, Rome, Italy, 1984.
- [4] E.A.G. Vidal, R. Villanueva, J.P. Andrade, I.G. Gleadall, J. Iglesias, N. Koueta, C. Rosas, S. Segawa, B. Grasse, R.M. Franco-Santos, C.B. Albertin, C. Caamal-Monsreal, M.E. Chimal, E. Edsinger-Gonzales, P. Gallardo, C. Le Pabic, C. Pascual, K. Roumbedakis, J. Wood, *Cephalopod culture: current status of main*

- biological models and research priorities, in: E.A.G. Vidal (Ed.), *Advances in Marine Biology, Advances in Cephalopod Science: Biology, Ecology, Cultivation and Fisheries*. Amsterdam: Elsevier, vol. 67, 2014, pp. 1–98.
- [5] O.H. Ávila-Poveda, R.F. Colin-Flores, C. Rosas, Gonad development during the early life of *Octopus maya* (Mollusca: Cephalopoda), *Biol. Bull.* 216 (2009) 94–102.
- [6] C. Caamal-Monsreal, M. Mascaró, P. Gallardo, S. Rodríguez, E. Noreña-Barroso, P. Domingues, C. Rosas, Effects of maternal diet on reproductive performance of *O. maya* and its consequences on biochemical characteristics of the yolk, morphology of embryos and hatchling quality, *Aquaculture* 441 (2015) 84–94.
- [7] J.F. Tercero, C. Rosas, M. Mascaró, G. Poot, P. Domingues, E. Noreña, C. Caamal-Monsreal, C. Pascual, J. Estefanell, P. Gallardo, Effects of parental diets supplemented with different lipid sources on *Octopus maya* embryo and hatching quality, *Aquaculture* 448 (2015) 234–242.
- [8] O.E. Juárez, C.E. Galindo, F. Díaz, A.D. Re, A.M. Sanchez-García, C. Caamal-Monsreal, C. Rosas, Is temperature conditioning *Octopus maya* fitness? *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 467 (2015) 71–76.
- [9] O.E. Juárez, V. Hau, C. Caamal-Monsreal, C.E. Galindo-Sánchez, F. Díaz, D. Re, C. Rosas, Effect of maternal temperature stress before spawning over the energetic balance of *Octopus maya* juveniles exposed to a gradual temperature change, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 474 (2016) 39–45.
- [10] T. Cortez, B.G. Castro, A. Guerra, Reproduction and condition of female *Octopus mimus* (Mollusca: Cephalopoda), *Mar. Biol.* 123 (1995) 505–510.
- [11] J.H. Lignot, J.C. Cochard, C. Soyez, P. Lemaire, G. Charmantier, Haemolymph osmolality according to nutritional status, molting stage and body weight of *Penaeus stylirostris*, *Aquaculture* 170 (1999) 72–92.
- [12] M.M. Bradford, A refined and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principal protein-dye binding, *Anal Biochemistry* 72 (1976) 248–254.
- [13] C. Chen, S.Y. Cheng, Hemolymph PCO<sub>2</sub>, hemocyanin, protein level and urea excretions of *Penaeus monodon* exposed to ambient ammonia, *Aquat. Toxicol.* 27 (1993a) 281–292.

- [14] C. Chen, S.Y. Cheng, Studies on hemocyanin and hemolymph protein levels of *Penaeus japonicus* based on sex, size, and moulting cycle, *Comp. Biochem. Phys. B* 106 (1993b) 293–296.
- [15] D.G. Maggioni, E.R. Andreatta, E.M. Hermes, M.A. Barracco, Evaluation of some hemato-immunological parameters in female shrimp *Litopenaeus vannamei* submitted to unilateral eyestalk ablation in association with a diet supplemented with superdoses of ascorbic acid as a form of immunostimulation, *Aquaculture* 241 (2004) 501–515.
- [16] J. Hernández-López, T. Gollas-Galván, F. Vargas-Albores, Activation of the prophenoloxidase system of brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes), *Comp. Biochem. Physiol. C* 13 (1996) 61–66.
- [17] C. Le Pabic, C. Safi, A. Serpentine, J. Lebel, J. Robin, N. Koueta, Prophenoloxidase system, lysozyme and protease inhibitor distribution in the common cuttlefish *Sepia officinalis*, *Comp. Biochem. Physiol. B* 172–173 (2014) 96–104.
- [18] J.H. Zar, *Biostatistical Analysis*, 4 ed., Upper Saddle River, New Jersey, 1999, p. 662.
- [19] P. Calow, Fact and theory – an overview, in: P.R. Boyle (Ed.), *Cephalopod life cycles*, vol. 2, Academic Press, London, 1987, pp. 351–365.
- [20] J. Otero, A. González, M.P. Sieiro, A. Guerra, Reproductive cycle and energy allocation of *Octopus vulgaris* in Galician waters, NE Atlantic, *Fish. Res.* 85 (2007) 122–129.
- [21] R.K. O'Dor, M.J. Wells, Reproduction versus somatic growth: hormonal control in *Octopus vulgaris*, *J. Exp. Biol.* 77 (1978) 529–540.
- [22] R.W. Tait, *Aspects physiologiques de la senescence post reproductive*, Ph.D. Thesis, University of Paris VI, 1986.
- [23] R. Rosa, M.L. Nunes, C. Sousa Reis, Seasonal changes in the biochemical composition of *Octopus vulgaris*, Cuvier, 1797, from three areas of the Portuguese coast. *Bull. Mar. Sci.* 71(2002) 739–751.
- [24] R. Rosa, P.R. Costa, M.L. Nunes, Effect of sexual maturation on the tissue biochemical composition of *Octopus vulgaris* and *O. defilippi* (Mollusca: Cephalopoda), *Mar. Biol.* 145 (2004) 563–574.
- [25] R.C. Anderson, J.B. Wood, R.A. Byrne, Octopus senescence: the beginning of the end, *J. Appl. Anim. Welf. Sci.* 5 (2002) 275–283.
- [26] K.M. Mangold, *Octopus vulgaris*, in: P.R. Boyle (Ed), *Cephalopod Life Cycle*, vol. 1, Academic Press, London, 1983, pp. 335–364.

- [27] A. Guerra, Mollusca, Cephalopoda, in: M.A Ramos, J. Alba, X. Bellés, J. Gonsálbez, A. Guerra, E. Macpherson, F. Martín, J. Serrano, J. Templado (Eds.), Fauna Ibérica, vol. 1. Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC, Madrid, 1992, p. 327.
- [28] F. Rocha, Biología, Ecología, Cultivo y Pesquerías de Cefalópodos, Vigo, España, Instituto de Investigaciones Marinas (Consejo Superior de Investigaciones Científicas), 2003.
- [29] W.F. Van Heukelem, *Octopus maya*, in: P.R. Boyle (Ed.), Cephalopod Life Cycles, vol. I – Species Accounts. Academic Press, London, 1983, pp. 311-323.
- [30] J.A. Cosgrove, In situ observations of nesting female *Octopus dofleini* (Wülker, 1910), J. Cephalopod Biol. 2 (1993) 33–45.
- [31] W.F. Van Heukelem, Growth, bioenergetics and life-span of *Octopus cyanea* and *Octopus maya*. Ph.D. dissertation, University of Hawaii, Honolulu, 1976.
- [32] R.K O’Dor, M.J. Wells, Energy And Nutrient Flow, in: P.R. Boyle, (Ed.), Cephalopod life cycles, Academic Press, London, 1987, vol. 2, pp. 109–133.
- [33] V. Hernández-García, J.L. Hernández-López, J.J Castro-Hdez, On the reproduction of *Octopus vulgaris* off the coast of the Canary Islands, Fish. Res. 57 (2002) 197–203.
- [34] B.G. Castro, J.L. Garrido, C.G. Sotelo, Changes in composition of digestive gland and mantle muscle of the cuttlefish *Sepia officinalis* during starvation, Mar. Biol. 114 (1992) 11–20.
- [35] R.J. Pollero, O.O. Iribarne, Biochemical changes during the reproductive cycle of the small Patagonian octopus, *Octopus tehuelchus*, D’Orb. Comp. Biochem. Physiol. B 90 (1988) 317–320.
- [36] C.M. Zamora, P.A. Olivares, Variaciones bioquímicas e histológicas asociadas al evento reproductivo de la hembra de *Octopus mimus* (Mollusca: Cephalopoda), Int. J. Morphol. 22(3) (2004) 207–216.
- [37] J. Estefanell, J. Socorro, F.J. Roo, H. Fernández-Palacios, M. Izquierdo, Gonad maturation in *Octopus vulgaris* during on-growing, under different conditions of sex ratio, ICES J. Mar. Sci. 67 (2010) 1487–1493.
- [38] D. Cuccu, M. Mereu, C. Porcu, M.C. Follesa, AL. Cau and A. Cau, Development of sexual organs and fecundity in *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 from the Sardinian waters (Mediterranean Sea), Medit. Mar. Sci. 14 (2013) 270-277.

- [39] J.H Lignot, C. Spanings-Pierrot, G. Charmantier, Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring the physiological condition and the effect of stress in crustaceans, *Aquaculture* 191 (2000) 209–245.
- [40] C. Pascual, A. Sánchez, A. Sánchez, F. Vargas-Albores, G. LeMoullac, C. Rosas, Haemolymph metabolic variables y immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of an extreme temperature, *Aquaculture* 218 (2003) 637–650.
- [41] C. Rosas, E.L. Cooper, C. Pascual, R. Brito, R. Gelabert, T. Moreno, G. Miranda, A. Sánchez, Indicators of physiological and immunological status of *Litopenaeus setiferus* wild populations (Crustacea, Penaeidae), *Mar. Biol.* 145 (2004) 401–413.
- [42] T. Barth, N. Moraes, M.A. Barracco, Evaluation of some hemato-immunological parameters in the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* of different habitats of Santa Catarina Island, Brazil, *Aquat. Living Resour.* 18 (2005) 179–186.
- [43] J. Aguila, G. Cuzon, C. Pascual, P.M. Domingues, G. Gaxiola, A. Sánchez, T. Maldonado, C. Rosas, The effects of fish hydrolysate (CPSP) level on *Octopus maya* (Voss and Solís) diet: Digestive enzyme activity, blood metabolites, and energy balance, *Aquaculture* 273 (2007) 641–655.
- [44] C. Rosas, E.L. Cooper, C. Pascual, R. Brito, R. Gelabert, T. Moreno, A. Sánchez, Physiological and immunological conditions of wild populations of *Farfantepenaeus duorarum* from the Campeche Sound (Crustacea, Penaeidae), *Mar. Biol.* 152 (2007) 929–938.
- [45] C.P. Jiménez, J.P. Huchin-Mian, N. Simões, P. Briones-Fourzán, E. Lozano-Álvarez, A.S. Arteaga, J.A. Pérez-Vega, R. Simá-Álvarez, C.R. Vazquez, R. Rodríguez-Canul, Physiological and immunological characterization of Caribbean spiny lobsters *Panulirus argus* naturally infected with *Panulirus argus* Virus 1 (PaV1), *Dis. Aquat. Org.* 100 (2012) 113–124.
- [46] L. Locatello, G. Fiorito, L. Finos, M.B. Rasotto, Behavioural and immunological responses to an immune challenge in *Octopus vulgaris*, *Physiol. Behav.* 122 (2013) 93–99
- [47] A. Sánchez, C. Pascual, A. Sánchez, F. Vargas-Albores, G. Le Moullac, C. Rosas, Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimation, *Aquaculture* 198 (2001) 13–28.
- [48] O. Carrillo, C. Zaldivar, C. Rosas, Marcadores de Situación Nutricional y de Salud, in: C. Rosas, O. Carrillo, R. Wilson, E.R. Andreatta, Editores, Estado actual y perspectivas de la nutrición de

- los camarones peneidos cultivados en Iberoamérica, México, D.F.CYTED, 2006, pp. 105–124
- [49] M.R. Hall, E.H. Van Ham, The effects of different types of stress on blood glucose in the giant tiger prawn *Penaeus monodon*, J. World Aquacult. Soc. 29 (1998) 290–299.
- [50] I.S. Racotta, E. Palacios, Hemolymph metabolic variables in response to experimental manipulation stress and serotonin injection in *Peneus vannamei*, J. World Aquacult. Soc. 29 (1998) 351–356.
- [51] C. Mugnier, C. Justou, Combined effect of external ammonia and molt stage on the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* physiological response, J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 309 (2004) 35–46.
- [52] L. Comoglio, G. Gaxiola, A. Roque, G. Cuzon, O. Amin, The effect of starvation on refeeding, digestive enzyme activity, oxygen consumption and ammonia excretion in juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei*, J. Shellfish Res. 23 (2004) 243–249.
- [53] C. Rosas, G. Cuzon, G. Taboada, C. Pascual, G. Gaxiola, A. Van Wormhoudt, Effect of dietary protein and energy levels (P/E) on growth, oxygen consumption, hemolymph and digestive gland carbohydrates, nitrogen excretion and osmotic pressure of *Litopenaeus vannamei* and *L. setiferus* juveniles (Crustacea, Decapoda; Penaeidae), Aquac. Res. 32 (2001) 1–20.
- [54] C. Rosas, G. Cuzon, G. Gaxiola, C. Pascual, G. Taboada, L. Arena, A. VanWormhoudt. An energetic and conceptual model of the physiological role of dietary carbohydrates and salinity on *Litopenaeus vannamei* juveniles, J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 268 (2002) 47–67.
- [55] S.K. Malham, C.L. Coulson, N.W. Runham, Effects of repeated sampling on the haemocytes and hemolymph of *Eledone cirrhosa* (Lam.), Comp. Biochem. Physiol. A 121 (1998) 431–440.
- [56] K. Van Holde, K. Miller, H. Decker, Hemocyanins and Invertebrate Evolution, J. Biol. Chem. 276 (2001) 15563–15566.
- [57] T.C. Cheng, Functional morphology and biochemistry of molluscan phagocytes, Ann. NY Acad. Sci. 226 (1975) 343–379.
- [58] L.A. Ford, Host defense mechanisms of cephalopods, Annu. Rev. Fish Dis. 2 (1992) 25–41.
- [59] P. Roch, Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrate, Aquaculture 172 (1999) 125–145.
- [60] F. Vargas-Albores, M.A. Barracco, Mecanismos de defensa de los moluscos bivalvos, con énfasis en pectínidos, in: A.N. Maeda-

- Martinez (Ed.), Los moluscos pectinidos de Iberoamerica: Ciencia y Acuicultura, Editorial Limusa, México, 2001, pp. 127-146.
- [61] R.P. Ellis, H. Parry, J.I. Spicer, T.H. Hutchinson, R.K. Pipe, S. Widdicombe, Immunological function in marine invertebrates: responses to environmental perturbation, *Fish Shellfish Immun.* 30 (2011) 1209–1222.
- [62] S.K. Malham, A. Lacoste, F. Gélébart, A. Cueff, S.A. Poulet, A first insight stress-induced neuroendocrine and immune changes in the octopus *Eledone cirrhosa*, *Aquat. Living Resour.* 15 (2002) 187–192.
- [63] H. Rodríguez-Domínguez, M. Soto-Búa, R. Iglesias-Blanco, C. Crespo-González, C. Arias-Fernández, J. García-Estévez, Preliminary study on the phagocytic ability of *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 (Mollusca: Cephalopoda) haemocytes in vitro, *Aquaculture* 254 (2006) 563–570.
- [64] S. Castellanos-Martínez, M. Prado-Alvarez, A. Lobo-da-Cunha, C. Azevedo, C. Gestal, Morphologic, cytometric and functional characterization of the common octopus (*Octopus vulgaris*) hemocytes, *Dev. Comp. Immunol.* 44 (2014) 50–58.
- [65] J.A. Olafsen, T.C. Fletcher, P.T. Grant, Agglutinin activity in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) hemolymph following in vivo *Vibrio anguillarum* challenge, *Dev. Comp. Immunol.* 16 (1992) 123–138.
- [66] T. Naraoka, H. Uchisawa, H. Mori, H. Matsue, S. Chiba, A. Kimura, Purification, characterization and molecular cloning of tyrosinase from the cephalopod mollusk, *Illex argentine*, *Eur. J. Biochem.* 270 (2003) 4026–4038.
- [67] T. Fan, M. Li, J. Wang, L. Yang, R. Cong, Purification and characterization of phenoloxidase from *Octopus ocellatus*, *Acta Bioch. Biophys. Sin.* 41–10 (2009) 885–872.
- [68] B. Salvato, M. Santamaria, M. Beltramini, G. Alzuet, L. Casella, The enzymatic properties of *Octopus vulgaris* hemocyanin: o-diphenol oxidase activity, *Biochemistry* 37 (1998) 14065–14077.
- [69] N.I. Siddiqui, R.F. Akosung, C. Gielens, Location of intrinsic and inducible phenoloxidase activity in molluscan hemocyanin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 348 (2006) 1138–1144.
- [70] T. Lacou-Labarthe, P. Bustamante, E. Hörlin, A. Luna-Acosta, A. Bado-Nilles, H. Thomas-Guyon, Phenoloxidase activation in the embryo of the common cuttlefish *Sepia officinalis* and responses to the Ag and Cu exposure, *Fish Shellfish Immun.* 27 (2009) 516-521.

## CAPÍTULO III

### **Fauna parasitária de fêmeas de *Octopus maya* (Cephalopoda: Octopodidae) pós-desova na península de Yucatán, México**

Katina Roumbedakis<sup>a\*</sup>, Cristina Pascual<sup>b</sup>, Sergio Guillén-Hernández<sup>c</sup>,  
Carlos Rosas<sup>b</sup>, Maité Mascaró<sup>a</sup> e Maurício L. Martins<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Laboratório AQUOS – Sanidade de Organismos Aquáticos, Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Rod. Admar Gonzaga, 1346, 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil.*

<sup>b</sup>*Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Puerto de Abrigo s/n, Sisal, 97355, Hunucma, Yucatan, Mexico.*

<sup>c</sup>*Universidad Autónoma de Yucatán, Km. 15.5 carretera Mérida-Xmatkuil, Mérida Yucatán, México.*

\*Correspondência: Laboratório AQUOS - Sanidade de Organismos Aquáticos, Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Rod. Admar Gonzaga, 1346, 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil. *E-mail:* katina.roumbedakis@gmail.com

#### **Highlights**

- Este estudo relata a fauna parasitária de fêmeas de *O. maya* pós-desova.
- Primeiro registro do protozoário coccídeo *Aggregata* sp. em *O. maya*.
- Primeiro registro de larvas de cestoides *Prochristianella* sp. na massa bucal de *O. maya*.

Nota científica redigida de acordo com as normas da Revista **Aquaculture** (Qualis A2, Fator de impacto: 1,878).



## RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a fauna parasitária e determinar os índices parasitológicos de fêmeas de *Octopus maya* em diferentes dias pós-desova (DPD). Olhos, massa bucal, rins, glândula digestiva, brânquias, corações branquiais e sistêmico e trato gastrointestinal de 22 fêmeas foram analisados separadamente em estereomicroscópio em 1, 10, 20, 30 e 40 DPD para verificar e quantificar possíveis parasitos. Coccídeos do gênero *Aggregata* sp. foram observados no intestino, ceco e brânquias, com prevalências de 75 a 100%. Larvas do cestóide *Prochristianella* sp. foram identificadas na massa bucal, com prevalência de 100% em todos os DPD, com exceção de fêmeas com 30 DPD que apresentaram prevalência de 50%. Este parasito também foi encontrado no intestino de fêmeas com 1 e 10 DPD com prevalência de 25%. A partir dos resultados do presente estudo, foi possível observar a infecção parasitária por *Aggregata* sp. e larvas de cestóides *Prochristianella* sp. em fêmeas de *O. maya* em diferentes DPD, mesmo após pelo menos 30 dias de manutenção em laboratório. Estes parasitos são transferidos por meio da cadeia trófica. Desde a aclimação até a análise, as fêmeas de *O. maya* foram alimentadas com siri congelado ou dietas artificiais, o que sugere que estes animais já estavam infectados com ambos os parasitos antes da captura.

**Palavras-chave:** cefalópodes, *Aggregata*, cestóides, parasitos.

### 1. Introdução

Cefalópodes são considerados candidatos atrativos para a diversificação da aquicultura marinha devido ao ciclo de vida curto, altas taxas de crescimento e alto valor de mercado (Vidal et al., 2014). Aliado a estas características, *Octopus maya*, espécie endêmica da península de Yucatán, México, possui desenvolvimento embrionário direto e fácil adaptabilidade sob condições de cultivo, o que favorece ainda mais sua utilização para este propósito (Rosas et al., 2014).

Com a expansão da aquicultura e o potencial uso de cefalópodes, estudos parasitológicos são importantes, pois podem fornecer informações úteis para evitar o surgimento de doenças e consequentes perdas econômicas, como já observado no cultivo de peixes (Laferty et al., 2015). Os parasitos de cefalópodes podem ter impacto tanto em populações selvagens como cultivadas (Hochberg,

1990). Entretanto, estudos sobre a fauna parasitária das principais espécies ainda são limitados (Hochberg, 1990; Castellanos-Martínez e Gestal, 2013) e praticamente inexistentes quando se trata de fêmeas pós-desova (Pascual et al., 2010). Assim, o presente estudo apresenta dados inéditos sobre a fauna parasitária de *O. maya* e discute a infecção parasitária no período pós-desova.

## 2. Material e métodos

### 2.1 Captura e aclimação dos polvos

Adultos de *O. maya* foram capturados utilizando-se linhas de pesca artesanal, com siri como isca, na costa de Sisal, Península de Yucatán, México. Os animais foram transportados para as instalações da *Universidad Nacional Autónoma de México* (UNAM/Sisal), onde foram aclimatados por duas semanas para garantir que a fecundação ocorresse por meio de cópula natural. Durante o período de aclimação, os polvos foram mantidos em tanques externos circulares de 12.000 L de fluxo contínuo, abastecido com água do mar natural (26 – 28 °C), em proporção sexual de 1:1. Tubos de PVC (4" de diâmetro) foram colocados nos tanques para serem utilizados como refúgios. Os polvos foram alimentados com siris congelados (*Callinectes sapidus*) duas vezes ao dia.

### 2.2 Manutenção das fêmeas

Após este período, as fêmeas foram transferidas para a área de desova e individualmente mantidas em tanques retangulares escuros de 320 L em sistema de recirculação. Em cada tanque, incluiu-se uma caixa de fibra de vidro para ser utilizada como refúgio e para oviposição. As fêmeas foram alimentadas, duas vezes ao dia, com dietas semi-úmidas nutricionalmente equivalentes à base de siri (*C. sapidus*) (Tercero et al., 2015) durante pelo menos 15 dias até a desova. Os tanques foram limpos diariamente para a remoção de restos de comida não ingerida e fezes. Após o início da desova, descontinuou-se a alimentação.

Os parâmetros de qualidade da água foram mantidos em  $24,6 \pm 0,8$  °C, salinidade 35 – 38, oxigênio dissolvido  $6,34 \pm 0,25$  mg L<sup>-1</sup>, pH  $7,42 \pm 0,2$  e fotoperíodo de 10:14 h luz vermelha/escuro. Após a desova, os ovos foram transferidos para a área de incubação e as fêmeas permaneceram nos tanques até as análises.

### 2.3 Análises parasitológicas

Um total de 22 fêmeas foi analisado quanto à presença de parasitos em 1, 10, 20, 30 e 40 dias pós-desova (DPD). Os polvos foram anestesiados por hipotermia (16 °C abaixo da temperatura do tanque de manutenção) e eutanasiados por destruição do cérebro. Os animais foram pesados e posteriormente dissecados para análise parasitológica. Separadamente, pesou-se a glândula digestiva e a gônada de cada animal para a determinação dos índices hepatossomático e gonadossomático, respectivamente, calculados de acordo com Otero et al. (2007).

Olhos, massa bucal, rins, glândula digestiva, brânquias, corações branquiais e sistêmico e trato gastrointestinal foram analisados separadamente sob estereomicroscópio para verificação e quantificação de parasitos. Parasitos cestoides foram fixados, corados e montados em lâminas permanentes de acordo com Eiras et al. (2006) para identificação. Os índices de prevalência, abundância média e intensidade média de infecção foram calculados de acordo com Bush et al. (1997).

### 2.4 Análises estatísticas

Os dados foram testados para a normalidade e homocedasticidade, utilizando os testes de Kolmogorov-Smirnov e Bartlett, respectivamente, e posteriormente submetidos a ANOVA de uma via para verificar diferenças significativas entre os DPD. Na análise *post hoc* foi utilizado o teste de Newman-Keuls. As prevalências foram comparadas utilizando-se o teste do qui-quadrado. Os dados foram analisados utilizando o programa Statistica 5.0, considerando um nível de significância de 5% (Zar, 1999).

## 3. Resultados

Na tabela 1 são apresentados o peso corporal total e os índices hepatossomático e gonadossomático das fêmeas de *O. maya* nos diferentes DPD. O peso corporal total médio dos animais analisados foi de  $1.024,32 \pm 466,80$  g, variando entre 461,00 e 1.990,00 g. Não foram observadas diferenças significativas entre os pesos das fêmeas, ao contrário dos índices hepatossomático e gonadossomático, nos quais pode-se observar um decréscimo com o aumento dos DPD ( $p < 0,05$ ) (Tabela 1).

**Tabela 1** Peso corporal total e índices hepatossômico e gonadossômico de fêmeas de *Octopus maya* em diferentes dias pós-desova (DPD). N: polvos analisados; PCT: peso corporal total, seguido pelo desvio padrão com valores mínimo e máximo entre parênteses; IHS: índice hepatossômico; IGS: índice gonadossômico.

DPD	N	PCT	IHS	IGS
1	4	1.015,0 ± 556,7 (663,0-1.843,0)	2,38 ± 0,90 <sup>a</sup>	4,68 ± 2,07 <sup>a</sup>
10	4	1.242,5 ± 602,9 (623,0 – 1.990,0)	1,49 ± 0,48 <sup>b</sup>	3,06 ± 1,29 <sup>b</sup>
20	5	1.069,8 ± 449,9 (730,0 – 1.750,0)	1,42 ± 0,33 <sup>b</sup>	1,26 ± 0,31 <sup>b</sup>
30	4	872,2 ± 344,0 (547,0 – 1.339,0)	1,10 ± 0,18 <sup>b</sup>	2,43 ± 0,91 <sup>b</sup>
40	5	933,4 ± 513,7 (461,0 – 1.665,0)	1,24 ± 0,46 <sup>b</sup>	1,17 ± 0,88 <sup>b</sup>
Total	22	1.024,3 ± 466,8 (461,0 – 1.990,0)	1,51 ± 0,64	2,46 ± 1,70

Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

As espécies de parasitos identificadas foram os coccídeos do gênero *Aggregata* sp. (Apicomplexa: Aggregatidae) no intestino, ceco e brânquias e larvas do cestóide *Prochristianella* sp. (Cestoda: Trypanorhyncha) na massa bucal e intestino. Prevalências de infecção por *Aggregata* sp. variaram entre 75 a 100% em fêmeas de *O. maya* nos diferentes DPD. O ceco foi o órgão infectado com mais frequência (Tabela 2).

Larvas plerocercoides de *Prochristianella* sp. foram observadas com prevalências de 100% nas fêmeas de *O. maya* analisadas em todos os DPD, com exceção de fêmeas com 30 DPD que apresentaram prevalência de 50%. Não foram observadas diferenças significativas entre as abundâncias médias ( $p = 0,6987$ ) e intensidades médias de infecção ( $p = 0,2571$ ) (Tabela 3).

**Tabela 2** Prevalência total e nos diferentes órgãos por *Aggregata* sp. em fêmeas de *Octopus maya* em diferentes dias pós-desova (DPD). P: prevalência (%); PI: polvos infectados; PE: polvos examinados.

DPD	Intestino	Ceco	Brânquias	Total	
	P	P	P	PI/PE	P
1	25,0	75,0	0	4/4	100,0
10	0	75,0	25,0	3/4	75,0
20	20,0	80,0	20,0	4/5	80,0
30	50,0	50,0	0	3/4	75,0
40	0	100,0	40,0	5/5	100,0
Total	18,2	77,3	18,2	19/22	86,3

**Tabela 3** Índices parasitológicos de cestoides *Prochristianella* sp. na massa bucal de fêmeas de *Octopus maya* em diferentes dias pós-desova (DPD). PI: polvos infectados; PE: polvos examinados; P: prevalência (%); AM: abundância média; IMI: intensidade média de infecção, seguido pelo desvio padrão com os valores mínimo e máximo entre parênteses.

DPD	PI/PE	P	AM	IMI
1	4/4	100	121,00±84,63	121,00±84,63 (8-203)
10	4/4	100	192,50±122,17	192,50±122,17 (58-354)
20	5/5	100	176,40±134,76	176,40±134,76 (38-401)
30	2/4	50	34,00±53,22	68,00±62,63 (24-112)
40	5/5	100	167,20±111,02	167,20±111,02 (21-332)
Total	20/22	90,9	141,27±112,21	155,40±107,73 (8-401)

#### 4. Discussão

Os cefalópodes têm papel importante na transmissão de parasitos, já que eles podem ser hospedeiros definitivos de protozoários, diciêmidas e crustáceos, bem como segundo ou terceiro hospedeiro intermediário de digenéticos, cestoides, acantocéfalos e nematoides (*vide* revisão Hochberg, 1990). Cerca de 150 espécies de parasitos protozoários e metazoários relacionadas a um total de 650 espécies de cefalópodes foram registradas (Hochberg, 1990), entretanto este número provavelmente é muito maior. Neste estudo, a fauna parasitária de fêmeas pós-desova de *O. maya* foi descrita pela primeira vez, com registro do parasito *Aggregata* sp. e o primeiro registro de larvas de cestoides *Prochristianella* sp. na massa bucal de polvos.

O parasito mais comum em cefalópodes é o coccídeo do gênero *Aggregata* (Protozoa: Apicomplexa), que é transmitido pela cadeia alimentar e possui distribuição mundial (Hochberg, 1990). Gestal et al. (2010) registraram um total de 10 espécies descritas infectando sépias, lulas e polvos, incluindo uma espécie de águas profundas (Castellanos-Martínez e Gestal, 2013). Estes parasitos são considerados os principais agentes epizoóticos em polvos selvagens e cultivados (Gestal et al., 2007), sendo registrados infectando espécies de importância comercial como *O. vulgaris* e *S. officinalis* (Pascual et al., 1996 a; Gestal, 2002 a; b).

*Aggregata* sp. possui ciclo de vida heteroxênico com crustáceos como hospedeiros intermediários, nos quais ocorre a fase reprodutiva assexual do parasito (merogonia), e cefalópodes como hospedeiros definitivos, nos quais ocorrem os estágios reprodutivos sexuais do parasito (gamogonia e esporogonia) (Hochberg, 1990). Devido ao fato destes parasitos se reproduzirem sexualmente no hospedeiro definitivo (cefalópodes), não é possível saber ao certo o número de indivíduos que inicialmente infectam o hospedeiro (Hochberg, 1990; Ibañez, et al., 2005), impossibilitando assim a determinação da abundância média e intensidade média de infecção. Contudo, as prevalências observadas no presente estudo foram altas, variando entre 75 e 100%, destacando assim a importância deste parasito na fauna parasitária de *O. maya*.

Parasitos deste gênero parecem ser espécie-específico nos hospedeiros definitivos, e, geralmente, são encontrados no trato gastrointestinal, entretanto, em infecções mais severas, podem ser encontrados nas brânquias e na cavidade do manto (Pascual et al., 1996a; Mladineo e Bočina, 2007). No presente estudo, observou-se a

presença de *Aggregata* sp. nas brânquias de fêmeas de *O. maya* em 10, 20 e 40 DPD, mesmo que em prevalências mais baixas quando comparadas às prevalências no trato gastrointestinal. Contrariamente aos resultados descritos por Pascual et al. (1996 a) e Mladineo e Bočina (2007), algumas fêmeas apresentaram infecções baixas e somente nas brânquias.

Infecções severas por *Aggregata octopiana* são comumente observadas durante análises histopatológicas do trato gastrointestinal de fêmeas pós-desova de *Octopus vulgaris* selvagens e cultivadas na Espanha (Pascual et al., 2010). Estes autores observaram a predominância de parasitos em estágio de esporogonia infectando amplamente os tecidos, fato que pode estar relacionado com a liberação de formas infectantes maduras para garantir a conclusão do ciclo de vida do parasito. Além disso, não foi observada infiltração de hemócitos nem fagocitose, encapsulamento ou reações fibróticas nos locais de infecção, demonstrando que a imunocompetência destes animais pode estar prejudicada.

Além de *Aggregata*, outros parasitos têm sido relatados em cefalópodes: protozoários e metazoários, como Dicyemida, monogenéticos, metacercárias e digenéticos adultos, cestoides, acantocéfalos, nematoides, e crustáceos (Overstreet e Hochberg 1975; Hochberg, 1990; Pascual et al, 1996a; González et al, 2003). Estes parasitos não parecem causar maiores problemas aos cefalópodes, entretanto, em condições de cultivo, a proliferação dos parasitos pode ser favorecida.

Os cefalópodes possuem papel fundamental no desenvolvimento do ciclo biológico de cestoides das ordens Tetrphyllidae e Trypanorhyncha (Stunkard, 1977), atuando como hospedeiros intermediários ou paratênicos, sendo os elasmobrânquios os hospedeiros definitivos (Hochberg, 1990). A transmissão dos diferentes estágios larvais que infectam os hospedeiros definitivos acontece através das relações tróficas entre esses organismos (Gestal et al., 1998). Um número não muito grande de cestoides está descrito para algumas espécies de cefalópodes (Hochberg, 1990; Nigmatullin e Shukhgalter, 1990; Pascual et al., 1996 a; b; Shukhgalter e Nigmatullin, 2001; Pardo-Gandarillas et al., 2009; Petric et al., 2011; Castellanos-Martinez e Gestal, 2013). Em *O. vulgaris*, larvas de cestoides de *Phyllobothrium* sp. e *Nybellinia lingualis* foram relatadas infectando ceco, *crop*, estômago e intestino (Gestal et al., 1998).

O Golfo do México é apontado como um habitat rico para cestoides da ordem Trypanorhyncha (Palm e Overstreet, 2000). Estes autores acrescentam que estes cestoides possuem uma variabilidade morfológica intra-específica elevada, muitas vezes combinados com ampla gama de hospedeiros e ampla distribuição zoogeográfica, contudo, informações sobre este grupo parasito ainda são incipientes.

Trypanorhyncha do gênero *Prochristianella* Dollfus, 1946 possuem ampla distribuição geográfica e foram relatados em muitos países da Europa, Ásia, Austrália e América do Norte e Sul (Schaeffner e Beveridge, 2012). Entretanto, muitas das larvas plerocercoides em crustáceos, moluscos e peixes ainda não foram identificados, e os parasitos adultos de vários elasmobrânquios ainda não foram estudados e taxonomicamente avaliados (Palm e Overstreet, 2000). No presente estudo observou-se a presença de cestoides do gênero *Prochristianella* na massa bucal dos polvos com altas prevalências em todos os DPD. Este é o primeiro registro de larvas de cestoides deste gênero na massa bucal de polvos.

Assim como os parasitos do gênero *Aggregata*, plerocercoides *Prochristianella* sp. também são transferidos por meio da cadeia trófica. Durante todo o período de manutenção das fêmeas de *O. maya* em laboratório, os animais foram alimentados com siri congelado ou dietas artificiais, o que sugere que estes animais já estavam infectados com ambos os parasitos antes da aclimatação em laboratório.

## 5. Conclusão

A partir dos resultados do presente estudo, pode-se observar a infecção parasitária por *Aggregata* sp. e larvas de cestoides *Prochristianella* sp. em fêmeas de *O. maya* em diferentes DPD, mesmo após pelo menos 30 dias de manutenção em laboratório. Não há na literatura nenhuma informação sobre o tempo que estes parasitos podem permanecer no hospedeiro depois da infecção. Além disso, por ser o primeiro registro de larvas de cestoides na massa bucal de polvos, não se sabe quais os possíveis danos que estes parasitos podem causar ao hospedeiro. Sugere-se a realização de estudos complementares que englobem análises histopatológicas da região infectada a fim de identificar estes danos.

## 6. Agradecimentos

Este trabalho é parte da tese de doutorado de K. Roumbedakis. Os autores agradecem o apoio financeiro através dos projetos Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) Ciências do Mar 43/2013, UNAM PAPIIT IT20070013 e IN215113 e pela bolsa de Doutorado e Doutorado Sanduíche concedida a K. Roumbedakis, (6419/2014-03). Agradecemos ao Conselho Nacional Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de Produtividade em Pesquisa concedida a M.L. Martins. Agradecemos também pela assistência técnica Cláudia Caamal-Monsreal, Elisa Chan e Ariadna Sánchez (UMDI-SISAL).

## 7. Referências

- Bush, A.O., Lafferty, K.D., Lots, J.M., Shostak., A.W., 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. J. Parasitol. 83, 575–583.
- Castellanos-Martínez, S., Gestal, C., 2013. Pathogens and immune response of cephalopods. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 447, 14–22.
- Eiras, J.C., Takemoto, R.M., Pavanelli, G.C., 2006. Métodos de estudo e técnicas laboratoriais em parasitologia de peixes. Eduem, Maringá. 199 p.
- Gestal, C., Abollo, E., Arias, C., Pascual, S., 1998. Larvas Plerocercoides de *Phyllobothrium* sp. (Tetraphyllidea, Phyllobotriidae) y *Nybelinia lingualis* (Trypanorhyncha, Tentaculariidae) cestodos parasitos de *Octopus vulgaris* en la Ría de Vigo (aguas de Galicia). Iberus 16 (1), 125–132.
- Gestal, C., Abollo, E., Pascual, S., 2002a. Observations on associated histopathology with *Aggregata octopiana* infection (Protista: Apicomplexa) in *Octopus vulgaris*. Dis. Aquat. Org. 50, 45–49.
- Gestal, C., Páez De La Cadena, M., Pascual, S., 2002b. Malabsorption syndrome observed in the common octopus *Octopus vulgaris* infected with *Aggregata octopiana* (Protista: Apicomplexa). Dis. Aquat. Org. 51, 61–65.
- Gestal, C., Guerra, A., Pascual, S., 2007. *Aggregata octopiana* (Protista: Apicomplexa): a dangerous pathogen during commercial *Octopus vulgaris* ongrowing. ICES J. Mar. Sci. 64, 1743–1748.
- Gestal, C., Pascual, S., Hochberg, F., 2010. *Aggregata bathytherma* sp. nov. (Apicomplexa: Aggregatidae), a new coccidian parasite

- associated with a deep-sea hydrothermal vent octopus. *Dis. Aquat. Org.* 91, 237–242.
- González, A.F., Pascual, S., Gestal, C., Abollo, E., Guerra, A., 2003. What makes a cephalopod a suitable host for parasite? The case of Galician waters. *Fish. Res.* 60, 177–183.
- Hochberg, F.G., 1990. Diseases of Mollusca: Cephalopoda. In: Kinne, O. *Diseases of Marine Animals*, Vol. III. Cephalopoda to Urochordata. Hamburg: Biologisches Anstalt Helgoland, pp. 47–227.
- Ibáñez, C.M., Pardo-Gandarillas, M.C., George-Nascimento, M., 2005. Uso del microhábitat por el protozoo parásito *Aggregata patagonica* Sardella, Ré & Timi, 2000 (Apicomplexa: Aggregatidae) en su hospedador definitivo, el pulpo *Enteroctopus megalocyathus* (Gould, 1852) (Cephalopoda: Octopodidae) en el sur de Chile. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 78 (3), 441–450.
- Lafferty, K.D., Harvell, C.D., Conrad, J.M., Friedman, C.S., Kent, M.L., Kuris, A.M., Powell, E.N., Rondeau, D., Saksida, S.M., 2015. Infectious Diseases Affect Marine Fisheries and Aquaculture Economics. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 7, 471–496.
- Mladineo, I., Bočina, I., 2007. Extraintestinal gamogony of *Aggregata octopiana* in the reared common octopus (*Octopus vulgaris*) (Cephalopoda: Octopodidae). *J. Invertebr. Pathol.* 96, 261–264.
- Nigmatullin, C.M., Shukhgalter, O.A., 1990. Helminthofauna y aspectos ecológicos de las relaciones parasitarias del calamar (*Illex argentinus*) en el Atlántico Sudoccidental. *Frente Marítimo* 7A, 57–68.
- Overstreet, R.M., Hochberg, F.G., 1975. Digenetic trematodes in cephalopods. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 55, 893–910.
- Otero, J., González, A., Sieiro, M.P., Guerra, A., 2007. Reproductive cycle and energy allocation of *Octopus vulgaris* in Galician waters, NE Atlantic. *Fish. Res.* 85, 122–129.
- Palm, H.W., Overstreet, R.M., 2000. New records of trypanorhynch cestodes from the Gulf of Mexico, including *Kotorella pronosoma* (Stossich, 1901) and *Heteronybelinia palliata* (Linton, 1924) comb. n. *Folia Parasitol.* 47, 293–302.
- Pardo-Gandarillas, M.C., Lohrmann, K.B., Valdivia, A.L., Ibáñez, C.M., 2009. First record of parasites of *Dosidicus gigas* (d'Orbigny, 1835) (Cephalopoda: Ommastrephidae) from the Humboldt Current system off Chile. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 44, 397–408.
- Pascual, S., Gestal, C., Estèvez, J.M., Rodríguez, H., Soto, M., Abollo, E., Arias, C. 1996a. Parasites in commercially-exploited cephalopods

- (Mollusca: Cephalopoda) in Spain: an updated perspective. *Aquaculture* 142, 1–10.
- Pascual, S., Gonzalez, A., Arias, C., Guerra, A., 1996b. Biotic relationships of *Illex coindetii* and *Todaropsis eblanae* (Cephalopoda, Ommastrephidae) in the Northeast Atlantic: evidence from parasites. *Sarsia* 81, 265–274.
- Pascual, S., González, A., Guerra, A., 2010. Coccidiosis during octopus senescence: Preparing for parasite outbreak. *Fish. Res.* 106, 160–162.
- Petric, M., Mladineo, I., Sifner, S.K., 2011. Insight into the short-finned squid *Illex coindetii* (Cephalopoda: Ommastrephidae) feeding ecology: is there a link between helminth parasites and food composition? *J. Parasitol.* 97, 55–62.
- Rosas, C., Gallardo, P., Mascaró, M., Caamal-Monsreal, C., Pascual, C., 2014. *Octopus maya*. In: Iglesias, J., Fuentes, L., Villanueva, R. (Eds.), *Cephalopod Culture*. Springer: Dordrecht, Heidelberg, New York, London, pp. 383–396.
- Schaeffner, B.C., Beveridge, I., 2012. *Prochristianella* Dollfus, 1946 (Trypanorhyncha: Eutetrarhynchidae) from elasmobranchs off Borneo and Australia, including new records and the description of four new species. *Zootaxa* 3505, 1–25.
- Shukhgalter, O.A., Nigmatullin, C.M., 2001. Parasitic helminths of jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae) in open waters of the central east Pacific. *Fish. Res.* 54, 95–110.
- Stunkard, H.W., 1977. Studies on Tetracystid and Tetrarhynchid metacestodes from squids taken on the New England coast. *Biol. Bull.* 153, 387–412.
- Tercero, J.F., Rosas, C., Mascaró, M., Poot, G., Domingues, P., Noreña, E., Caamal-Monsreal, C., Pascual, C., Estefanell, J., Gallardo, P., 2015. Effects of parental diets supplemented with different lipid sources on *Octopus maya* embryo and hatching quality. *Aquaculture* 448, 234–242.
- Vidal, E.A.G., Villanueva, R., Andrade, J.P., Gleadall, I.G., Iglesias, J., Koueta, N., Rosas, C., Segawa, S., Grasse, B., Franco-Santos, R.M., Albertin, C.B., Caamal-Monsreal, C., Chimal, M.E., Edsinger-Gonzales, E., Gallardo, P., Le Pabic, C., Pascual, C., Roubledakis, K., Wood, J., 2014. Cephalopod culture: current status of main biological models and research priorities. In: Vidal, E.A.G. (Ed.), *Advances in Marine Biology. Advances in Cephalopod Science:*

Biology, Ecology, Cultivation and Fisheries, v. 67, Elsevier, Amsterdam, pp. 1–98.

Zar, J.H., 1999. Biostatistical Analysis, 4 ed. Upper Saddle River, New Jersey, p. 662.

## CAPÍTULO IV

### **Respostas fisiológicas e comportamentais de *Octopus maya* (Voss e Solís, 1966) expostos à diferentes agentes anestésicos e concentrações**

Katina Roumbedakis<sup>a\*</sup>, Marina N. Alexandre<sup>a</sup>, José A. Puch<sup>b</sup>, Maurício L. Martins<sup>a</sup> e Carlos Rosas<sup>b</sup>

<sup>a</sup>*Laboratório AQUOS - Sanidade de Organismos Aquáticos, Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Rod. Admar Gonzaga, 1346, 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil.*

<sup>b</sup>*Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Puerto de Abrigo s/n, Sisal, 97355, Hunucmá, Yucatán, México.*

\*Correspondência: Laboratório AQUOS - Sanidade de Organismos Aquáticos, Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Rod. Admar Gonzaga, 1346, 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil. *E-mail:* katina.roumbedakis@gmail.com

#### **Highlights**

- Primeiro estudo sobre anestésicos em juvenis e adultos de *O. maya*.
- Avaliou-se as respostas fisiológicas e comportamentais à diferentes agentes anestésicos.
- Para manipulação de curto prazo de juvenis e adultos não é necessário o uso de anestésicos.
- Para facilitar a manipulação de espécimes grandes recomenda-se o uso de etanol 3%.

Artigo redigido de acordo com as normas da Revista **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** (Qualis B1, Fator de impacto: 1,866).



## RESUMO

O presente estudo foi desenvolvido para estabelecer o agente anestésico e concentração que deve ser utilizado para a manipulação de curto prazo de juvenis e adultos de *Octopus maya*. No primeiro experimento, foram investigados o consumo de oxigênio antes, durante e depois da exposição de juvenis de *O. maya* a hipotermia (11 e 13 °C), etanol (0,5; 1,5 e 3,0%), cloreto de magnésio (0,75; 1,5 e 3,75%), cloreto de magnésio associado a etanol (0,75:1,5; 1,13:0,75; 0,37:2,25%) e óleo de cravo (0,15 mL L<sup>-1</sup>). Após a exposição aos agentes anestésicos, os animais foram submetidos a um protocolo de manejo, previamente estabelecido em 180 s, com propósitos biométricos. Dois grupos controle sem agentes anestésicos, um sem e outro com manipulação, também foram avaliados. Adicionalmente, o comportamento dos animais frente aos agentes anestésicos foi analisado, sendo registrados os tempos de indução e recuperação e a posterior ingestão de alimento para determinar uma ótima recuperação. Os tempos máximos de indução e recuperação foram estabelecidos em 600 s. Por último, foi avaliado o crescimento dos animais. No segundo experimento, selecionou-se a melhor concentração de cada agente anestésico para verificar seu efeito em adultos de *O. maya*, registrando-se os tempos de indução e recuperação. Resultados no consumo de oxigênio demonstraram que os juvenis de *O. maya* expostos aos agentes anestésicos apresentaram alterações no consumo de oxigênio durante e depois da exposição. Além disso, a exposição ao cloreto de magnésio e óleo de cravo, em geral, inibiram a ingestão de alimento. Com exceção dos animais expostos ao óleo de cravo, o crescimento dos juvenis não foi afetado pelas substâncias testadas e pela manipulação, sugerindo que estas variáveis não provocam efeito a longo prazo no crescimento. Em adultos, etanol foi o agente anestésico que apresentou os melhores resultados. Em conclusão, para a manipulação de curto prazo (até 180 s) de juvenis e adultos de *O. maya*, não é necessário o uso de agentes anestésicos. Em espécimes adultos de grande tamanho (acima de 1,0 kg), nos quais a manipulação pode ser dificultada, sugere-se o uso de etanol 3,0%.

**Palavras-chave:** anestesia, consumo de oxigênio, comportamento, crescimento, bem estar.

## 1. Introdução

Cefalópodes são comumente utilizados como animais experimentais e, portanto, a anestesia é comumente utilizada (Ikeda et al., 2009). Anestesia e sedação são particularmente importantes quando se trata de polvos, já que seus braços são fortes e altamente versáteis, podendo facilmente interferir no uso de instrumentos e equipamentos e obstruir o acesso à cabeça e ao corpo (Gleadall, 2013 a). Entretanto, a anestesia em invertebrados é um tema relativamente novo e poucos estudos têm sido feitos para melhorar o entendimento dos agentes anestésicos nestes animais (Gunkel e Lewbart, 2007).

Como observado em peixes, a efetividade e a concentração apropriada dos agentes anestésicos em cefalópodes tendem a ser espécie-específicos (Sykes et al., 2012; Gleadall, 2013 a). Além disso, devido a aspectos fisiológicos, diferenças intra-específicas podem ocorrer de acordo com o estágio do ciclo de vida e tamanho/peso do animal ou devido a fatores ambientais ou de cultivo (Sykes et al., 2012). Assim, determinar a segurança e a confiabilidade dos agentes anestésicos em diferentes estágios de vida e sob determinadas condições é importante para adotar o anestésico apropriado para cada espécie.

*Octopus maya* é uma espécie de grande importância econômica e comercial, endêmica da península de Yucatán, México. Esta espécie possui desenvolvimento direto, ciclo de vida curto e fácil adaptabilidade em condições de cultivo, sendo, portanto, uma das mais importantes candidatas para a aquicultura (Rosas et al., 2014). Estudos em várias áreas, tais como reprodução, desenvolvimento embrionário, nutrição e fisiologia foram desenvolvidos para esta espécie (Rosas et al. 2007; 2008; 2012; Ávila-Povela et al., 2009; Caamal-Monsreal, 2015; Juárez et al., 2015; Tercero et al., 2015; Juárez et al., 2016). Entretanto, até a presente data não há nenhum estudo relacionado à anestesia. O objetivo do presente trabalho foi determinar os efeitos de diferentes anestésicos e concentrações na condição fisiológica e no comportamento de juvenis e avaliar seus efeitos em adultos de *O. maya*.

## 2. Materiais e métodos

Este estudo foi previamente submetido e aprovado pelo *Comité de Ética de Experimentos Animales* da *Facultad de Química* da *Universidad Nacional Autónoma de México* (UNAM, Sisal) (Permissão Número: Oficio / FQ / CICAL / 099 / 15).

## 2.1 Agentes anestésicos e concentrações

Dois experimentos foram realizados para avaliar o efeito de diferentes agentes anestésicos em juvenis e adultos de *O. maya*. No primeiro experimento, foram investigados o consumo de oxigênio antes, durante e depois da exposição de juvenis de *O. maya* aos diferentes agentes anestésicos e concentrações: hipotermia (11 e 13 °C), etanol (0,5; 1,5 e 3,0%), cloreto de magnésio (0,75; 1,5 e 3,75%), cloreto de magnésio associado a etanol [0,75:1,5% (Mix 1); 1,13:0,75% (Mix 2) e 0,37:2,25% (Mix 3)] e óleo de cravo (0,15 mL L<sup>-1</sup>). Em testes prévios realizados com uma concentração mais baixa de óleo de cravo (0,05 mL L<sup>-1</sup>) não foi observado nenhum efeito anestésico aparente, optando-se por utilizar uma concentração mais alta (0,15 mL L<sup>-1</sup>).

No segundo experimento, a melhor concentração de cada agente anestésico utilizado nos juvenis foi selecionada e testada em adultos de *O. maya*: hipotermia 11 °C, etanol 3,0%, cloreto de magnésio 7,5% e cloreto de magnésio associado a etanol 0,75:1,5%. Como a concentração de 3,75% não induziu a anestesia em 10 min, aumentou-se a concentração para 7,5% (Harms, 2006). Devido às reações altamente estressantes observadas nos juvenis expostos ao óleo de cravo, decidiu-se excluir este agente anestésico do experimento com adultos.

As temperaturas de hipotermia foram selecionadas considerando-se a temperatura crítica mínima 11,6 °C estabelecida por Noyola et al. (2013) para juvenis de *O. maya*, na qual a taxa metabólica é próxima a zero. As concentrações dos outros anestésicos foram selecionadas com base na literatura (Andrews e Tansey, 1981; Messenger et al., 1985; Harms, 2006; Mooney et al., 2010; Gonçalves et al., 2012; Gleadall, 2013 a) e preparadas momentos antes da utilização para evitar potenciais reações tóxicas (Gleadall, 2013a).

Hipotermia foi obtida por meio do decréscimo da temperatura com água do mar congelada e as concentrações de etanol por diluição direta em água do mar. As concentrações que continham cloreto de magnésio foram ajustadas com volumes de água destilada e água do mar a fim de manter a salinidade similar à da água utilizada durante a aclimação. Para as soluções com óleo de cravo, uma solução estoque foi dissolvida em etanol 96% em proporção de 1:10 e posteriormente diluída em água do mar para obter a concentração desejada.

## 2.2 Critérios para anestesia

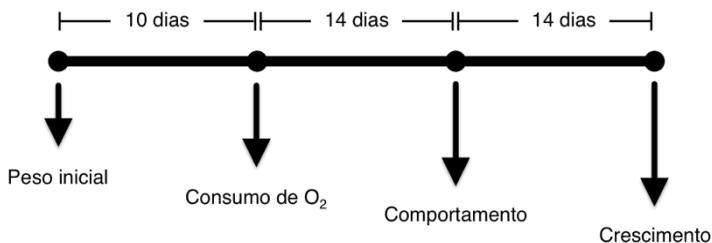
Para verificar a anestesia geral nos polvos, foram utilizados os critérios estabelecidos por Andrews e Tansey (1981), que incluem alterações de coloração da eple e variações dos tons dos cromatóforos, taxa de respiração, indicada pelas contrações do manto, eventos de defecação, aparência dos olhos, atividade dos braços e habilidade de sucção das ventosas. Os estágios de anestesia e mudanças de comportamento associados foram avaliados de acordo com a tabela proposta por Gleadall (2013a).

## 2.3 Experimento 1: Anestesia em juvenis

Juvenis de *O. maya* foram obtidos por meio de reprodução de polvos adultos selvagens no *Laboratório Experimental de Espécies Marinas da Universidad Nacional Autónoma de México* (UNAM, Sisal). Após a postura, os ovos foram incubados artificialmente por aproximadamente 45 dias e os juvenis recém eclodidos cultivados de acordo com os procedimentos usualmente utilizados neste laboratório.

Posteriormente, um total de 98 animais ( $n = 7/\text{tratamento}$ ) foram pesados ( $1,67 \pm 0,5$  g) com balança semi-analítica (OHAUS Scout SC2020,  $\pm 0,01$  g) e individualizados em recipientes de plástico de 500 mL para aclimação por um período de 10 dias. Cada recipiente continha duas janelas cobertas com malha plástica (5 mm) de cada lado para permitir o fluxo de água e uma concha de *Melongena corona bispinosa* fornecida como refúgio. Os recipientes foram colocados em um tanque em sistema de recirculação de água do mar com temperatura  $24 \pm 1$  °C, salinidade 35 – 38, oxigênio dissolvido  $> 5$  mg L<sup>-1</sup>, pH  $> 8$  e fotoperíodo 10:14 h luz-escuro.

Após este período, registrou-se o consumo de oxigênio antes, durante e depois da anestesia em um respirômetro de fluxo contínuo. Posteriormente, os animais foram cultivados por 14 dias, sendo os mesmos polvos utilizados para analisar o comportamento em relação aos agentes anestésicos. Por fim, foram novamente cultivados por mais 14 dias e o peso final foi registrado para avaliar o crescimento (Fig. 1). Durante todo o período experimental, os animais foram alimentados duas vezes ao dia com dieta artificial (Rosas et al., 2007), os recipientes limpos para a remoção de restos de comida não ingerida e fezes e os parâmetros de qualidade da água monitorados diariamente.



**Fig. 1.** Cronograma experimental da avaliação dos diferentes agentes anestésicos em juvenis de *Octopus maya*.

### 2.3.1 Consumo de oxigênio

O consumo de oxigênio foi mensurado utilizando-se um respirômetro de fluxo contínuo composto de câmaras respirométricas conectadas a um sistema de recirculação (Rosas et al., 2008). Previamente às medições, os animais permaneceram em jejum por 24 h. Os juvenis foram então colocados em câmaras respirométricas de 90 mL com fluxo contínuo aproximado de  $0,1 \text{ L min}^{-1}$  e aclimatados por 1 h. Uma concha de *Melongena corona bispinosa* foi colocada em cada câmara como refúgio para os animais; uma câmara sem polvos mas contendo uma concha foi utilizada como controle em cada tratamento. Medidas de oxigênio dissolvido (OD) foram registradas a cada 15 s para cada câmara (entrada e saída) com sensores de oxigênio conectados por fibra ótica a um mini-amplificador Oxy 10 (PreSens&, Germany). Os sensores foram calibrados com água do mar saturada a 100% (OD) e com solução de sulfato de sódio a 5% (0% OD).

Subsequente ao período de aclimação, o agente anestésico foi introduzido nas câmaras. Quando os juvenis estavam visivelmente sedados (diminuição da taxa respiratória e perda da coloração e da postura normal), imediatamente foram removidos das câmaras respirométricas e transferidos para um recipiente para a realização de um protocolo de manejo com propósitos biométricos, pré-estabelecido em 180 s. Enquanto os animais foram manipulados, o agente anestésico foi removido das câmaras respirométricas que foram novamente preenchidas com água do mar aerada.

Imediatamente após o protocolo de manipulação, os animais foram colocados nas câmaras respirométricas para recuperação da anestesia e o consumo de oxigênio foi medido por mais uma hora. Adicionalmente, foram avaliados dois grupos controle, sem nenhum agente anestésico: o primeiro sem (controle 1) e o segundo com

manipulação (controle 2). Para determinar uma ótima recuperação da anestesia, a alimentação foi oferecida aos juvenis (Gonçalves et al., 2012), observando-se o comportamento e ingestão do alimento durante um tempo máximo de 300 s.

### 2.3.2 *Comportamento*

Para analisar a indução e a recuperação da anestesia em relação às diferentes substâncias testadas, foram monitoradas as variações de coloração e tonalidade dos cromatóforos, taxa de respiração, indicada pelas contrações do manto, aparência dos olhos e atividade da pupila, atividade dos braços e habilidade de adesão das ventosas, eventual defecação e liberação de tinta. Os tempos de indução e recuperação foram registrados. Para determinar um ótimo anestésico e concentração, uma rápida imobilidade e recuperação total, sem reações estressantes e mortes, são desejadas, como sugerido por Gonçalves et al. (2012). Assim, estabeleceu-se que os tempos de indução e recuperação deveriam ser inferiores a 600 s. O mesmo protocolo de manejo e ingestão de alimento foi realizado.

### 2.3.3 *Crescimento*

O peso dos animais foi registrado no início e no final do experimento e durante os protocolos de manejo das etapas de determinação do consumo de oxigênio e análise de comportamento, a fim de registrar o crescimento dos animais durante todo o período experimental.

## 2.4 *Experimento 2: Anestesia em adultos*

Os espécimes adultos (> 500 g) foram capturados por pesca artesanal na costa de Sisal, Yucatán, México, e transportados ao laboratório. Os polvos foram aclimatados individualmente por 14 dias em tanques escuros retangulares de 320 L em sistema de recirculação com água do mar aerada; tubos de PVC (4" de diâmetro) foram colocados nos tanques para serem utilizados como refúgio. Os animais foram alimentados duas vezes ao dia com siris congelados (*Callinectes* spp.), os parâmetros de qualidade da água foram monitorados e os tanques limpos para remoção de restos de alimento e fezes diariamente.

Réplicas de cinco animais foram utilizadas para testar cada agente anestésico. Similarmente ao experimento dos juvenis, os adultos permaneceram em jejum durante 24 h antes da exposição e o mesmo

protocolo de manejo (180 s) foi utilizado. Além disso, os estágios de anestesia foram avaliados e os tempos de indução e recuperação registrados. Um grupo controle sem agente anestésico, mas com manejo foi avaliado. Após a anestesia, os polvos foram cultivados durante 14 dias sob as mesmas condições do período de aclimação.

## *2.5 Análises estatísticas*

O teste do qui-quadrado foi utilizado na comparação entre os agentes anestésicos que induziram a anestesia e na ingestão de alimento após a recuperação. Os dados de peso foram previamente transformados em  $\ln$  e os dados de crescimento foram analisados por regressão linear. ANOVA de uma via e teste de Newman-Keuls foram utilizados para determinar diferenças significativas entre os tempos de indução e recuperação dos diferentes agentes anestésicos e concentrações (Zar, 1999).

## **3. Resultados**

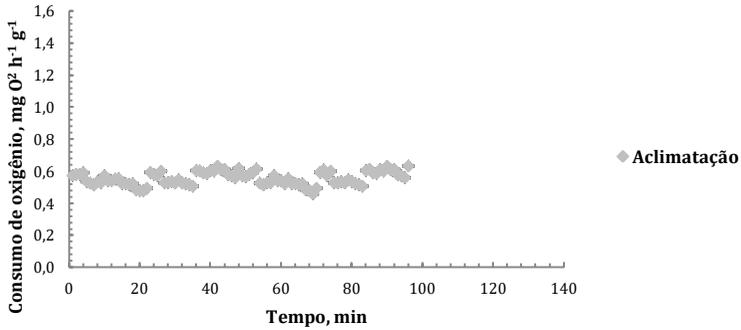
### *3.1 Experimento 1: Anestesia em juvenis*

#### *3.1.1 Consumo de oxigênio*

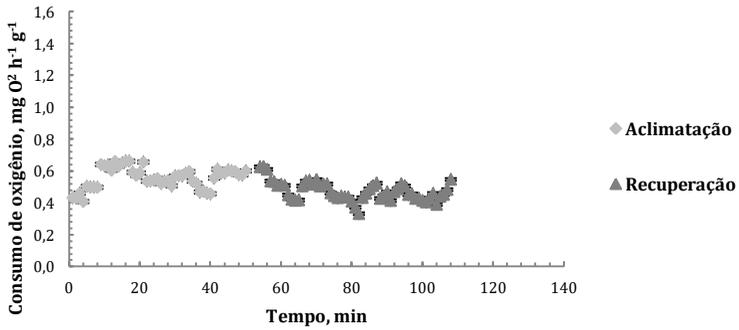
Em todos os tratamentos, o consumo de oxigênio foi similar durante o período de aclimação. No controle 2 (com manipulação), o consumo de oxigênio no período de recuperação após o protocolo de manipulação foi similar ao da aclimação. Nos animais expostos a etanol 3,0% e cloreto de magnésio 3,75% é possível observar um pico e em seguida uma redução abrupta no consumo de oxigênio após a adição do agente anestésico. Por outro lado, nos tratamentos hipotermia 11°C, Mix 1 e óleo de cravo, apenas uma redução direta no consumo de oxigênio é observada (Fig. 2).

Durante o período de recuperação, nos tratamentos hipotermia e cloreto de magnésio observa-se que o consumo de oxigênio foi similar ao da aclimação; enquanto que nos tratamentos etanol e Mix o consumo de oxigênio foi relativamente mais baixo no período de recuperação. No tratamento óleo de cravo, observa-se um consumo de oxigênio muito baixo por um período extenso durante a recuperação.

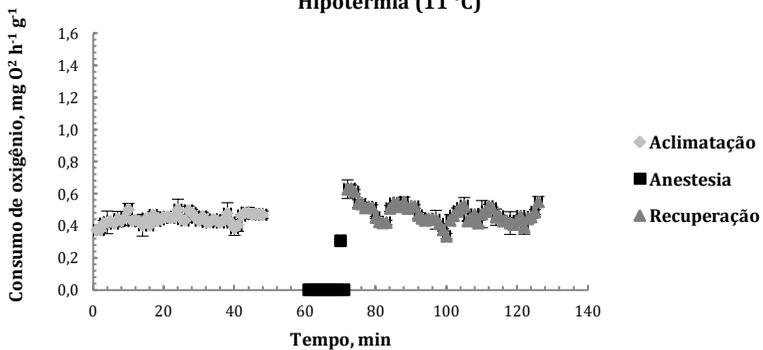
### Controle 1

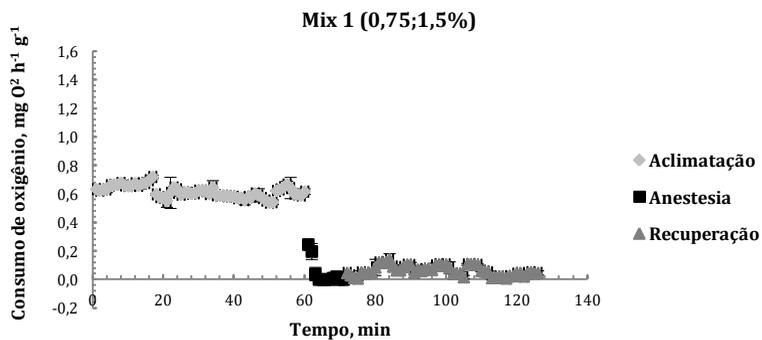
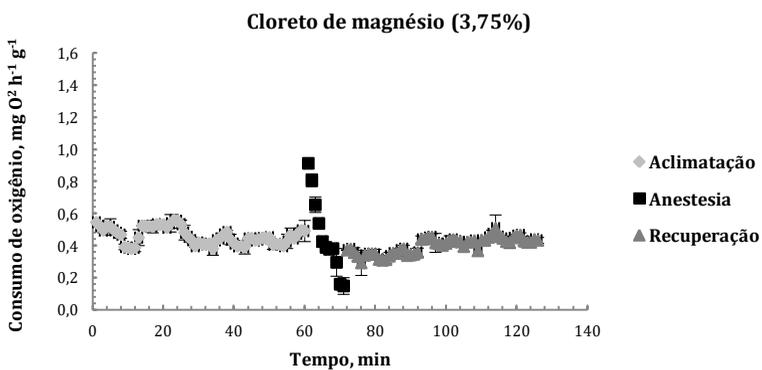
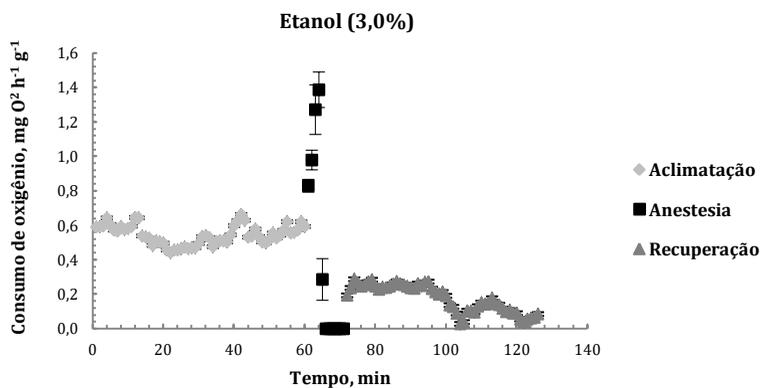


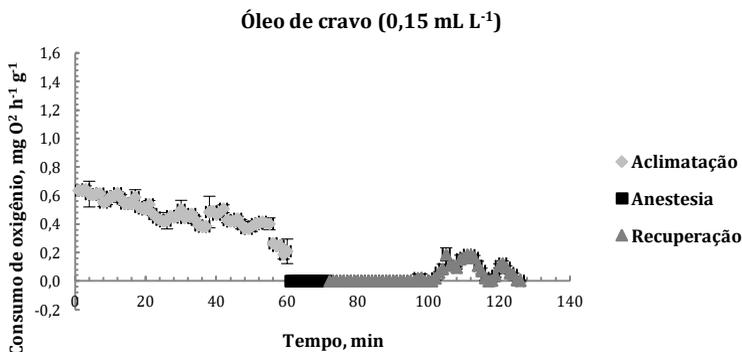
### Controle 2



### Hipotermia (11 °C)





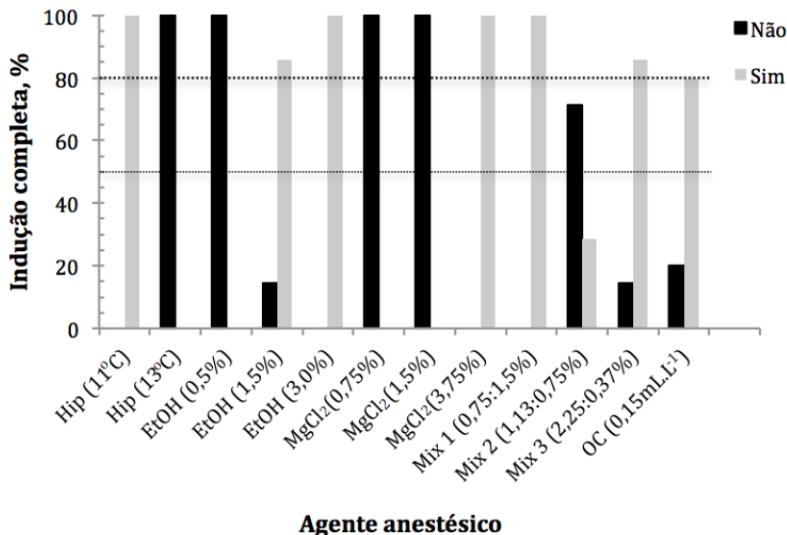


**Fig. 2.** Consumo de oxigênio antes, durante e depois da exposição de juvenis de *Octopus maya* aos diferentes agentes anestésicos e nos controles. Controle 1: sem agente anestésico e sem manipulação; Controle 2: sem agente anestésico e com manipulação; Mix: cloreto de magnésio associado a etanol.

### 3.1.2 Comportamento

Dos agentes anestésicos testados, apenas hipotermia 11 °C, etanol 3,0%, cloreto de magnésio 3,75% e Mix 1 induziram 100% dos animais a anestesia no tempo pré-estabelecido em 600 s. Etanol 1,5% e Mix 3 induziram a anestesia em 86% dos animais, enquanto que Mix 2 em apenas 26%. Hipotermia 13 °C, etanol 0,5% e cloreto de magnésio 0,75 e 1,5% não induziram a anestesia completa. Em animais expostos a óleo de cravo, ocorreu indução em 76% dos animais (Fig. 3), entretanto, em todos os animais observaram-se reações adversas, como tentativas de escapes, contração violenta do manto, alterações rápidas de coloração, movimentos erráticos, aumento exagerado das papilas, formato lageniforme (em formato de garrafa) do manto e liberação de tinta.

Os tempos de indução foram semelhantes entre as substâncias testadas, com exceção de animais expostos a etanol 3,0% e óleo de cravo, que foram relativamente mais baixos que o tempo de indução dos animais expostos a Mix 3 ( $p < 0,05$ ). Os tempos de recuperação dos animais expostos a hipotermia 11 °C, etanol 1,5% e Mix 3 foram relativamente mais baixos quando comparados aos tempos de recuperação dos animais expostos ao Mix 2 ( $p < 0,05$ ). Os animais expostos a cloreto de magnésio 3,75% não se recuperaram no tempo pré-estabelecido em 600 s (Tabela 1).



**Fig. 3.** Porcentagem de juvenis de *Octopus maya* em que ocorreu a indução completa à anestesia quando submetidos aos diferentes agentes anestésicos e concentrações. Hip: hipotermia; EtOH: etanol; MgCl<sub>2</sub>: cloreto de magnésio; Mix: cloreto de magnésio associado a etanol; OC: óleo de cravo.

O uso de agentes anestésicos e/ou manipulação afetou a ingestão de alimento dos juvenis de *O. maya* ( $p < 0,05$ ). No tratamento controle 1, 100% dos animais se alimentaram, enquanto que no tratamento controle 2 ocorreu redução da ingestão de alimento. Após exposição a etanol 1,5 e 3,0%, mais de 80% dos animais se recuperaram e se alimentaram normalmente. Similar ao tratamento controle 2, a exposição à hipotermia 11 °C, etanol 0,5% e Mix 1, 2 e 3 permitiu que mais de 50% dos animais se alimentassem após a recuperação. Por outro lado, em animais expostos a cloreto de magnésio 1,5% a alimentação foi inibida em mais de 50% e nos animais expostos à hipotermia 13 °C essa porcentagem aumentou para 80%. Por fim, as concentrações de cloreto de magnésio 0,75% e 3,75% e óleo de cravo inibiram a alimentação em 100% dos animais (Fig. 4).

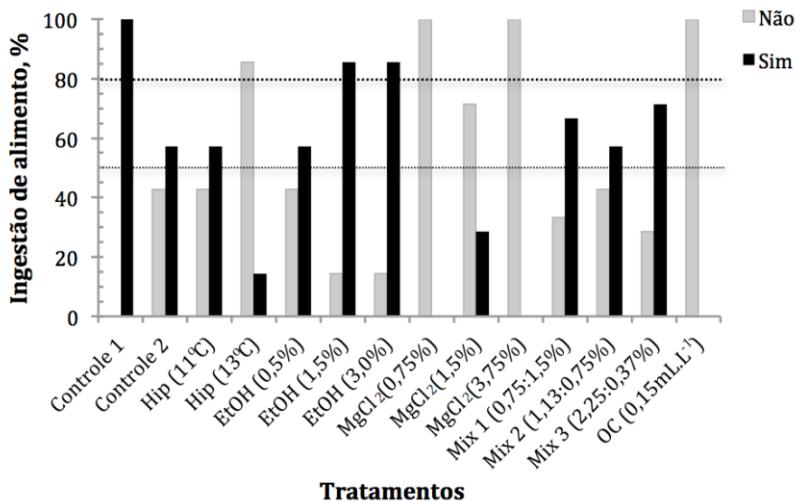
**Tabela 1**

Tempos de indução e recuperação em juvenis de *Octopus maya* expostos a diferentes agentes anestésicos e concentrações. [C]: concentração. PCT: peso corporal total (média  $\pm$  desvio padrão). Controle 1: sem agente anestésico e sem manipulação; Controle 2: sem agente anestésico e com manipulação; Hip: hipotermia; EtOH: etanol; MgCl<sub>2</sub>: cloreto de magnésio; Mix: cloreto de magnésio associado a etanol; OC: óleo de cravo.

Tratamentos	[C]	PCT (g)	Tempo de indução (s)	Tempo de recuperação(s)
Controle 1	n/a	2,80 $\pm$ 0,63	n/a	n/a
Controle 2	n/a	3,04 $\pm$ 0,94	n/a	n/a
Hip	11°C	3,04 $\pm$ 1,30	314,43 $\pm$ 81,78 <sup>ab</sup>	78,57 $\pm$ 79,08 <sup>a</sup>
	13°C	2,85 $\pm$ 0,39	n/a	n/a
EtOH	0,5%	2,99 $\pm$ 0,88	n/a	n/a
	1,5%	2,88 $\pm$ 1,23	346,17 $\pm$ 79,36 <sup>ab</sup>	72,00 $\pm$ 32,91 <sup>a</sup>
MgCl <sub>2</sub>	3,0%	2,88 $\pm$ 0,84	241,57 $\pm$ 46,39 <sup>a</sup>	146,43 $\pm$ 63,29 <sup>ab</sup>
	0,75%	3,31 $\pm$ 0,93	n/a	n/a
	1,5%	3,07 $\pm$ 0,44	n/a	n/a
	3,75%	2,99 $\pm$ 0,85	323,40 $\pm$ 51,87 <sup>ab</sup>	>600
Mix 1	0,75:1,5%	3,05 $\pm$ 0,54	336,00 $\pm$ 49,92 <sup>ab</sup>	128,17 $\pm$ 53,50 <sup>ab</sup>
Mix 2	1,13:0,75%	3,18 $\pm$ 0,74	493,00 $\pm$ 50,91 <sup>b</sup>	56,00 $\pm$ 19,80 <sup>a</sup>
Mix 3	0,37:2,25%	3,57 $\pm$ 1,24	385,83 $\pm$ 69,86 <sup>ab</sup>	225,00 $\pm$ 75,34 <sup>b</sup>
OC	0,15mL.L <sup>-1</sup>	1,76 $\pm$ 0,66	236,20 $\pm$ 27,23 <sup>a</sup>	144,20 $\pm$ 39,47 <sup>ab</sup>

\* n/a: não aplicável.

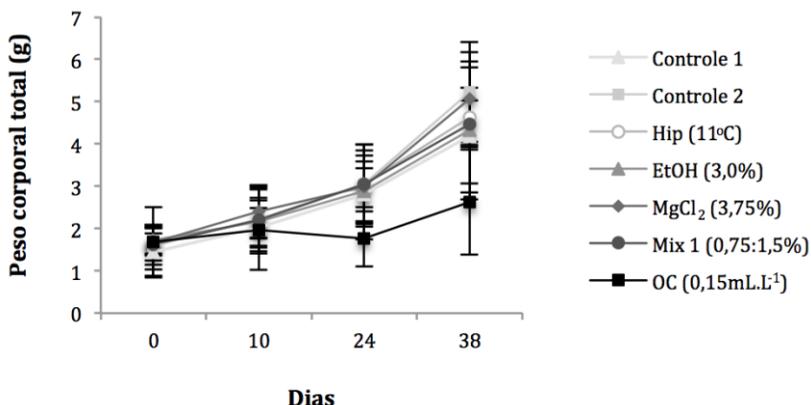
Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos (P<0,05).



**Fig. 4.** Ingestão de alimento por juvenis de *Octopus maya* após exposição aos diferentes agentes anestésicos e nos controles. Controle 1: sem agente anestésico e sem manipulação; Controle 2: sem agente anestésico e com manipulação; Hip: hipotermia; EtOH: etanol; MgCl<sub>2</sub>: cloreto de magnésio; Mix: cloreto de magnésio associado a etanol; OC: óleo de cravo.

### 3.1.3 Crescimento

O crescimento de juvenis de *O. maya* foi semelhante em todos os tratamentos, inclusive nos controles, com exceção dos animais expostos ao óleo de cravo ( $p < 0,05$ ), que apresentaram redução do crescimento após a exposição ao agente anestésico (Fig. 5).



**Fig. 5.** Crescimento dos juvenis de *Octopus maya* expostos aos diferentes agentes anestésicos e concentrações. Controle 1: controle, sem agente anestésico e sem manipulação; Controle 2: controle, sem agente anestésico e com manipulação; Hip: hipotermia; EtOH: etanol; MgCl<sub>2</sub>: cloreto de magnésio; Mix: cloreto de magnésio associado a etanol; OC: óleo de cravo.

### 3.2 Experimento 2: Anestesia em adultos

Os tempos de indução e recuperação e o peso corporal total de adultos de *O. maya* são apresentados na Tabela 2. Em animais expostos a hipotermia, não ocorreu a indução completa em 66,6% dos animais analisados. Os tempos de indução dos animais expostos a etanol e cloreto de magnésio foram semelhantes e mais baixos em comparação aos animais expostos ao Mix. Por outro lado, os tempos de recuperação dos animais expostos a cloreto de magnésio foram mais elevados quando comparados aos animais expostos a etanol e Mix. Um dos animais expostos ao cloreto de magnésio morreu durante à exposição ao agente anestésico.

**Tabela 2**

Tempos de indução e de recuperação em adultos de *Octopus maya* expostos a diferentes agentes anestésicos e concentrações. [C]: concentração; PCT: peso corporal total (média  $\pm$  desvio padrão). Hip: hipotermia; EtOH: etanol; MgCl<sub>2</sub>: cloreto de magnésio; Mix: cloreto de magnésio associado a etanol.

Agente anestésico	[C]	PCT (g)	Tempo de indução (s)	Tempo de recuperação (s)
Controle	n/a	813,40 $\pm$ 539,00	n/a	n/a
Hip	11°C	724,60 $\pm$ 674,00	n/a	n/a
EtOH	3,0%	887,40 $\pm$ 482,00	372,20 $\pm$ 71,90 <sup>a</sup>	289,60 $\pm$ 101,55 <sup>a</sup>
MgCl <sub>2</sub>	7,5%	1.323,80 $\pm$ 1.011,00	430,40 $\pm$ 18,31 <sup>a</sup>	630,50 $\pm$ 315,90 <sup>b</sup>
Mix	0,75:1,5%	1.040,80 $\pm$ 732,00	936,00 $\pm$ 414,46 <sup>b</sup>	213.80 $\pm$ 34.21 <sup>a</sup>

\* n/a: não aplicável.

Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos (p<0,05).

#### 4. Discussão

O estudo de diferentes agentes anestésicos e concentrações nas principais espécies de cefalópodes torna-se fundamental para o adequado manejo destes animais em situações de cultivo. Alguns cefalópodes são difíceis de manipular sem nenhuma sedação, seja para pesagem, coleta de amostras ou procedimentos cirúrgicos (Oestmann et al., 1997). Além disso, na União Europeia, cefalópodes (juvenis e adultos) utilizados para propósitos científicos foram incluídos na legislação de bem estar animal juntamente com os vertebrados (EU, 2010), causando impacto direto ou indireto na comunidade científica (Sykes et al., 2012; Smith et al., 2013).

Um agente anestésico ideal deve ser um bom relaxante muscular, conter propriedades anestésicas e analgésicas e induzir a inconsciência (Polese et al., 2014), além de permitir rápida indução e recuperação sem efeitos adversos (Gleadall, 2013a; Fiorito et al., 2015). Diversas substâncias têm sido comumente utilizadas como anestésicos em cefalópodes (Gonçalves et al., 2012; Gleadall, 2013a; Fiorito et al., 2015). Entretanto, apesar da existência de vários estudos envolvendo anestesia, abordando pelo menos 17 substâncias, informações sobre quais delas promovem anestesia de maneira mais efetiva e em diferentes espécies de cefalópodes ainda são escassos (Fiorito et al., 2015).

Dentre os agentes anestésicos, etanol e cloreto de magnésio, utilizados separados ou em combinação são os mais comumente utilizados (Messenger et al., 1985; Gleadall, 2013; Fiorito et al., 2014; 2015). O etanol, em concentrações de 1,0 a 3,0% em água do mar, tem sido empregado com sucesso na anestesia de diversos cefalópodes (Gleadall, 2013a; Fiorito et al., 2015). Entretanto, alguns autores relataram reações adversas após a imersão inicial, como, por exemplo, tentativas de escapes e liberação de tinta (Froesch e Marthy 1975; Andrews e Tansey, 1981). Além disso, indução inadequada (incompleta) pode ocorrer em temperaturas baixas (Gleadall, 2013a), devido à redução do efeito narcotizante do etanol (Moore et al., 1964).

O cloreto de magnésio, assim como o etanol, é um anestésico de custo relativamente baixo, de fácil acesso e manipulação. Em cefalópodes, possivelmente é o agente anestésico mais amplamente estudado, com resultados satisfatórios em diversas espécies de diferentes sexos, idades e tamanhos (Messenger et al., 1985; Gore et al., 2005; Scimeca, 2011; Gonçalves et al., 2012; Gleadall, 2013a; Fiorito et al., 2015) inclusive em anestesia de longa duração (Mooney et al., 2010). Entretanto, em alguns casos, também registraram-se reações estressantes e liberação de tinta (Garcia-Franco, 1992).

Outros agentes anestésicos utilizados em cefalópodes são a hipotermia e o óleo de cravo. A hipotermia possui a vantagem de não utilizar drogas químicas, evitando assim seus potenciais efeitos (Gleadall, 2013a), sendo comumente utilizada para ‘tranquilizar’ peixes e cefalópodes (Ross e Ross, 2008; Sykes et al., 2012). Em contrapartida, a manutenção da água na temperatura desejada pode ser difícil, além dos animais apresentarem condição mais rígida do corpo (Andrews e Tansey, 1981) e possivelmente não ser efetiva em espécies de águas frias (Sykes et al., 2012). A utilização deste agente em procedimentos potencialmente invasivos é questionável (West et al., 2007), por não produzir indução adequada e não ser considerada um anestésico (Sykes et al., 2012; Gleadall, 2013a).

O óleo de cravo é utilizado com sucesso em várias espécies de peixes e invertebrados (Ross e Ross, 2008), entretanto seu uso em cefalópodes é controverso. Resultados satisfatórios foram observados em *Octopus minor* (Seol et al., 2007). Por outro lado, em *Octopus vulgaris*, não ocorreu nenhum efeito anestésico aparente (Estefanell et al., 2011) e em *Dorytheutis pealeii* e *Sepia officinalis* reações altamente estressantes e mortalidade foram registradas.

No presente estudo, dentre todas as substâncias analisadas, apenas hipotermia 11 °C, etanol 3,0%, cloreto de magnésio 3,75% e Mix 1

induziram a anestesia completa em 100% dos animais no tempo pré-estabelecido em 600 s. Em testes prévios realizados com óleo de cravo, similarmente aos resultados observados por Estefanell et al. (2011), não foi observado nenhum efeito anestésico utilizando-se uma concentração de  $0,05 \text{ mL L}^{-1}$ , assim, optou-se pela utilização da concentração de  $0,15 \text{ mL L}^{-1}$  (Gonçalves et al., 2012). Entretanto, em animais expostos à esta concentração, observaram-se reações altamente estressantes similares às descritas por Gleadall et al. (2013a), nomeadas como ‘padrão de resposta adversa típica’ (TARP). Este conjunto de reações é comum em animais expostos a concentrações mais elevadas ou exposições prolongadas a algumas substâncias (Gleadall, 2013a).

O consumo de oxigênio tem sido utilizado para avaliar o efeito de anestésicos em peixes (Ross e Ross, 1983; Hill e Forster, 2005; Hoskonen e Pirhonen, 2005). O potencial do uso de óleo de cravo em baixas concentrações com o propósito de reduzir o consumo de oxigênio durante o transporte em diferentes espécies de peixes foi avaliado por Hoskonen e Pirhonen (2005). Os autores observaram menor consumo de oxigênio em 5 das 6 espécies expostas ao agente anestésico quando comparados a animais não expostos, sendo as maiores diferenças detectadas após 3 h de exposição. Entretanto, o estudo não avaliou o consumo durante o início da sedação.

Em cefalópodes, o decréscimo na taxa respiratória, com eventual interrupção da respiração é considerado um dos critérios utilizados para avaliar a anestesia (Gleadall, 2013a; Fiorito et al., 2015). Assim, em uma sedação apropriada, redução no consumo de oxigênio e nos compostos nitrogenados são esperados, devido aos baixos níveis de atividade do animal (Gleadall, 2013b).

Messenger et al. (1985) observaram que a indução de cefalópodes à anestesia com cloreto de magnésio, similarmente ao etanol, ocorre após um curto período de hiperventilação, seguido por hipoventilação e eventual interrupção da respiração. Resultados semelhantes no consumo de oxigênio durante a exposição a estes agentes anestésicos foram obtidos no presente estudo em juvenis de *O. maya*. Por outro lado, uma redução direta no consumo de oxigênio foi observada quando os animais foram expostos à hipotermia e óleo de cravo.

A utilização de substâncias e/ou concentrações inadequadas como anestésicos pode produzir efeitos contrários aos desejados e reações estressantes. Entretanto, em alguns casos, tais reações podem estar relacionadas ao estresse de captura ou manejo antes da exposição, sendo, muitas vezes, difícil distinguir entre os efeitos diretos dos agentes anestésicos e os referentes à manipulação prévia dos animais (Ross e

Ross, 2008). A exposição a um estímulo, pode ocasionar consequências fisiológicas e comportamentais importantes nos animais, podendo prejudicar a ingestão de alimento, crescimento, reprodução e outros aspectos importantes no desempenho a longo prazo (Ross e Ross, 2008).

Além dos efeitos diretos, podem ocorrer efeitos secundários a um determinado estímulo, como por exemplo, alterações decorrentes da hipoventilação e hipóxia em animais expostos a agentes anestésicos (Hill e Forster, 2005). Gleadall (2013b), avaliando o transporte de longa duração em *Watasenia scintillans* sob 3 diferentes concentrações de sulfato de magnésio (10, 20 e 30 mmol<sup>-1</sup>, aproximadamente 0,3 e 0,7%), observou que a maior concentração foi responsável pelas primeiras mortalidades de lulas durante todo o período de transporte (80 h). O autor atribuiu a mortalidade aos efeitos crônicos do agente anestésico nos centros respiratórios dos animais.

No presente estudo, alterações na ingestão de alimento nos animais expostos aos agentes anestésicos foram observadas, sendo que o cloreto de magnésio e o óleo de cravo foram as substâncias que mais inibiram a alimentação dos animais (71 a 100%). Em contrapartida, em animais expostos a etanol (1,5 e 3,0%) a ingestão de alimento foi elevada, sendo inclusive, maior que a observada no controle 2. Em animais expostos ao óleo de cravo foi possível observar um período de hipoventilação prolongado durante grande parte do período de recuperação, refletido no consumo de oxigênio. É possível que tenha ocorrido um efeito crônico nos animais decorrente da exposição a este agente anestésico, afetando diretamente no crescimento. Com exceção do óleo de cravo, o crescimento dos juvenis de *O. maya* não foi afetado pelas substâncias testadas.

Outro fator importante a ser considerado na escolha de um agente anestésico apropriado a determinada espécie, são os tempos de indução e recuperação da anestesia. Em peixes, recomenda-se que estes tempos sejam rápidos, preferivelmente menos de 3 e 5 min, para indução e recuperação, respectivamente (Ross e Ross, 2008). Os tempos de indução observados no presente estudo, em geral, foram semelhantes nas diferentes substâncias testadas, variando entre 3 (EtOH 3,0%) e 8 min (Mix 2). Por outro lado, os tempos de recuperação variaram entre 1 min (hip 11 °C) e 4 min (Mix 3). Os animais expostos a cloreto de magnésio 3,75% não se recuperaram no tempo pré-estabelecido de 10 min. No caso da combinação Mix 3, provavelmente ocorreu maior efeito do etanol (2,25%) na indução dos animais, já que resultados semelhantes foram observados em animais expostos somente a etanol 1,5%.

Em adultos, os tempos de indução e recuperação de todos os agentes anestésicos foram mais altos em relação aos observados em juvenis, inclusive em animais expostos ao cloreto de magnésio, nos quais utilizou-se o dobro da concentração (7,5%). Os tempos de indução variaram em torno de 6 e 7 min em animais expostos à etanol e cloreto de magnésio, respectivamente, e ultrapassaram mais de 15 min em animais expostos à combinação destas duas substâncias. Resultados semelhantes foram obtidos com etanol como anestésico em *O. vulgaris* por Gleadall (2013a), contudo, este autor analisou apenas um espécime nesta concentração. Por outro lado, para a mesma espécie Estefanell et al. (2011) observaram tempos de indução menores em animais expostos a concentrações também menores.

Em relação aos animais expostos ao cloreto de magnésio, decidiu-se aumentar a concentração em adultos, já que em testes prévios observou-se que a indução com 3,75% era superior a 600 s. Entretanto, com a concentração de 7,5% observou-se a mortalidade de um animal durante a anestesia, sugerindo que apesar dos resultados satisfatórios nos tempos de indução e recuperação em adultos, provavelmente esta concentração seja muito alta, apesar da dose letal documentada para cefalópodes ser de 10% documentada por Lewbart et al (2012).

Alguns autores sugerem que sais de magnésio não são capazes de produzir sedação adequada e analgesia pelo bloqueio da transmissão nervosa e liberação de neurotransmissores, atuando somente como bloqueadores neuromusculares (Clark et al., 1996; Polese et al., 2014). O uso de bloqueadores neuromusculares, que poderiam interromper ou restringir a capacidade de um animal de manifestar-se a estímulos dolorosos, sem um nível adequado de anestesia e analgesia não é recomendável do ponto de vista do bem estar animal (Fiorito et al., 2015). Portanto, estudos sobre o entendimento dos mecanismos de ação dos principais agentes anestésicos em cefalópodes são urgentes e necessários para a definição de substâncias adequadas (Fiorito et al., 2014).

## 5. Conclusão

Em qualquer situação, é importante considerar se a anestesia ou sedação são estritamente necessárias. A partir dos resultados obtidos no presente estudo, não é necessário o uso de agentes anestésicos para a manipulação de curto prazo (até 180 s) de juvenis e adultos de *O. maya*. Em espécimes adultos de grande tamanho (acima de 1,0 kg), nos quais a

manipulação pode ser dificultada, sugere-se o uso de etanol 3,0% como agente anestésico.

## 6. Agradecimentos

Este trabalho é parte da tese de doutorado de K. Roumbedakis. Os autores agradecem o apoio financeiro através dos projetos Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) Ciências do Mar 43/2013, UNAM e pela bolsa de Doutorado e Doutorado Sanduíche concedida a K. Roumbedakis (6419/2014-03). Agradecemos ao Conselho Nacional Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de Produtividade em Pesquisa concedida a M.L. Martins. Agradecemos também pela assistência técnica Claudia Caamal-Monsreal (UMDI-SISAL).

## 7. Referências

- Andrews, P.L.R., Tansey, E.M., 1981. The effects of some anesthetic agents in *Octopus vulgaris*. *Comp. Biochem. Physiol.* 70, 241–247.
- Ávila-Poveda, O.H., Colín-Flores, R.F., Rosas, C., 2009. Gonad development during the early life of *Octopus maya* (Mollusca: Cephalopoda). *Biol. Bull.* 216, 94–102.
- Caamal-Monsreal, C., Mascaró, M., Gallardo, P., Rodríguez, S., Noreña-Barroso, E., Domingues, P., Rosas, C., 2015. Effects of maternal diet on reproductive performance of *O. maya* and its consequences on biochemical characteristics of the yolk, morphology of embryos and hatchling quality. *Aquaculture* 441, 84–94.
- Clark, T.R., Nossov, P.C., Apland, J.P., 1996. Anesthetic agents for use in the invertebrate sea snail, *Aplysia californica*. *Contemp. Top. Lab. Anim. Sci.* 35, 75–79.
- Estefanell, J., Socorro, J., Afonso, J.M., Roo, J., Fernández-Palacios, H., Izquierdo, M.S., 2011. Evaluation of two anaesthetic agents and the passive integrated transponder tagging system in *Octopus vulgaris* (Cuvier 1797). *Aquac. Res.* 42, 399–406.
- EU, 2010. Directive 2010/63/EU Of The European Parliament and of the Council of 22 September 2010 On the Protection of Animals used for Scientific Purposes. *Official Journal of European Union* L276: 33–79.
- Fiorito, G., Affuso, A., Anderson, D.B., Basil, J., Bonnaud, L., Botta, G., Cole, A., D'Angelo, L., De Girolamo, P., Dennison, N., Dickel,

- L., Di Cosmo, A., Di Cristo, C., Gestal, C., Fonseca, R., Grasso, F., Kristiansen, T., Kuba, M., Maffucci, F., Manciocco, A., Mark, F.K., Melillo, D., Osorio, D., Palumbo, A., Perkins, K., Ponte, G., Raspa, M., Shashar, N., Smith, J., Smith, D., Sykes, A., Villanueva, R., Tublitz, N., Zullo, L., Andrews, P.L.R., 2014. Cephalopods in neuroscience: Regulations, Research and the 3Rs. *Invert. Neurosci.* 14, 13–36.
- Fiorito, G., Affuso, A., Basil, J., Cole, A., Girolamo, P., D'Angelo, L., Dickel, L., Gestal, C., Grasso, F., Kuba, M., Mark, F., Melillo, D., Osorio, D., Perkins, K., Ponte, G., Shashar, N., Smith, D., Smith, J., Andrews, P.L.R. 2015. Guidelines for the Care and Welfare of Cephalopods in Research – A consensus based on an initiative by CephRes, FELASA and the Boyd Group. *Lab. Anim.* 49, 1–90.
- Froesch, D., Marthy, H.J., 1975. The structure and function of the oviducal gland in octopods (Cephalopoda). *P. Roy. Irish Acad. B* 188, 95–101.
- García-Franco, M., 1992. Anaesthetics for the squid *Sepioteuthis sepioidea* (Mollusca: Cephalopoda). *Comp. Biochem. Physiol. C Comp. Pharmacol.* 103, 121–123.
- Gleadall, I.G., 2013a. The effects of prospective anaesthetic substances on cephalopods: Summary of original data and a brief review of studies over the last two decades. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 447, 23–30.
- Gleadall, I.G., 2013b. Low dosage of magnesium sulphate as a long-term sedative during transport of firefly squid, *Watasenia scintillans*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 447, 138–139.
- Gonçalves, R.A., Aragão, C., Frias, P.A., Sykes, A.V., 2012. The use of different anaesthetics as welfare promoters during short-term human manipulation of European cuttlefish (*Sepia officinalis*) juveniles. *Aquaculture* 370–371, 130–135.
- Gore, S.R., Harms, C.A., Kukanich, B., Forsythe, J., Lewbart, G.A., Papich, M.G., 2005. Enrofloxacin pharmacokinetics in the european cuttlefish, *Sepia officinalis*, after a single injection and bath administration. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 28, 433–439.
- Gunkel, C., Lewbart, G.A., 2007. Invertebrates. In: West, G., Heard, D., Caulkett, N. (Eds.), *Zoo Animal and Wildlife Immobilization and Anesthesia*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, pp. 145–158.
- Harms, C.A., Lewbart, G.A., McAlarney, R., Christian, L.S., Geissler, K., Lemos, C., 2006. Surgical excision of mycotic (*Cladosporium* sp.) granulomas from the mantle of a cuttlefish (*Sepia officinalis*). *J. Zoo Wildlife Med.* 37, 524–530.

- Hill, J.V., Forster, M.E., 2004. Cardiovascular responses of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) during rapid anaesthetic induction and recovery. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 137, 167–177.
- Hoskonen, P., Pirhonen, J., 2006. Effects of repeated handling with or without anaesthesia, on feed intake and growth in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquac. Res.* 37, 409–415.
- Ikeda, Y., Sugimoto, C., Yonamine, H., Oshima, Y., 2009. Method of ethanol anaesthesia and individual marking for oval squid (*Sepioteuthis lessoniana* Férussac, 1831 in Lesson 1830-1831). *Aquac. Res.* 41, 157–160.
- Juárez, O.E., Galindo, C.E., Díaz, F., Re, A.D., Sanchez-García, A.M., Caamal-Monsreal, C., Rosas, C., 2015. Is temperature conditioning *Octopus maya* fitness? *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 467, 71–76.
- Juárez, O.E., Hau, V., Caamal-Monsreal, C., Galindo-Sánchez, C.E., Díaz, F., Re, D., Rosas, C., 2016. Effect of maternal temperature stress before spawning over the energetic balance of *Octopus maya* juveniles exposed to a gradual temperature change, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 474, 39–45.
- Lewbart, G.A., Mosley, C., 2012. Clinical anesthesia and analgesia in invertebrates. *J. Exot. Pet Med.* 21, 59–70.
- Messenger, J.B., Nixon, M., Ryan, K.P., 1985. Magnesium chloride as an anesthetic for cephalopods. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 82, 203–205.
- Mooney, T.A., Lee, W.J., Hanlon, R.T., 2010. Long-duration anesthetization of squid (*Doryteuthis pealeii*). *Mar. Freshw. Behav. Physiol.* 43, 297–303.
- Moore, J.W., Ulbricht, W., Takata, M., 1964. Effect of ethanol on the sodium and potassium conductances of the squid axon membrane. *J. Gen. Physiol.* 48, 279–295.
- Noyola, J., Caamal-Monsreal, C., Díaz, F., Re, A.D., Sánchez, A., Rosas, C., 2013. Thermal preference, tolerance and metabolic rate of early juveniles of *Octopus maya* exposed to different acclimation temperatures. *J. Therm. Biol.* 38, 14–19.
- Oestmann, D.J., Scimeca, J.M., Forsythe, J., Hanlon, R., Lee, P., 1997. Special considerations for keeping cephalopods in laboratory facilities. *Contemp. Top. Lab. Anim. Sci.* 36, 89–93.
- Polese, G., Winlow, W., Di Cosmo, A., 2014. Dose-dependent effects of the clinical anesthetic isoflurane on *Octopus vulgaris*: A contribution to cephalopod welfare. *J. Aquat. Anim. Health* 26, 285–294.

- Rosas, C., Cuzon, G., Pascual, C., Gaxiola, G., Chay, D., Lopez, N., Maldonado, T., Domingues, P.M., 2007. Energy balance of *Octopus maya* fed crab or an artificial diet. *Mar. Biol.* 152, 371–381.
- Rosas, C., Tut, J., Baeza, J., Sánchez, A., Sosa, V., Pascual, C., Arena, L., Domingues, P., Cuzon, G., 2008. Effect of type of binder on growth, digestibility, and energetic balance of *Octopus maya*. *Aquaculture* 275, 291–297.
- Rosas, C., Valero, A., Caamal-Monsreal, C., Uriarte, I., Farias, A., Gallardo, P., Sánchez, A., Domingues, P. 2012. Effects of dietary protein sources on growth, survival and digestive capacity of *Octopus maya* juveniles (Mollusca: Cephalopoda). *Aquac. Res.* 44, 1029–1044.
- Rosas, C., Gallardo, P., Mascaró, M., Caamal-Monsreal, C., Pascual, C. 2014. *Octopus maya*. In: Iglesias, J., Fuentes, L., Villanueva, R. (Eds.), *Cephalopod culture*. Springer: Dordrecht, Heidelberg, New York, London, pp. 383–396.
- Ross, B., Ross, L.G., 1983. The oxygen requirements of *Oreochromis niloticus* under adverse conditions, *Proceedings of the First International Symposium on Tilapia in Aquaculture*, Nazareth, Israel, pp. 134–143.
- Ross, L.G., Ross, B., 2008. *Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals*. 3. ed. Blackwell Science: Oxford, 240 p.
- Scimeca, J.M., 2011. Cephalopods. In: Lewbart, G.A. (Ed.), *Invertebrate Medicine*. Blackwell Wiley: Oxford, UK, pp. 113–125.
- Seol, D.W., Lee, J., Im, S.Y., Park, I.S., 2007. Clove oil as an anaesthetic for common octopus (*Octopus minor*, Sasaki). *Aquac. Res.* 38, 45–49.
- Smith, J.A., Andrews, P.L.R., Hawkins, P., Louhimies, S., Ponte, G., Dickel, L., 2013. Cephalopod research and EU Directive 2010/63/EU: Requirements, impacts and ethical review. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 447, 31–45.
- Sykes, A.V., Baptista, F.D., Gonçalves, R.A., Andrade, J.P., 2012. Directive 2010/63/EU on animal welfare: a review on the existing scientific knowledge and implications in cephalopod aquaculture research. *Rev. Aquac.* 4, 142–162.
- Tercero, J.F., Rosas, C., Mascaró, M., Poot, G., Domingues, P., Noreña, E., Caamal-Monsreal, C., Pascual, C., Estefanell, J., Gallardo, P., 2015. Effects of parental diets supplemented with different lipid sources on *Octopus maya* embryo and hatching quality. *Aquaculture* 448, 234–242.

- West, G., Heard, D., Caulkett, N. 2007. *Zoo Animal & Wildlife: Immobilization and Anesthesia*. Blackwell Publishing: Iowa, p. 718.
- Zar, J.H., 1999. *Biostatistical Analysis*, 4 ed. Upper Saddle River, New Jersey, p. 662.

## CAPÍTULO V

### **Avaliação de diferentes agentes anestésicos sobre os parâmetros de hemolinfa de *Octopus maya* (Cephalopoda: Octopodidae)**

Katina Roumbedakis<sup>a\*</sup>, Marina N. Alexandre<sup>a</sup>, Cristina Pascual<sup>b</sup>,  
Maurício L. Martins<sup>a</sup>, Carlos Rosas<sup>b</sup>

<sup>a</sup>*Laboratório AQUOS - Sanidade de Organismos Aquáticos, Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Rod. Admar Gonzaga, 1346, 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil.*

<sup>b</sup>*Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Puerto de Abrigo s/n, Sisal, 97355, Hunucmá, Yucatán, México.*

\*Correspondência: Laboratório AQUOS - Sanidade de Organismos Aquáticos, Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Rod. Admar Gonzaga, 1346, 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil. *E-mail:* katina.roumbedakis@gmail.com

#### **Highlights**

- Primeiro estudo a avaliar o efeito de anestésicos nos parâmetros de hemolinfa de cefalópodes.
- Agentes anestésicos alteram os parâmetros de hemolinfa de *O. maya*.
- Recomenda-se cautela na escolha do anestésico quando os parâmetros de hemolinfa são requeridos.

Artigo redigido de acordo com as normas da Revista **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** (Qualis B1, Fator de impacto: 1,866).



## RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos de agentes anestésicos sob os parâmetros de hemolinfa de *Octopus maya*. Réplicas de 6 polvos foram usados para testar cada agente anestésico: hipotermia 11 °C, etanol 3,0%, cloreto de magnésico 7,5% e cloreto de magnésio associado a etanol 0,75:1,5%. Após a anestesia, a hemolinfa foi obtida diretamente da aorta cefálica. Os parâmetros de hemolinfa analisados foram: capacidade osmótica, concentração de hemocianina, metabólitos plasmáticos (proteína, colesterol, acilglicerídeos, glicose e lactato), contagem total de hemócitos, atividade aglutinante e atividade de fenoxidase. Os agentes anestésicos acarretaram em diferenças significativas na capacidade osmótica, metabólitos plasmáticos e imunológicos, sendo a capacidade osmótica o parâmetro em que ocorreram as maiores alterações. Os diferentes agentes anestésicos, em geral, ocasionaram alterações significativas na osmolalidade da água do mar e nos parâmetros de hemolinfa de *O. maya*. Recomenda-se a realização de estudos complementares para determinar com maior precisão as consequências decorrentes destas alterações a curto e longo prazo. Além disso, quando os parâmetros de hemolinfa forem necessários a escolha do agente anestésico a ser utilizado deve ser feito com cautela.

**Palavras-chave:** anestesia, hemolinfa, cefalópodes, bem-estar.

### 1. Introdução

Anestésicos são utilizados durante o manejo, seleção, marcação, reprodução artificial e procedimentos cirúrgicos, com finalidade de facilitar o manejo, reduzir os problemas induzidos pelo estresse, como inibição da alimentação e imunossupressão, além de promover o bem estar animal (Ross e Ross, 2008). Os agentes anestésicos mais comumente utilizados em cefalópodes são etanol e cloreto de magnésio, utilizados separadamente ou em conjunto (Fiorito et al., 2014), além de hipotermia (Mooney et al., 2010; Lewbart et al., 2012; Gleadall, 2013a), apesar de não ser considerada de fato um anestésico.

Em peixes, sabe-se que alguns anestésicos podem agir como estressores e influenciar nos parâmetros sanguíneos, como proteína total, glicose, cortisol e aminoácidos (Cataldi et al., 1998; Wagner et al., 2003; Davis e Griffin, 2004). Assim, quando a análise de hemolinfa for

necessária, a escolha do agente anestésico deve ser feita de maneira a não alterarem estes parâmetros.

Apesar de alguns estudos fornecerem informações sobre os efeitos de agentes estressores sobre os parâmetros de hemolinfa em cefalópodes (Malham et al., 1998; 2002), até a presente data, não se tem conhecimento de nenhum estudo que relacione a influência dos agentes anestésicos nestes parâmetros. Desta maneira o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos dos principais agentes anestésicos nos parâmetros de hemolinfa de *Octopus maya*.

## 2. Materiais e métodos

Este estudo foi previamente submetido e aprovado pelo *Comité de Ética de Experimentos Animales* da *Facultad de Química* da *Universidad Nacional Autónoma de México* (UNAM, Sisal) (Permissão Número: Oficio / FQ / CICUAL / 099 / 15).

### 2.1 Animais

Espécimes de *O. maya* (> 300 g) foram capturados por meio de uma técnica de pesca artesanal conhecida como “*gareteo*”, em frente ao porto de Sisal (Península de Yucatán, México). Nesta técnica, são utilizadas pequenas embarcações com duas varas de bambu, uma na proa e outra na popa, deixadas à deriva. Em cada vara são presas linhas de pesca de nylon com siris na extremidades livres usados como isca (Solís-Ramírez et al., 1999). Quando o polvo captura o siri, o pescador observa uma certa tensão na linha e a recolhe imediatamente, capturando o polvo com as mãos, sem causar-lhe danos.

Os polvos capturados foram transportados e aclimatados em tanques externos em sistema semi-aberto nas instalações da *Universidad Nacional Autónoma de México* (UNAM, Sisal), onde o experimento foi realizado. Durante o período de 14 dias de aclimação, os polvos foram mantidos em proporção sexual de 1:1, em tanques escuros circulares de 12.000 L de volume, com sistema de água do mar aerada com fluxo contínuo (máximo de 30 animais por tanque). Tubos de PVC (4 polegadas de diâmetro) foram usados como refúgios. Os polvos foram alimentados duas vezes ao dia com siri *Callinectes sapidus* congelado. Restos de comida não ingerida e fezes foram removidos diariamente e os parâmetros de qualidade da água foram monitorados e mantidos dentro do recomendado para a espécie (Rosas et al., 2014).

## 2.2 Agentes anestésicos e critérios para anestesia

Os agentes anestésicos e concentrações foram selecionados com base em experimentos prévios com juvenis e adultos de *O. maya* (Roumbedakis et al., submetido). Réplicas de 6 polvos foram usados para testar cada agente anestésico: hipotermia (Hip) 11 °C, etanol (EtOH) 3,0%, cloreto de magnésico (MgCl<sub>2</sub>) 7,5% e cloreto de magnésio associado a etanol (Mix) 0,75:1,5%. Antes da exposição aos agentes anestésicos, a alimentação foi suspensa por 24 h. As concentrações foram preparadas imediatamente antes do seu uso em um volume final de 10 L. Hipotermia foi obtida por meio do decréscimo da temperatura com água do mar congelada. As concentrações que continham etanol foram obtidas por diluição direta em água do mar e as que continham cloreto de magnésio foram ajustadas com volumes de água destilada e água do mar a fim de manter a salinidade similar à da água do mar utilizada durante a aclimatação.

Para verificar a anestesia geral nos polvos, foram utilizados os critérios estabelecidos por Andrews e Tansey (1981) e os estágios de anestesia e mudanças de comportamento associados foram avaliados de acordo com a tabela proposta por Gleadall (2013a).

## 2.3 Coleta e preparo da hemolinfa

Para a realização do experimento, os animais foram anestesiados até atingirem um estágio de sedação, caracterizado pela tonalidade pálida da pele, flacidez dos braços e redução/interrupção da taxa respiratória. Os animais foram imediatamente removidos do recipiente que continha o anestésico e envoltos em uma flanela úmida, deixando-se a cabeça exposta. Subsequentemente, um corte longitudinal no manto foi cuidadosamente realizado até a liberação da aorta cefálica que foi bloqueada com uma pinça de pressão para manter o pulso. A hemolinfa foi coletada usando um cateter conectado a um tubo Falcon de 5 mL, realizando-se uma leve massagem abaixo do manto para manter a pressão da hemolinfa. A hemolinfa foi usada imediatamente ou armazenada sob refrigeração (2 – 8 °C) até o uso.

O plasma foi obtido por meio da centrifugação da hemolinfa a 800 × g por 5 minutos a 4 °C. Posteriormente, o plasma foi separado e o *pellet* celular de cada amostra foi lavado duas vezes com solução SIC-EDTA (0.45 M NaCl, 10 mM KCl, 10 mM HEPES e 10 mM EDTA–Na<sub>2</sub>; pH 7,3) e centrifugado novamente como descrito acima. O *pellet*

celular foi então ressuspenso várias vezes com solução tampão de cacodilatos (10 mM ácido cacodílico, 10 mM CaCl<sub>2</sub>; pH 7,0) em volume semelhante e centrifugado a  $16.000 \times g$  por 5 min a 4 °C e o sobrenadante utilizado para as análises. Utilizou-se o plasma para avaliar os metabólitos plasmáticos e atividade aglutinante e de fenoloxidase (FO) em plasma (FOplas) e o sobrenadante de degranulado de hemócitos para avaliar a atividade de FO sistema (plasma e degranulado de hemócitos, FOsis).

#### *2.4 Análise da hemolinfa*

Os parâmetros de hemolinfa analisados foram: capacidade osmótica, concentração de hemocianina, metabólitos plasmáticos (proteína, colesterol, acilglicerídeos, glicose e lactato), contagem total de hemócitos, atividade aglutinante e atividade de fenoloxidase (FOplas e FOsis).

Para determinar a capacidade osmótica (CO), a pressão osmótica da hemolinfa, da água do tanque onde os animais foram aclimatados e da solução que continha o agente anestésico foram medidas utilizando um microosmômetro (20 µL/amostra) (3 Mo-Plus, Advanced Instruments, USA) e os resultados foram expressos em mOsm kg<sup>-1</sup>. A CO em relação à água do mar foi calculada como a diferença entre a pressão osmótica da hemolinfa e do meio externo (Lignot et al., 1999).

A concentração de hemocianina foi medida, em triplicata, utilizando-se 10 µL de hemolinfa diluída em 990 µL de solução TRIS (0,1 M; pH 8,0) em um cuvete de 10 mm e a absorbância medida em 335 nm (UV-SENSE; SLM AMINCO Mod DW). A concentração de hemocianina foi calculada usando-se um coeficiente de extinção de 17,26 calculado com base na subunidade funcional de 74 kDa (Chen e Cheng 1993 a; b).

As concentrações dos metabólitos plasmáticos colesterol, acilglicerídeos, glicose e lactato foram determinadas, em triplicata, em microplacas de 96 poços com fundo chato utilizando-se kits cromogênicos comerciais específicos (ELITech Group<sup>®</sup>). Para tanto, utilizou-se 10 µL de plasma aos quais foram adicionados 200 µL do reagente enzimático apropriado a cada amostra. A concentração de proteína foi determinada de maneira semelhante, entretanto o plasma foi previamente diluído em água estéril (1:200) utilizando-se uma solução comercial (Biorad Protein assay 500-0006) em lugar dos kits cromogênicos de acordo com o método de Bradford (1976). Albumina

do soro bovino foi utilizada como padrão. Os valores de absorvância de cada metabólito plasmático foram registrados em leitor de microplacas (Biorad model 550) e as concentrações ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) foram calculadas utilizando-se curvas padrões considerando o valor de diluição para cada amostra.

A contagem total de hemócitos foi realizada, em duplicata, em câmara de Neubauer a partir de uma alíquota de hemolinfa fixada em Alsever (115 mM  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ , 30 mM  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ , 338 mM NaCl, 10 mM  $\text{EDTA.Na}_2$ ; pH 7,0) formalina 4% em diluição de 1:3.

Para a avaliação da atividade aglutinante, utilizou-se sangue humano (tipo O+) obtido de um banco de sangue local. Os eritrócitos foram lavados três vezes com solução salina 0,9%, centrifugados a  $380 \times g$  à 25 °C por 5 min e então ajustado a um volume final de 2% antes do uso. Para determinar o título aglutinante, as amostras de 50  $\mu\text{L}$  de plasma de cada polvo foram diluídas serialmente em solução salina 0,9%, em microplacas de 96 micropoços com fundo em U. Posteriormente, à cada poço foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de solução de eritrócitos à 2% e incubados por 2 – 3 h em temperatura ambiente. O controle foi realizado substituindo o plasma por solução salina. O título de atividade natural de aglutinação do plasma dos polvos foi expresso como o recíproco da diluição mais alta que mostrou um padrão visível de aglutinação (Maggioni et al., 2004).

Para evitar a ativação do sistema imunológico por endotoxinas, todas as vidrarias foram lavadas previamente à utilização com Etoxa-clean (Sigma Chemical Co) e as soluções foram preparadas utilizando água livre de pirógenos. As atividades de FOplas e FOsis foram mensuradas por espectrofotometria, em triplicatas, em microplacas de 96 poços com fundo chato (Hernández-López et al., 1996; Le-Pabic et al., 2014). A técnica foi ajustada para *O. maya*. Brevemente, para atividade de FOplas, 50  $\mu\text{L}$  de plasma foram incubados com volume igual de água livre de pirógenos por 10 min à 37°C. Posteriormente, 180  $\mu\text{L}$  de L-DOPA (L-3,4- diidroxifenilalanina, 3  $\text{mg.mL}^{-1}$ ; Sigma) foram adicionados a cada poço e a microplaca incubada por mais 10 min à 37°C. Para a atividade de FOsis, o mesmo protocolo foi utilizado, entretanto, a água livre de pirógenos foi substituída por degranulado de hemócitos. A absorvância foi medida em 490 nm em leitor de microplacas (Biorad model 550). Os resultados foram expressos com o incremento de 0,001 em densidade óptica (Hernández-López et al., 1996).

## 2.5 Índices biométricos

Antes da coleta de hemolinfa, os animais foram pesados (peso corporal total). Como a quantidade de hemolinfa necessária para as análises era alta, optou-se por utilizar um procedimento de não retorno, assim, após a coleta de hemolinfa, os animais foram imediatamente eutanasiados por destruição do cérebro. A gônada e a glândula digestiva foram retiradas e pesadas separadamente para obter os índices gonadossomático e hepatossomático, respectivamente, de acordo com Cortez et al. (1995).

## 2.6 Análises estatísticas

Os parâmetros de hemolinfa foram testados para normalidade utilizando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov, bem como para homocedasticidade com o teste de Bartlett. Os dados que apresentaram homocedasticidade foram submetidos a ANOVA e à análise *post hoc* pelo teste de Newman-Keuls e os que não apresentaram foram submetidos à análise não paramétrica de Kruskal-Walis. Utilizou-se o programa Statistica 5.0 para realização das análises e um nível de significância de 5% foi considerado (Zar, 1999).

## 3. Resultados

Na tabela 1 são apresentadas as variáveis fisiológicas dos animais expostos à cada um dos agentes anestésicos. Não ocorreram diferenças significativas no peso e nos índices gonadossomático e hepatossomático dos espécimes avaliados.

Diferenças significativas foram observadas na osmolalidade dos agentes anestésicos e nos tempos de indução de *O. maya*. Animais expostos à Hip apresentaram os maiores tempos de indução e animais anestesiados com  $MgCl_2$  os menores ( $p < 0,05$ ). A osmolalidade da água do mar foi semelhante à da Hip, enquanto que as das soluções dos diferentes agentes anestésicos foram superiores ( $p < 0,05$ ), sendo a maior osmolalidade observada na solução que continha EtOH como agente anestésico. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) foram observadas na osmolalidade da hemolinfa dos animais expostos aos diferentes agentes anestésicos (Tabela 2).

**Tabela 1**

Variáveis fisiológicas em adultos de *Octopus maya* expostos aos diferentes agentes anestésicos e concentrações. AA: agente anestésico; [C]: concentração; PCT: peso corporal total (média  $\pm$  desvio padrão); IGS: índice gonadossomático; IHS: índice hepatossomático; Hip: hipotermia; EtOH: etanol; MgCl<sub>2</sub>: cloreto de magnésio; Mix: cloreto de magnésio associado a etanol.

AA	[C]	PCT (g)	IGS	IHS
Hip	11°C	409,33 $\pm$ 133,01	0,016 $\pm$ 0,024	0,060 $\pm$ 0,013
EtOH	3,0%	529,17 $\pm$ 158,86	0,008 $\pm$ 0,007	0,070 $\pm$ 0,009
MgCl <sub>2</sub>	7,5%	449,33 $\pm$ 105,04	0,011 $\pm$ 0,010	0,058 $\pm$ 0,011
Mix	0,75:1,5%	399,17 $\pm$ 94,24	0,018 $\pm$ 0,020	0,059 $\pm$ 0,012

**Tabela 2**

Tempos de indução e osmolalidade das substâncias testadas e da hemolinfa de *Octopus maya* expostos aos diferentes agentes anestésicos e concentrações. AA: agente anestésico; [C]: concentração; mOsm: osmolalidade (média  $\pm$  desvio padrão); AM: água do mar; Hip: hipotermia; EtOH: etanol; MgCl<sub>2</sub>: cloreto de magnésio; Mix: cloreto de magnésio associado a etanol.

AA	[C]	Tempo de indução (s)	mOsm AA	mOsm hemolinfa
AM*	n/a	n/a	1.154,58 $\pm$ 14,73	n/a
Hip	11°C	890,50 $\pm$ 89,51 <sup>a</sup>	1.149,03 $\pm$ 12,25	1.202,33 $\pm$ 25,11
EtOH	3,0%	442,00 $\pm$ 53,79 <sup>b</sup>	1.956,67 $\pm$ 40,66	1.687,67 $\pm$ 29,27
MgCl <sub>2</sub>	7,5%	311,83 $\pm$ 57,56 <sup>c</sup>	1.676,17 $\pm$ 26,19	1.382,00 $\pm$ 71,16
Mix	0,75:1,5%	380,00 $\pm$ 90,92 <sup>bc</sup>	1.711,33 $\pm$ 24,32	1.581,33 $\pm$ 80,77

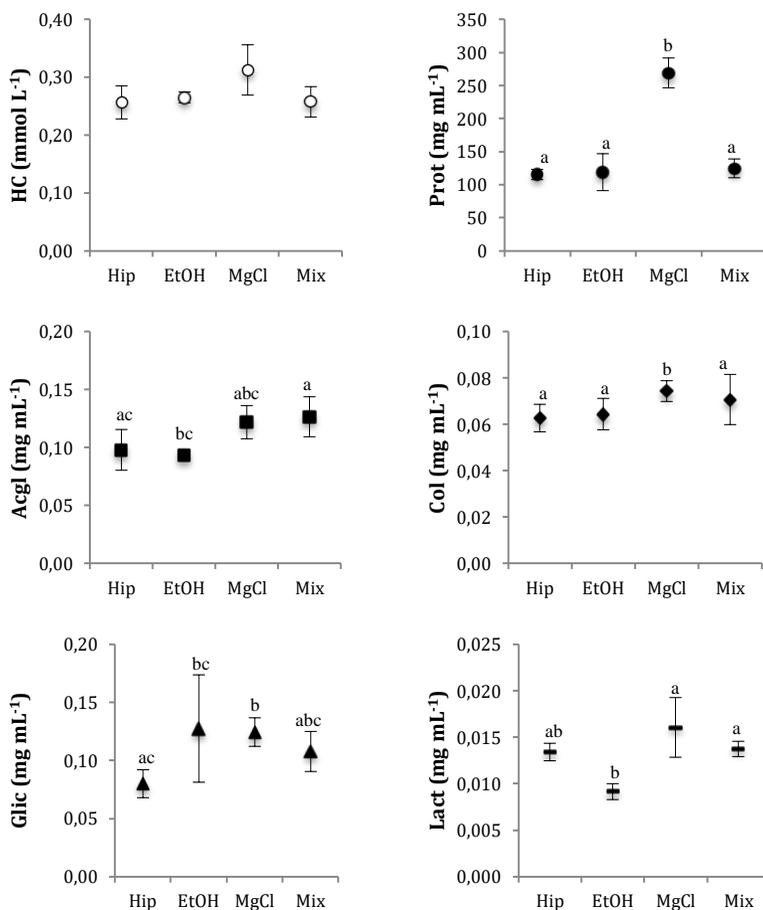
\*AM: representa a média das osmolalidades da água do mar do tanque de aclimação, utilizada para fazer as soluções que continham os agentes anestésicos; n/a: não aplicável.

Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos (p<0,05).

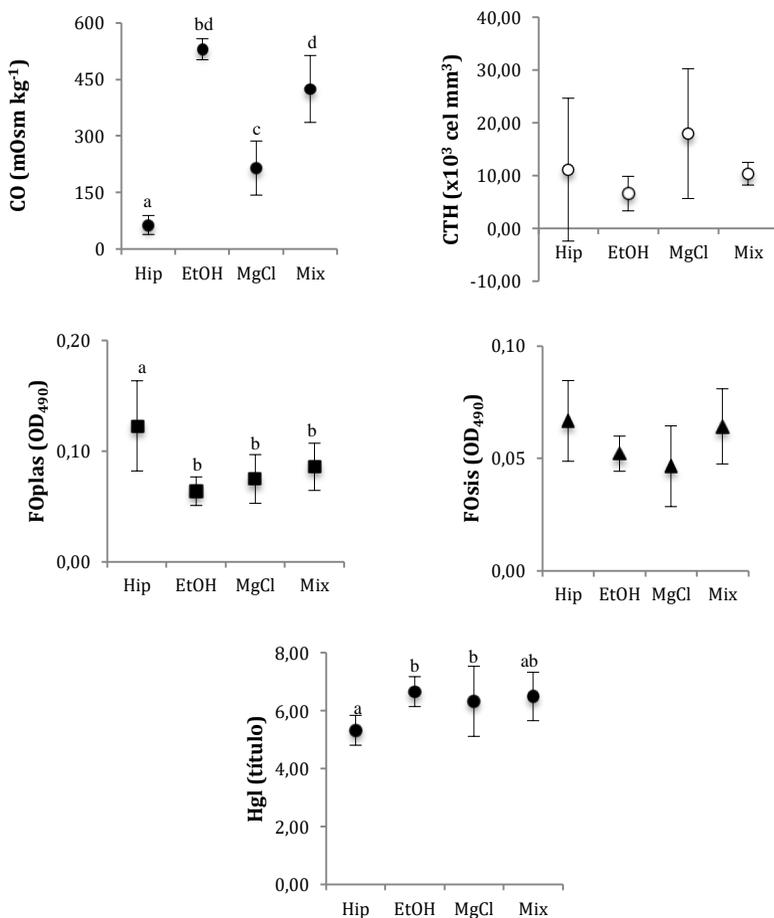
Nos parâmetros de hemolinfa, diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) podem ser observadas na CO, em todos os metabólitos plasmáticos, atividade de FOplas e atividade aglutinante. Por outro lado, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos analisados na concentração de hemocianina, contagem total de hemócitos e atividade de FOsis (Fig. 1 e 2).

Nos metabólitos plasmáticos, foi possível observar maiores níveis de proteína e colesterol em animais expostos a  $MgCl_2$  (separado ou em combinação) comparados a animais expostos a EtOH e Hip. Em contrapartida, animais expostos a EtOH apresentaram níveis mais baixos de lactato que animais expostos a concentrações que continham  $MgCl_2$  (Fig. 1).

A CO foi o parâmetro que apresentou as maiores variações entre os grupos analisados. Animais expostos à Hip apresentaram baixos valores de CO, permanecendo praticamente isosmóticos ao meio. Por outro lado, animais anestesiados com os outros agentes anestésicos, apresentaram-se hiperosmóticos, sendo os maiores valores de CO observados em animais anestesiados com EtOH ( $533 \text{ mOsm kg}^{-1}$ ). Animais expostos à Hip apresentaram maior nível de atividade de FOplas e menor atividade aglutinante quando comparados aos animais expostos aos outros agentes anestésicos (Fig. 2).



**Fig. 1.** Concentração de hemocianina e metabólitos plasmáticos (média  $\pm$  desvio padrão) em *Octopus maya* expostos a diferentes agentes anestésicos. Hip: hipotermia; EtOH: etanol; MgCl<sub>2</sub>: cloreto de magnésio; Mix: cloreto de magnésio associado o etanol; HC: concentração de hemocianina; Prot: proteínas; Acgl: acilglicerídeos; Col: colesterol; Glic: glicose; Lact: lactato. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).



**Fig. 2.** Capacidade osmótica (CO) e parâmetros imunológicos (média  $\pm$  desvio padrão) em *Octopus maya* expostos aos diferentes agentes anestésicos. Hip: hipotermia; EtOH: etanol; MgCl<sub>2</sub>: cloreto de magnésio; Mix: cloreto de magnésio associado a etanol; CTH: contagem total de hemócitos; FOplas: atividade de fenoxidase em plasma; FOsis: atividade de fenoxidase em sistema (plasma e degranulado de hemócitos); Hgl: atividade aglutinante. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ).

#### 4. Discussão

Estudos para determinar o agente anestésico e a concentração a ser utilizada para um determinado animal, usualmente devem abordar informações sobre: os tempos de indução, sedação e recuperação; descrição comportamental; medidas dos níveis hormonais (concentrações de catecolaminas e cortisol) e funções imunes (número total de hemócitos e atividade fagocitária) (Sykes e Gestal, 2014). Uma série de respostas internas a agentes anestésicos em peixes têm sido descritas na literatura, dentre elas, efeitos nos parâmetros sanguíneos e metabólicos ou efeitos bioquímicos (Ross e Ross, 2008).

Apesar da existência de estudos abordando diversas substâncias como agentes anestésicos em cefalópodes, a grande maioria apenas avalia tempos de indução e recuperação e descreve, em alguns casos, muito superficialmente, as alterações comportamentais decorrentes da exposição as substâncias testadas (Sykes e Gestal, 2014). Em peixes, o acesso a efeitos primários e secundários decorrentes da exposição a um agente anestésico, como a determinação de cortisol e glicose plasmáticas, é amplamente utilizada e estudada (Ellis et al., 2012). Entretanto, em cefalópodes não se tem conhecimento sobre a aplicabilidade destas variáveis (Sykes e Gestal, 2014).

A efetividade e a concentração apropriada dos agentes anestésicos em cefalópodes provavelmente são espécie-específicos e, além disso, variações devido a diferenças intraespecíficas podem ocorrer de acordo com o estágio do ciclo de vida e tamanho/peso do animal (Sykes et al., 2012). No presente estudo, não foram observadas diferenças significativas nos indicadores fisiológicos de peso corporal e índices hepatossomático e gonadossomático nos espécimes de *O. maya* analisados. Isso indica que os grupos experimentais analisados foram semelhantes no que diz respeito ao tamanho, nutrição e estágio de maturação sexual, minimizando assim eventuais diferenças decorrentes destas variáveis.

Todas as técnicas atuais de anestesia em cefalópodes utilizam imersão direta do animal em água contendo o agente anestésico (Fiorito et al., 2014). Recomenda-se que a anestesia seja realizada na própria água do mar onde os animais estão acondicionados a fim de manter o balanço mineral (Lewbart et al., 2012). Entretanto, a adição de determinadas substâncias à água do mar pode ocasionar alterações na composição física e química que devem ser consideradas.

Em cefalópodes, dentre as substâncias utilizadas como agentes anestésicos, destacam-se o  $MgCl_2$  e o EtOH, utilizados separadamente ou em combinação. O  $MgCl_2$  pode ser diluído diretamente em água do mar (Fiorito et al., 2015), o que acarretaria em alterações na salinidade, ou previamente diluído em água destilada e misturado com água do mar (Messenger et al., 1985), podendo causar um desbalance iônico.

Alterações na salinidade (32 para 47) foram observadas durante a anestesia de *Strombus gigas* com  $MgCl_2$  ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ), entretanto, os autores sugeriram que a curta duração da exposição (20 min) não foi suficiente para causar um efeito adverso nos animais (Acosta-Salmon e Davis, 2007). O propósito da anestesia e o tempo de exposição devem sempre ser considerados, pois não se conhece os possíveis efeitos em decorrência das alterações na qualidade da água e de uma exposição prolongada a determinado agente anestésico a curto e a longo prazo.

Cefalópodes são animais exclusivamente marinhos e, em geral, osmoconformadores e estenoalinos (Boletzky e Hanlon, 1983; Wells e Wells 1989; Delgado et al. 2011), entretanto, exceções podem ocorrer, como, por exemplo, as espécies eurialinas *Lollingula brevis* (Hendrix et al., 1981) e *Octopus ocellatus* (Sakamoto et al., 2015), frequentemente encontradas em locais de baixa salinidade. Recentemente, Sakamoto et al. (2015) comprovaram pela primeira vez que osmo e ionorregulação podem ocorrer em cefalópodes, demonstrando que as concentrações osmóticas e iônicas da hemolinfa de *O. ocellatus* parecem ser reguladas quando a salinidade no ambiente decresce.

Variações interespecíficas na tolerância à osmolalidade também foram observadas após choque hipo e hiperosmótico em tecidos de *Octopus vulgaris* e *Octopus insularis* por Amado et al. (2015). Estes autores observaram uma maior tolerância à osmolalidade em *O. insularis*, fato que pode explicar parcialmente a ocorrência desta espécie em águas mais quentes e rasas, em que ocorrem maiores temperaturas e salinidades, quando comparadas a *O. vulgaris*.

No presente estudo, a adição de EtOH e  $MgCl_2$ , separados ou em combinação, ocasionaram alterações significativas na osmolalidade da água do mar, e, conseqüentemente, na capacidade osmótica dos animais, sendo este o parâmetro que apresentou as maiores diferenças entre os grupos analisados. Os valores de osmolalidade na hemolinfa de *O. maya* expostos à Hip obtidos no presente estudo foram similares aos da água do mar e aos obtidos para outras espécies de cefalópodes (Wells e Wells, 1989; Kirchner, 1991; Amado et al., 2015). Estes valores são típicos de animais osmoconformadores marinhos (Amado et al., 2015).

Dentre os efeitos secundários ao estresse em peixes, podem ocorrer alterações nas respostas que afetam o balanço hidromineral, como alterações nas concentrações dos íons cloreto, sódio, potássio, proteínas e na osmolalidade do plasma (Legras et al., 2000). Em camarões, sabe-se que a capacidade osmótica é utilizada como indicador dos efeitos de diferentes fatores estressantes (Lignot et al., 1999), sendo que variações podem ocorrer com o tamanho, estado nutricional, estágio de desenvolvimento e de muda do animal (Lignot et al., 1999). Além disso, a exposição dos animais a perturbações bióticas e abióticas podem induzir a um processo de alterações comportamentais e fisiológicas em resposta ao agente estressor a fim de manter a homeostase (Malham et al., 2002).

Em osmoconformadores marinhos, espera-se que os valores de capacidade osmótica sejam muito próximos a serem isosmóticos à água onde os animais são mantidos. Assim, no presente estudo, os animais expostos à Hip foram os menos afetados do ponto de vista do balanço hidromineral. Por outro lado, o meio hiperosmótico produzido pelos outros agentes anestésicos, ocasionou um aumento significativo da osmolalidade da hemolinfa e aumento da CO<sub>2</sub>, tornando os animais também hiperosmóticos em relação à água do mar, sendo os maiores valores observados em animais anestesiados com EtOH ( $533,33 \pm 27,70$  mOsm kg<sup>-1</sup>).

Neste estudo, devido a grande quantidade de hemolinfa necessária para as análises, os polvos foram submetidos à um procedimento de não recuperação, como definido pela Directiva 2010/EU/63, em que se procede a eutanásia logo após o término do procedimento. Entretanto, quando a recuperação for necessária, os animais serão novamente colocados em água do mar e terão que reajustar a pressão osmótica da hemolinfa novamente à pressão osmótica do meio.

As possíveis consequências fisiológicas destas alterações na pressão osmótica da hemolinfa dos polvos são incertas. Recomenda-se o desenvolvimento de estudos complementares que englobem o monitoramento dos animais durante maior período após a exposição aos agentes anestésicos. Além disso, o monitoramento do pH e dos principais íons, como Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, e K<sup>+</sup> na hemolinfa e na água podem ser úteis no entendimento destas alterações.

A concentração de hemocianina e os metabólitos plasmáticos proteínas, lipídeos, acilglicerídeos e colesterol têm sido amplamente utilizados em estudos com moluscos e crustáceos, podendo ser indicadores do estado nutricional e de saúde dos animais (Sánchez et al.,

2001; Rosas et al., 2004; Carrillo et al., 2006; Pascual et al., 2003). Por outro lado, glicose e lactato têm sido propostos como indicadores de estresse (Hall e Ham, 1998; Racotta e Palacios, 1998; Mugnier e Justou, 2004).

Em peixes, sabe-se que a concentração de proteínas plasmáticas pode ser alterada em decorrência de um agente estressor (Ross e Ross, 2008). Em polvos *E. cirrhosa* submetidos a sucessivas amostras de hemolinfa (0, 2 e 4 h), observou-se um decréscimo da quantidade de proteínas plasmáticas com o passar do tempo (Malham et al., 1998). No presente estudo, os valores de proteínas plasmáticas observados em animais submetidos aos agentes anestésicos Hip, EtOH e Mix foram semelhantes aos registrados por Malham et al. (1998) imediatamente após a primeira coleta de hemolinfa ( $116 \text{ mg mL}^{-1}$ ).

Adicionalmente, estes autores observaram um decréscimo significativo de proteínas plasmáticas um dia após a primeira coleta ( $64 \text{ mg mL}^{-1}$ ), entretanto, alta variabilidade individual foi observada, que poderia ser decorrente da variação no estágio de maturação dos animais avaliados por esses autores. No presente estudo, as variações observadas em cada grupo analisado foram relativamente baixas quando comparadas com as registradas por Malham et al. (1998), fato que pode estar relacionado com a homogeneidade nutricional e de maturação sexual observada nos tratamentos.

Os altos níveis de proteínas plasmáticas observadas em polvos expostos a  $\text{MgCl}_2$  ( $269,38 \text{ mg mL}^{-1}$ ) observados no presente estudo provavelmente são um reflexo de alterações ocasionadas por este agente anestésico em particular. Estes resultados parecem indicar que, por algum motivo, os animais expostos a  $\text{MgCl}_2$  não foram capazes de regular a mobilização de proteínas na hemolinfa, entretanto, estudos complementares devem ser realizados a fim de possibilitar o completo entendimento destas alterações.

Por outro lado, valores significativamente mais baixos nos níveis de lactato foram observados em animais anestesiados com EtOH, sugerindo que o metabolismo anaeróbico teve uma menor participação nos mecanismos de obtenção de energia durante os processos de anestesia. Maiores níveis de glicose plasmática são frequentemente associados ao uso da via gliconeogênica para a obtenção de energia.

Variações no número de hemócitos podem ser observados em decorrência da exposição à um agente estressor, como por exemplo, parasitos (Castellanos-Martinez et al., 2014), coletas repetidas de hemolinfa (Malham et al., 1998), exposição ao ar (Malham et al., 2002) ou injeção com lipopolissacarídeos de *Escherichia coli* (Locatello et al.,

2013). No presente estudo, o número total de hemócitos circulantes na hemolinfa foi, em geral, muito variável, e, portanto, não foram observadas diferenças significativas com relação aos agentes anestésicos avaliados. Alta variabilidade no número de hemócitos de *O. vulgaris* foi previamente registrada (Rodríguez-Domínguez et al., 2006; Castellanos-Martínez et al., 2014).

Os efeitos do agente anestésico  $MgCl_2$  ( $50 \text{ g L}^{-1}$ ) nos parâmetros imunológicos de ostras *Saccostrea glomerata* após 6 h de exposição foram avaliados (Butt et al., 2008). Os autores observaram aumento significativo do número de hemócitos, da atividade de fosfatase ácida e da atividade superóxido durante as primeiras 48 h, decrescendo posteriormente. Por outro lado, a atividade de FO aumentou imediatamente, reduzindo significativamente até 48 h após a exposição. Os autores concluíram que, apesar das alterações causadas a curto prazo, os efeitos fisiológicos decorrentes da exposição à esta substância não tiveram impactos a longo prazo nos parâmetros imunológicos das ostras e nos eventos subsequentes de desova.

De fato, outros estudos relataram a influência de agentes estressores no estado imunológico de invertebrados (Sindermann, 1979; Fisher, 1988; Anderson, 1990; Fisher et al., 1996; Carballal et al., 1998). Entretanto, as alterações nos parâmetros imunológicos podem não ser percebidas imediatamente, podendo ocorrer horas ou dias após à exposição a um agente estressor (Malham et al. 1998; 2002; Locatello et al., 2013).

No presente estudo, alterações nos parâmetros de hemolinfa dos animais expostos à Hip apresentaram maior nível de atividade de FOplas e menor atividade aglutinante quando comparados aos animais expostos aos outros agentes anestésicos. Os motivos destas variações são ainda são incertos e, por isso, sugere-se a realização de estudos futuros em que o monitoramento das variáveis imunológicas seja realizado por maior período de tempo após a exposição aos agentes anestésicos.

## 5. Conclusão

Para o nosso conhecimento, este estudo é o primeiro a relacionar o efeito de diferentes agentes anestésicos nos parâmetros de hemolinfa em cefalópodes. Os resultados obtidos nos permitem concluir que os diferentes agentes anestésicos, em geral, ocasionaram alterações significativas na osmolalidade da água do mar e nos parâmetros de hemolinfa de *Octopus maya*. Entretanto, estudos complementares são

necessários para determinar com maior precisão as consequências decorrentes destas alterações. Assim, recomenda-se cautela no uso dos agentes anestésicos quando os parâmetros de hemolinfa forem necessários.

## 6. Agradecimentos

Este trabalho é parte da tese de doutorado de K. Roumbedakis. Os autores agradecem o apoio financeiro através dos projetos Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) Ciências do Mar 43/2013 e pela bolsa de Doutorado e Doutorado Sanduíche concedida a K. Roumbedakis, (6419/2014-03). Agradecemos ao Conselho Nacional Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de Produtividade em Pesquisa concedida a M.L. Martins. Agradecemos também pela assistência técnica Claudia Caamal-Monsreal, Elisa Chan e Ariadna Sánchez (UMDI-SISAL).

## 7. Referências

- Acosta-Salmon, H., Davis, M., 2007. Inducing relaxation in the queen conch *Strombus gigas* (L.) for cultured pearl production. *Aquaculture* 262(1), 73–77.
- Amado, E.M., Souza-Bastos, L.R., Vidal, E.A.G., Leite, T.S., Freire, C.A., 2015. Different abilities to regulate tissue hydration upon osmotic challenge in vitro, in the cephalopods *Octopus vulgaris* and *O. insularis*. *Mar. Fresh. Behav. Physiol.* 1–7.
- Anderson, D.P., 1990. Immunological indicators: effects of environmental stress on immune protection and disease outbreaks. *Am. Fish. Soc. Symp.* 8, 38–50.
- Andrews, P.L.R., Tansey, E.M., 1981. The effects of some anesthetic agents in *Octopus vulgaris*. *Comp. Biochem. Physiol.* 70, 241–247.
- Boletzky, S., Hanlon, R.T., 1983. Review of the laboratory maintenance, rearing and culture of cephalopod molluscs. *Mem. Nat. Mus. Victoria*, 44, 147–187.
- Bradford, M.M., 1976. A refined and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principal protein-dye binding. *Anal Biochemistry* 72, 248–254.
- Butt, D., O'Connor, S.J., Kuchel, R., O'Connor, W.A., Raftos, D.A., 2008. Effects of the muscle relaxants, magnesium chloride, on the

- Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) *Aquaculture* 275, 342–346.
- Carballal, M.J., Villalba, A., López, C., 1998. Seasonal variation and effects of age, food availability, size, gonadal development and parasitism on the hemogram of *Mytilus galloprovincialis*. *J. Invertebr. Pathol.* 72, 304–312.
- Carrillo, O., Zaldivar, C., Rosas, C., 2006. Marcadores de Situación Nutricional y de Salud. In: Rosas, C., Carrillo, O., Wilson, R., Andreatta, E.R. (Eds.), *Estado actual y perspectivas de la nutrición de los camarones peneidos cultivados en Iberoamérica*, D.F.CYTED: México, pp. 105–124.
- Castellanos-Martínez, S., Prado-Alvarez, M., Lobo-da-Cunha, A., Azevedo, C., Gestal, C., 2014. Morphologic, cytometric and functional characterization of the common octopus (*Octopus vulgaris*) hemocytes. *Dev. Comp. Immunol.* 44, 50–58.
- Cataldi, E., Di Marco, P., Mandich, A., Cataudella, S., 1998. Serum Parameters of Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* (Pisces: Acipensiformes): effects of temperature and stress. *Comp. Biochem. Physiol.* 121, 351–354.
- Cortez, T., Castro, B.G., Guerra, A., 1995. Reproduction and condition of female *Octopus mimus* (Mollusca: Cephalopoda). *Mar. Biol.* 123, 505–510.
- Davis, K.B., Griffin, B.R., 2004. Physiological responses of hybrid striped bass under sedation by several anesthetics. *Aquaculture* 233, 531–548.
- Delgado, M., Gairín, J.I., Carbó, R., Aguilera, C., 2011. Growth of *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) in tanks in the Ebro Delta (NE Spain): effects of temperature, salinity and culture density. *Sci. Mar.* 75, 53–59.
- Ellis, T., Yildiz, H.Y., López-Olmeda, J., Spedicato, M.T., Tort, I., Øverli, Ø., Martins, C.I.M., 2012. Cortisol and finfish welfare. *Fish Physiol, Biochem.* 38, 163–188.
- Fiorito, G., Affuso, A., Anderson, D.B., Basil, J., Bonnaud, L., Botta, G., Cole, A., D'Angelo, L., De Girolamo, P., Dennison, N., Dickel, L., Di Cosmo, A., Di Cristo, C., Gestal, C., Fonseca, R., Grasso, F., Kristiansen, T., Kuba, M., Maffucci, F., Manciooco, A., Mark, F.K., Melillo, D., Osorio, D., Palumbo, A., Perkins, K., Ponte, G., Raspa, M., Shashar, N., Smith, J., Smith, D., Sykes, A., Villanueva, R., Tublitz, N., Zullo, L., Andrews, P.L.R., 2014. Cephalopods in neuroscience: Regulations, Research and the 3Rs. *Invert. Neurosci.* 14, 13–36.

- Fiorito, G., Affuso, A., Basil, J., Cole, A., Girolamo, P., D'Angelo, L., Dickel, L., Gestal, C., Grasso, F., Kuba, M., Mark, F., Melillo, D., Osorio, D., Perkins, K., Ponte, G., Shashar, N., Smith, D., Smith, J., Andrews, P.L.R., 2015. Guidelines for the Care and Welfare of Cephalopods in Research – A consensus based on an initiative by CephRes, FELASA and the Boyd Group. *Lab. Anim.* 49, 1–90.
- Fisher, W.S., Oliver, L.M., Edwards, P., 1996. Hematologic and serologic variability of eastern oysters from Apalachicola Bay, Florida. *J. Shellfish Res.* 15, 555–564.
- Fisher, W.S., 1988. Environmental influence on host response. *Am. Fish. Soc. Spec. Publ.* 18, 225–237.
- Gleadall, I.G., 2013. The effects of prospective anaesthetic substances on cephalopods: Summary of original data and a brief review of studies over the last two decades. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 447, 23–30.
- Hall, M.R., Van Han, E.H., 1998. The effects of different types of stress on blood glucose in the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *J. World Aquacult. Soc.* 29, 290–299.
- Hendrix Jr, P., Hulet, W.H., Greenberg, M.J., 1981. Salinity tolerance and the responses to hypoosmotic stress of the bay squid *Lolliguncula brevis*, a euryhaline cephalopod mollusc. *Comp. Biochem. Phys. A* 69(4), 641–648.
- Hernández-López, J., Gollas-Galván, T., Vargas-Albores, F., 1996. Activation of the prophenoloxidase system of brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Comp. Biochem. Physiol. C* 13, 61–66.
- Kirschner, L.B., 1991. Water and ions. In: Prosser, C.L. (Ed.) *Comparative animal physiology, environmental and metabolic animal physiology*. Wiley-Liss: New York (NY), pp. 13–107.
- Legras, S., Mouneyrac, C., Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Rainbow, P.S., 2000. Changes in metallothionein concentrations in response to variation in natural factors (salinity, sex, weight) and metal contamination in crabs from a metal-rich estuary. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 246, 259–279.
- Le Pabic, C., Safi, C., Serpentine, A., Lebel, J., Robin, J., Koueta, N., 2014. Prophenoloxidase system, lysozyme and protease inhibitor distribution in the common cuttlefish *Sepia officinalis*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 172–173, 96–104.
- Lewbart, G.A., Mosley, C., 2012. Clinical anesthesia and analgesia in invertebrates. *J. Exot. Pet Med.* 21, 59–70.

- Lignot, J.H., Cochard, J.C., Soyez, C., Lemaire, P., Charmantier, G., 1999. Haemolymph osmolality according to nutritional status, molting stage and body weight of *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture* 170, 72–92.
- Locatello, L., Fiorito, G., Finos, L., Rasotto, M.B., 2013. Behavioural and immunological responses to an immune challenge in *Octopus vulgaris*. *Physiol. Behav.* 122, 93–99.
- Maggioni, D.G., Andreatta, E.R., Hermes, E.M., Barracco, M.A., 2004. Evaluation of some hemato-immunological parameters in female shrimp *Litopenaeus vannamei* submitted to unilateral eyestalk ablation in association with a diet supplemented with superdoses of ascorbic acid as a form of immunostimulation. *Aquaculture* 241, 501–515.
- Malham, A., Lacoste, F., Gélébart, A., Cueff, S.A., Poulet, A., 2002. A first insight stress-induced neuroendocrine and immune changes in the octopus *Eledone cirrhosa*. *Aquat. Living Resour.* 15, 187–192.
- Malham, S.k., Coulson, C.L., Runham, N.W., 1998. Effects of repeated sampling on the haemocytes and hemolymph of *Eledone cirrhosa* (Lam.). *Comp. Biochem. Physiol. A* 121, 431–440.
- Messenger, J.B., Nixon, M., Ryan, K.P., 1985. Magnesium chloride as an anesthetic for cephalopods. *Comp. Biochem. Physiol., C* 82, 203–205.
- Mooney, T.A., Lee, W.J., Hanlon, R.T., 2010. Long-duration anesthetization of squid (*Doryteuthis pealeii*). *Mar. Freshw. Behav. Physiol.* 43, 297–303.
- Mugnier, C.J., 2004. Combined effect of external ammonia and molt stage on the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* physiological response. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 309, 35–46.
- Pascual, C., Sánchez, A., Sánchez, A., Vargas-Albores, F., Le Moullac, G., Rosas, C., 2003. Haemolymph metabolic variables y immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of an extreme temperature. *Aquaculture* 218, 637–650.
- Racotta, E.P., 1998. Hemolymph metabolic variables in response to experimental manipulation stress and serotonin injection in *Penaeus vannamei*. *J. World Aquacult. Soc.* 29, 351–356.
- Rodríguez-Domínguez, H., Soto-Búa, M., Iglesias-Blanco, R., Crespo-González, C., Arias-Fernández, C., García-Estévez, J., 2006. Preliminary study on the phagocytic ability of *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 (Mollusca: Cephalopoda) haemocytes in vitro. *Aquaculture* 254, 563–570.

- Rosas, C., Gallardo, P., Mascaró, M., Caamal-Monsreal, C., Pascual, C., *Octopus maya*, 2014. In: Iglesias, J., Fuentes, L., Villanueva R. (Eds.), *Cephalopod culture*, Springer: Dordrecht, Heidelberg, New York, London, pp. 383–396.
- Ross, L.G., Ross, B., 2008. *Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals*. Blackwell Publishing, Oxford, UK, 228 p.
- Roumbedakis K., Alexandre, M.N., Puch, J.A., Martins, M.L., Rosas, C., 2016. Respostas fisiológicas e comportamentais de *Octopus maya* (Voss e Solís, 1966) expostos à diferentes agentes anestésicos e concentrações. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* (a ser submetido).
- Sakamoto, T., Ogawa, S., Nishiyama, Y., Akada, C., Takahashi, H., Watanabe, T., Minakata, H., Sakamoto, H., 2015. Osmotic/ionic status of body fluids in the euryhaline cephalopod suggest possible parallel evolution of osmoregulation. *Sci. Rep.* 25 (5), 14469.
- Sánchez, A., Pascual, C., Sánchez, A., Vargas-Albores, F., Moullac, G.L., Rosas, C., 2001. Hemolymph metabolic variables y immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimation. *Aquaculture* 198, 13–28.
- Sindermann, C.J., 1979. Pollution-associated diseases and abnormalities of fish and shellfish: a review. *Fish. Bull.* 76, 717–749.
- Solís-Ramírez, M.J., Aguerrín-Sánchez, F., Seijo, J.C., 1997. Pesquería de pulpo de la plataforma continental de Yucatán. In: Flores-Hernández, D., Sánchez-Gil, P., Seijo, J.C., Arreguín-Sánchez (Eds.), *Análisis y Diagnóstico de los Recursos Pesqueros Críticos del Golfo de México*.
- Sykes, A.V., Gestal, C., 2014. Welfare and diseases under culture conditions. In: Iglesias, J., Fuentes, L., Villanueva, R. (Eds.), *Cephalopod culture*, Springer: Dordrecht, Heidelberg, New York, London, pp. 97–112.
- Sykes, A.V., Baptista, F.D., Gonçalves, R.A., Andrade, J.P., 2012. Directive 2010/63/EU on animal welfare: a review on the existing scientific knowledge and implications in cephalopod aquaculture research. *Rev. Aquac.* 4, 142–162.
- Wagner, G.M., Singer, T.D., McKinley R.S., 2003. The ability of clove oil and MS-222 to minimize handling stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquacult. Res.* 34, 1139–1146.
- Wells, M.J., Wells, J., 1989. Water uptake in a Cephalopod and the function of the so-called ‘pancreas’. *J. Exp. Biol.* 145, 215–226.
- Zar, J.H., 1999. *Biostatistical Analysis*, 4 ed. Upper Saddle River, New Jersey, 662 p.

## 6. CONCLUSÕES GERAIS

- Apesar da visível perda de peso corporal e redução dos índices hepatossomático e gonadossomático, aliada a variação da glicose plasmática em fêmeas de *O. maya* pós-desova, é possível observar uma compensação imunológica as permite manter-se saudáveis até 40 DPD;
- A fauna parasitária de fêmeas de *O. maya* pós-desova foi composta por coccídeos do gênero *Aggregata* sp. (Protozoa: Apicomplexa) no intestino, ceco e brânquias e larvas do cestóide *Prochristianella* sp. (Cestoda: Trypanoryncha) na massa bucal, ambos com altas prevalências durante todo o período experimental;
- O uso de agentes anestésicos causou alterações no consumo de oxigênio de juvenis de *O. maya* durante a indução à anestesia e recuperação, entretanto, não foi suficiente para causar um efeito a longo prazo no crescimento, com exceção dos animais expostos ao óleo de cravo;
- Os agentes anestésicos que apresentaram indução completa e os melhores tempos de indução e recuperação em juvenis foram hipotermia 11°C, etanol 3,0%, cloreto de magnésio 3,75% e Mix 1 (cloreto de magnésio associado à etanol) 0,75;1,5%;
- Em adultos, etanol 3,0% foi o agente anestésico que apresentou os melhores tempos de indução e recuperação, sem mortalidades;
- Para a manipulação de curto prazo de juvenis e adultos de *O. maya* (até 180 s), não é necessário o uso de nenhum agente anestésico; em adultos de grande tamanho, , sugere-se o uso de etanol 3,0% para facilitar o manejo;
- O uso dos agentes anestésicos, em geral, alterou a osmolalidade da água do mar e os parâmetros de hemolinfa de *O. maya*, portanto recomenda-se cautela no uso destas substâncias quando estes parâmetros são requeridos.



## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo fornece informações inéditas e importantes sobre o estado de saúde e a fauna parasitária de fêmeas de *Octopus maya* pós-desova, o uso de anestésicos para a manipulação de curto prazo de juvenis e adultos, e os efeitos dos agentes anestésicos sobre os principais parâmetros de hemolinfa. Entretanto, alguns pontos devem ser destacados para trabalhos futuros.

Neste estudo, o estado de saúde das fêmeas de *O. maya* foi observado apenas até 40 DPD. Sugere-se a realização de um estudo mais longo, até pelo menos 50 DPD ou até a morte das fêmeas para avaliar as consequências da privação do alimento durante todo o período de incubação e/ou até a senescência. No presente estudo, optou-se por remover os ovos após a desova para evitar contaminações por fungos ou bactérias, comumente observadas para esta espécie em laboratório. Entretanto, sugere-se o estudo comparativo entre fêmeas incubando ou não para verificar possíveis interferências dos ovos no desempenho da fêmea.

Como já mencionado anteriormente, *Octopus maya* é uma espécie com grande potencial de cultivo. Assim, estudos adicionais sobre a fauna parasitária desta espécie são importantes apesar de não se observarem problemas relacionados à presença de parasitos no cultivo em laboratório desta espécie. Entretanto, situações de confinamento e grande quantidade de animais podem favorecer a proliferação de parasitos e causar surtos de doenças. Sugere-se a realização de estudos complementares, englobando, por exemplo, diferentes sexos, estágios de vida e procedência dos animais, que possam auxiliar no monitoramento desta espécie sob condições de cultivo. Além disso, recomenda-se a realização de estudos histopatológicos para avaliar os possíveis danos que os parasitos, principalmente as causadas por larvas de cestoides *Prochristianella* sp.

O bem estar animal quando se trata de cefalópodes é um tema que têm recebido considerável atenção nos últimos anos. Neste contexto, estudos relacionados a anestésicos, que considerem outros parâmetros além dos tempos de indução e recuperação são importantes para o desenvolvimento de protocolos e boas práticas de manejo adequadas a diferentes espécies e/ou fases de vida. No presente estudo, foram avaliados pela primeira vez diferentes agentes anestésicos e concentrações em juvenis e adultos de *O. maya*, espécie com grande potencial para a aquicultura.

Nossos resultados, apresentam dados inéditos sobre a influencia dos agentes anestésicos sobre o metabolismo, a fisiologia e a imunologia desta espécie. Apesar de ainda preliminares, os dados apresentados no presente estudo demonstram a possibilidade da utilização de ferramentas alternativas no monitoramento do curso e da recuperação da anestesia a curto e longo prazo em cefalópodes, como por exemplo o monitoramento dos parâmetros de hemolinfa. No entanto, estudos complementares, que englobem o monitoramento destes parâmetros e de outros parâmetros e por um período de tempo maior após a exposição aos agentes anestésicos são recomendados.

Além disso, estudos fisiológicos para avaliar as possíveis consequências decorrentes do uso dos agentes anestésicos são devem ser realizados. O estabelecimento e padronização de critérios para acessar a anestesia geral, o mecanimo e local de ação dos agentes anestésicos e o estudo de outras substâncias a serem utilizadas como agentes anestésicos em cefalópodes são urgentes e necessários. Além disso, questões relacionadas à segurança do manipulador, do consumidor (se os animais forem utilizados para consumo) e do meio ambiente e ao descarte destas substâncias são outros tópicos a serem considerados.

## 8. REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

- ALPUCHE, J.; PEREYRA, A.; MENDOZA-HÉRNANDEZ, G.; AGUNDIS, C.; ROSAS, C.; ZENTENO, E. Purification and partial characterization of an agglutinin from *Octopus maya* serum. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 156, p. 1–5. 2010.
- ANDERSON, R. C.; WOOD, J. B.; BYRNE, R. A. Octopus Senescence: The Beginning of the End. **Journal of Applied Animal Welfare Science**, v. 5, n. 4, p. 275–283. 2002.
- ANDREWS, P. L. R.; TANSEY, E. M. The effects of some anesthetic agents in *Octopus vulgaris*. **Comparative Biochemistry Physiology**, v. 70, p. 241–247. 1981.
- ÁVILA-DA-SILVA, A. O.; CARNEIRO, M. H.; BASTOS, G. C. C.; MENDONÇA, J. T.; SERVO, G. J.; BATISTA, P. A. Produção pesqueira marinha do Estado de São Paulo no ano 2005. **Série de Relatórios Técnicos**, v. 20, p. 259–266. 2006.
- ÁVILA-DA-SILVA, A. O.; ASSUNÇÃO, R.; TOMÁS, A. R. G. Surgimento e evolução da pesca do polvo-comum, *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797, com potes no estado de São Paulo, Brasil. In: HAIMOVICI, M.; FILHO, J. M. A.; SUNYE, P. S. (Eds.). **A pesca marinha e estuarina no Brasil: estudos de caso multidisciplinares**. Rio Grande: Editora da FURG, 2014. p.101–110.
- BARRACCO, M. A.; SILVA, P. M. Hemolinfa e Sistema Imune. In: RESGALLA, C. J.; CONCEIÇÃO, M. B.; WEBER, L. I. (Eds.). **O Mexilhão *Perna perna* (L.): Biologia, Ecologia e Aplicações**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 85–103.
- BOLETZKY, S.; HANLON, R. T. Review of the laboratory maintenance, rearing and culture of cephalopod molluscs. **Memoirs of National Museum of Victoria**, v. 44, p. 147–187. 1983.
- BOYLE, P.; RODHOUSE, P. **Cephalopods: Ecology and Fisheries**. UK: Blackwell Science, 2005. 464 p.
- CASTELLANOS-MARTÍNEZ, S.; GESTAL, C. Pathogens and immune response of cephalopods. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 447, p. 14–22. 2013.
- CASTELLANOS-MARTÍNEZ, S.; PRADO-ALVAREZ, M.; LOBO-DA-CUNHA, A.; AZEVEDO, C.; GESTAL, C. Morphologic, cytometric and functional characterization of the common octopus (*Octopus vulgaris*) hemocytes. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 44, p. 50–58. 2014.

- CHÁVEZ, E. Los recursos marinos de la Península de Yucatán, In: YAÑEZ-ARANCIBIA, A. (Ed.). **Recursos faunísticos del litoral de la Península de Yucatán**. Universidad Autónoma de Campeche, 2, Campeche, México: EPOMEX Serie Científica, 1994. p. 1–12.
- CHENG, T. C. Functional morphology and biochemistry of molluscan phagocytes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 266, p. 343–379. 1975.
- CHU, F.L. Defense mechanisms of marine bivalves. In: FINGERMAN, M.; NAGABHUSHANAM, R. (Eds.). **Recent advances in marine biotechnology. Immunology and Pathology**, 5. Enfield, UK: Science Publishers Inc., 2000. p. 1–42.
- CONAPESCA, Comisión Nacional De Acuicultura Y Pesca, México. **Normas Oficiales Mexicanas Pesqueras y Acuícolas**. Legislação de pesca de *Octopus maya* e *Octopus vulgaris* no México. Disponível em: <<http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx>>. Acesso em: 20 de novembro de 2015.
- DOMINGUES, P. M. T.; SYKES, A.; ANDRADE, J. P. The effects of temperature in the life cycle of two consecutive generations of the cuttlefish *Sepia officinalis* (Linnaeus, 1758), cultured in the Algarve (South Portugal). **Aquaculture International**, v. 10, p. 207–220. 2002.
- ELLIS, R. P.; PARRY, H.; SPICER, J. I.; HUTCHINSON, T. H.; PIPE, R. K.; WIDDICOMBE, S. Immunological function in marine invertebrates: responses to environmental perturbation. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 30, p. 1209–1222. 2011.
- ELSTON, R.; LOCKWOOD, G. S. Pathogenesis of vibriosis in cultured juvenile red abalone, *Haliotis rufescens* Swainson. **Journal of Fish Diseases**, v. 6, p. 111–128. 1983.
- EU. European Parliament and Council of the European Union. Directive 2010/63/EU of The European parliament and of the council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. **Official Journal of European Union**, p. 33–79. 2010.
- FAN, T.; LI, M.; WANG, J.; YANG, L.; CONG, R. Purification and characterization of phenoloxidase from *Octopus ocellatus*. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 41, n. 10, p. 885–872. 2009.
- FAO. Food and Agricultural Organization. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Roma: FAO, 2014. 223 p.
- FARTO, R.; ARMADA, S. P.; MONTES, M.; GUISANDE, J. A.; PEREZ, M. J.; NIETO, T. P. *Vibrio lentus* associated with diseased wild octopus (*Octopus vulgaris*). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 83, p. 149–156. 2003.

- FÉRAL, J. P. Wound healing after arm amputation in *Sepia officinalis* (Cephalopoda: Sepioidea). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 52, p. 380–388. 1988.
- FORD, L. A.; ALEXANDER, S. K.; COOPER, K. M.; HANLON, R. T. Bacterial populations of normal and ulcerated mantle tissue of the squid, *Lolliguncula brevis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 48, p. 13–26. 1986.
- FORD, L. A. Host defense mechanisms of cephalopods. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 2, p. 25–41. 1992.
- FORSYTHE, J. W.; HANLON, R. T. Effect of temperature on laboratory growth, reproduction and life span of *Octopus bimaculatus*. **Marine Biology**, v. 98, p. 369–379. 1988.
- FROESCH, D.; MARTHY, H. J. The structure and function of the oviducal gland in octopods (Cephalopoda). **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 188, p. 95–101. 1975.
- GARCÍA-GARCÍA, B.; AGUADO GIMÉNEZ, F. Influence of diet on on-growing and nutrient utilization in the common octopus (*Octopus vulgaris*). **Aquaculture**, v. 211, p. 171–182. 2002.
- GARCÍA-GARCÍA, B.; VALVERDE, J. C. Optimal proportions of crabs and fish in diet for common *Octopus* (*Octopus vulgaris*) on-growing. **Aquaculture**, v. 253, p. 502–511. 2006.
- GASALLA, M. A.; PÓSTUMA, F. A.; TOMÁS, A. R. G. Captura de lulas (Mollusca: Cephalopoda) pela pesca industrial desembarcada em Santos: Comparação após 4 décadas. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**, v. 9, n. 2, p. 5–8. 2005.
- GESTAL, C.; ABOLLO, E.; PASCUAL, S. Observations on associated histopathology with *Aggregata octopiana* infection (Protista: Apicomplexa) in *Octopus vulgaris*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 50, p. 45–49. 2002a.
- GESTAL, C.; PÁEZ DE LA CADENA, M.; PASCUAL, S. Malabsorption syndrome observed in the common octopus *Octopus vulgaris* infected with *Aggregata octopiana* (Protista: Apicomplexa). **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 51, p. 61–65. 2002b.
- GLEADALL, I. G. The effects of prospective anaesthetic substances on cephalopods: Summary of original data and a brief review of studies over the last two decades. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 447, p. 23–30. 2013a.
- GLEADALL, I. G. Low dosage of magnesium sulphate as a long-term sedative during transport of firefly squid, *Watasenia scintillans*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 447, p. 138–139. 2013b.

- GONZÁLEZ, A. F.; PASCUAL, S.; GESTAL, C.; ABOLLO, E.; GUERRA, A. What makes a cephalopod a suitable host for parasite? The case of Galician waters. **Fisheries Research**, v. 60, p. 177–183. 2003.
- GORE, S. R.; HARMS, C. A.; KUKANICH, B.; FORSYTHE, J.; LEWBART, G. A.; PAPICH, M. G. Enrofloxacin pharmacokinetics in the European cuttlefish, *Sepia officinalis*, after a single injection and bath administration. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 28, p. 433–439. 2005.
- GUERRA, A. Mollusca, Cephalopoda. In: RAMOS, M. A.; ALBA, J.; BELLÉS, X.; GONSÁLBEZ, J.; GUERRA, A.; MACPHERSON, E.; MARTÍN, F.; SERRANO, J.; TEMPLADO, J. (Ed.). **Fauna Ibérica**. Madrid: Museo Nacional de Ciencias Naturales. v. 1. CSIC, 1992.. 327 p.
- HAIMOVICI, M.; LEITE, T. S.; MARINHO, R. A.; BATISTA, B.; MADRID, R. M.; OLIVEIRA, J. E. L.; DE LIMA, F. D.; CANDICE, L. L. As pescarias de polvos do nordeste do Brasil. In: HAIMOVICI, M.; FILHO, J. M. A.; SUNYE, P. S. (Eds.). **A pesca marinha e estuarina no Brasil: estudos de caso multidisciplinares**. Rio Grande: Editora da Furg, 2014. p. 147–160.
- HANLON, R. T.; TURK P. E.; LEE P. G. Squid and cuttlefish mariculture: an updated perspective. **Journal of Cephalopod Biology**, v. 2, p. 31–40. 1991.
- HANLON, R. T.; FORSYTHE, J. W. Advances in the laboratory culture of Octopuses for biomedical research. **Laboratory Animal Science**, v. 35, n. 1, p. 33–40. 1985.
- HANLON, R. T.; FORSYTHE, J. W. Diseases of Mollusca: Cephalopoda. Diseases caused by microorganisms. In: KINNE, O. (Ed.). **Diseases of marine animals. Introduction, Cephalopoda, Annelida, Crustacea, Chaetognatha, Echinodermata, Urochordata, III**. Hamburg: Biologische, Anstalt, Helgoland, 1990a. p. 23–46.
- HANLON, R. T.; FORSYTHE, J. W. Diseases of Mollusca: Cephalopoda. Structural abnormalities and neoplasia. In: KINNE, O. (Ed.). **Diseases of marine animals. Introduction, Cephalopoda, Annelida, Crustacea, Chaetognatha, Echinodermata, Urochordata, III**. Hamburg: Biologische Anstalt, Helgoland, 1990b. p. 203–228.
- HARMS, C. A.; LEWBART, G. A.; MCALARNEY, R.; CHRISTIAN, L. S.; GEISSLER, K.; LEMOS, C. Surgical excision of mycotic

- (*Cladosporium* sp.) granulomas from the mantle of a cuttlefish (*Sepia officinalis*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 37, p. 524–530. 2006.
- HOCHBERG, F. G. Diseases of Mollusca: Cephalopoda. In: KINNE, O. (Ed.). **Diseases of Marine Animals, Vol. III. Cephalopoda to Urochordata**. Hamburg: Biologisches Anstalt Helgoland, 1990. p. 47–227.
- IGLESIAS, J.; SÁNCHEZ, F. J.; OTERO, J. J.; MOXICA, C. Culture of octopus (*Octopus vulgaris*, Cuvier): present knowledge, problems and perspectives. Recent advances in Mediterranean aquaculture finfish species diversification. **Caution Options Mediterranean**, v. 47, p. 313–322. 2000.
- ITIS. **Integrated Taxonomic Information System**. Hierarquia taxonômica de *Octopus maya*. Disponível em: <<http://www.itis.gov>> Acesso em: 10 de novembro de 2015.
- JEREB, P.; ROPER, C. F. E.; NORMAN, M. D.; FINN, J. K. (Eds.). **Cephalopods of the world. An annotated and illustrated catalogue of cephalopod species known to date. Volume 3. Octopods and Vampire Squids. FAO Species Catalogue for Fishery Purposes**. No. 4, Vol. 3. Roma: FAO, 2014. p. 370.
- JURADO-MOLINA, J. A. Bayesian framework with implementation error to improve the management of the red octopus (*Octopus maya*) fishery off the Yucatán Peninsula. **Ciencias Marinas**, v. 36, p. 1–14. 2010.
- LACOU-LABARTHE, T.; BUSTAMANTE, P.; HÖRLIN, E.; LUNA-ACOSTA, A.; BADO-NILLES, A.; THOMAS-GUYON, H. Phenoloxidase activation in the embryo of the common cuttlefish *Sepia officinalis* and responses to the Ag and Cu exposure. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 27, p. 516–521. 2009.
- LE PABIC, C.; SAFI, G.; SERPENTINE, A.; LEBEL, J.; ROBIN, J.; KOUETA, N. Prophenoloxidase system, lysozyme and protease inhibitor distribution in the common cuttlefish *Sepia officinalis*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 172, n. 17, p. 96–104. 2014.
- LEE, P. G. Nutrition of cephalopods: fuelling the system. **Marine and Freshwater Behaviour and Physiology**, v. 25, n. 1/3, p. 35-51. 1994.
- LEE, P. G.; TURK, P. E.; FORSYTHE, J. W.; DIMARCO, F. P. Cephalopod Culture: Physiological, Behavioral and Environmental requirements. **Suisan Zoshoku**, v. 46, n. 3, p. 417–422. 1998.

- LEITE, T. S.; HAIMOVICI, M.; MOLINA, W.; WARNKE, K. Morphological and genetic description of *Octopus insularis*, a new cryptic species in the *Octopus vulgaris* Complex (Cephalopoda: Octopodidae) from the tropical Southwestern Atlantic. **Journal of Molluscan Studies**, v. 74, p. 63–74. 2008.
- LOCATELLO, L.; FIORITO, G.; FINOS, L.; RASOTTO, M. B. Behavioural and immunological responses to an immune challenge in *Octopus vulgaris*. **Physiology and Behavior**, v. 122, p. 93–99. 2013.
- MALHAM, S. K.; RUNHAM, N. W.; SECOMBES, C. J. Phagocytosis by haemocytes from the lesser octopus *Eledone cirrhosa*. **Iberus**, v. 15, p. 1–11. 1997.
- MALHAM, S. K.; COULSON, C. L.; RUNHAM, N. W. Effects of repeated sampling on the haemocytes and haemolymph of *Eledone cirrhosa* (Lam.). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 121, p. 431–440. 1998a.
- MALHAM, S. K.; RUNHAM, N. W.; SECOMBES, C. J. Lysozyme and antiprotease activity in the lesser octopus, *Eledone cirrhosa* (Lam.) (Cephalopoda). **Developmental and Comparative Immunology**, v. 22, p. 27–37. 1998b.
- MALHAM, S. K.; LACOSTE, A.; GÉLÉBART, F.; CUEFF, A.; POULET, S. A first insight into stress-induced neuroendocrine and immune changes in the octopus *Eledone cirrhosa*. **Aquatic Living Resources**, v. 15, p. 187–192. 2002.
- MANGOLD, K. M. *Octopus vulgaris*. In: BOYLE, P. R. **Cephalopod Life Cycle**. London: Academic Press, 1983. v. 1, p. 335–364.
- MANGOLD, K. *Octopus vulgaris*: review of the biology. In: LANG M. A.; HOCHBERG, F. G. (Eds.). **The fishery and market potential of *Octopus* in California**. Washington, D.C.: Smithsonian Institution, 1997. 190 p.
- MAZÓN, M. J.; PIEDECAUSA, M. A.; HERNANDEZ, M. D.; GARCIA-GARCIA, B. Evaluation of environmental nitrogen and phosphorus contributions as a result of intensive ongrowing of common octopus (*Octopus vulgaris*). **Aquaculture**, v. 26, n. 1/4, p. 226–235. 2007.
- MESSINGER, J. B. The visual attack of the cuttlefish, *Sepia officinalis*. **Animal Behaviour**, v. 16, p. 342–357. 1968.
- MESSINGER, J. B.; NIXON, M.; RYAN, K. P. Magnesium chloride as an anesthetic for cephalopods. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Comparative Pharmacology**, v. 82, p. 203–205. 1985.

- MLADINEO, I.; BOČINA, I. Extraintestinal gamogony of *Aggregata octopiana* in the reared common octopus (*Octopus vulgaris*) (Cephalopoda: Octopodidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 96, p. 261–264. 2007.
- MOLTSCHANIWSKYJ, N. A.; HALL, K.; LIPINSKI, M. R.; MARIAN, J. E. A. R.; NISHIGUCHI, M.; SAKAI, M.; SHULMAN, D. J.; SINCLAIR, B.; SINN, D. L.; STAUDINGER, M.; VAN GELDEREN, R.; VILLANUEVA, R.; WARNKE, K. Ethical and welfare considerations when using cephalopods as experimental animals. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 17, p. 455–476. 2007.
- MOONEY, T. A.; LEE, W. J.; HANLON, R. T. Long-duration anesthetization of squid (*Doryteuthis pealeii*). **Marine Freshwater Behaviors Physiology**, v. 43, p. 297–303. 2010.
- MOORE, J. W.; ULBRICHT, W.; TAKATA, M. Effect of ethanol on the sodium and potassium conductances of the squid axon membrane. **The Journal of General Physiology**, v. 48 p. 279–295. 1964.
- NARAOKA, T.; UCHISAWA, H.; MORI, H.; MATSUE, H.; CHIBA, S.; KIMURA, A. Purification, characterization and molecular cloning of tyrosinase from the cephalopod mollusk, *Illex argentinus*. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, p. 4026–4038. 2003.
- NOVOA, B.; TAFALLA, C.; GUERRA, A.; FIGUERAS, A. Cellular immunological parameters of the octopus, *Octopus vulgaris*. **Journal of Shellfish Research**, v. 21, p. 243–248. 2002.
- O'DOR, R. K.; WELLS, M. J. Energy and nutrient flow. In: BOYLE, P. R. (Ed.). **Cephalopod life cycles**. London: Academic Press, 1987. v. 2, p. 109–133.
- OVERSTREET, R. M.; HOCHBERG, F. G. Digenetic trematodes in cephalopods. **Journal of Marine Biology Association**, v. 55, p. 893–910. 1975.
- PASCUAL, S.; GESTAL, C.; ESTÉVEZ, J.M.; RODRÍGUEZ, H.; SOTO, M.; ABOLLO, E.; ARIAS, C. Parasites in commercially-exploited cephalopods (Mollusca: Cephalopoda) in Spain: an updated perspective. **Aquaculture**, v. 142, p. 1–10. 1996.
- PASCUAL, S.; GONZÁLEZ, A. GUERRA, A. Coccidiosis during octopus senescence: Preparing for parasite outbreak. **Fisheries Research**, v. 106, p. 160–162. 2010.
- REIMSCHUESSEL, R.; STOSKOPF, M. K.; BENNETT, R. O. Myocarditis in the common cuttlefish (*Sepia officinalis*). **Journal of Comparative Pathology**, v. 102, p. 291–297. 1990.

- ROCHA, F. **Biología, Ecología, Cultivo y Pesquerías de Cefalópodos.** Vigo, España: Instituto de Investigaciones Marinas (Consejo Superior de Investigaciones Científicas), 2003.
- RODRÍGUEZ, C.; CARRASCO, J. F.; ARRONTE, J. C.; RODRÍGUEZ, M. Common octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797) juvenile on-growing in floating cages. **Aquaculture**, v. 154, n. 1/4, p. 293–300. 2006.
- RODRÍGUEZ-DOMÍNGUEZ, H.; SOTO-BÚA, M.; IGLESIAS-BLANCO, R.; CRESPO-GONZÁLEZ, C.; ARIAS-FERNÁNDEZ, C.; GARCÍA-ESTÉVEZ, J. Preliminary study on the phagocytic ability of *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 (Mollusca: Cephalopoda) haemocytes in vitro. **Aquaculture**, v. 254, p. 563–570. 2006.
- RODRÍGUEZ-CANUL, R.; PÉREZ-CAMPOS, R. A.; PÉREZ-VEGA, J. A.; PASCUAL, C.; GUILLEN-HERNÁNDEZ, S.; ARJONA-BURGOS, I. J. The red octopus, *Octopus maya*, as putative paratenic host for WSSV: evaluation in experimental and natural conditions. In: Cephalopod International Advisory Council Symposium. Santa Catarina, Brasil. **Abstract Book of the 2012 Cephalopod International Advisory Council Symposium**, Florianópolis, Brasil, 2012. p. 231.
- RÖGENER, W.; RENWRANTZ, L.; UNLENBRUCK, G. Isolation and characterization of a lectin from the hemolymph of the cephalopod *Octopus vulagris* (Lam.) inhibited by a-d-lactose and N-acetyl-lactosamine. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 9, p. 605–616. 1985.
- ROPER, C. F. E.; SWEENEY, M. J.; NAUEN, C. E. FAO Species Catalogue. 3. Cephalopods of the World. An Annotated and Illustrated Catalogue of Species of Interest to Fisheries. In: FAO **Fisheries Synopsis No. 125**, Rome, Italy: FAO, 1984. v. 3, 277 p.
- ROSAS, C.; CUZON, G.; PASCUAL, C.; GAXIOLA, G.; CHAY, D.; LOPEZ, N.; MALDONADO, T.; DOMINGUES, P. M. Energy balance of *Octopus maya* fed crab or an artificial diet. **Marine Biology**, v. 152, p. 371–381. 2007.
- ROSAS, C.; TUT, J.; BAEZA, J.; SÁNCHEZ, A.; SOSA, V.; PASCUAL, C.; ARENA, L.; DOMINGUES, P.; CUZON, G. Effect of type of binder on growth, digestibility, and energetic balance of *Octopus maya*. **Aquaculture**, v. 275, p. 291–297. 2008.
- ROSAS, C.; VALERO, A.; CAAMAL-MONSREAL, C.; URIARTE, I.; FARIAS, A.; GALLARDO, P.; SÁNCHEZ, A.; DOMINGUES, P. Effects of dietary protein sources on growth, survival and digestive

- capacity of *Octopus maya* juveniles (Mollusca: Cephalopoda). **Aquaculture Research**, v. 44, p. 1029–1044. 2012.
- ROSAS, C.; GALLARDO, P.; MASCARÓ, M.; CAAMALMONSREAL, C.; PASCUAL, C.; *Octopus maya*. In: IGLESIAS, J.; FUENTES, L.; VILLANUEVA R. (Eds.), **Cephalopod Culture**. Springer: Dordrecht, Heidelberg, New York, London, 2014. p. 383–396.
- SANGSTER, C. R.; SMOLOWITZ, R. M. Description of *Vibrio alginolyticus* infection in cultured *Sepia officinalis*, *Sepia apama*, and *Sepia pharaonis*. **Biological Bulletin**, v. 205, n. 2, p. 233–234. 2003.
- SARDELLA, N. H.; RE, M. E.; TIMI, J. T. Two new *Aggregata* species (Apicomplexa: Aggregatidae) infecting *Octopus tehuelchus* and *Enteroctopus megalocyathus* (Mollusca: Octopodidae) in Patagonia, Argentina. **Journal of Parasitology**, v. 86, p. 1107–1113. 2000.
- SCIMECA, J. M. Cephalopods. In: LEWBART, G. A. (Ed.). **Invertebrate Medicine**. Second Edition. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2011. p. 113–125.
- SOLÍS-RAMÍREZ, M. J. **Aspectos biológicos del pulpo *Octopus maya* Voss y Solís**. Instituto Nacional Investigaciones Biología Pesqueras, v. 18, p. 1–90. 1967.
- SOLÍS-RAMÍREZ, M. J.; CHÁVEZ, E. A. Evaluación y régimen óptimo de pesca del pulpo en la Península de Yucatán. **Anales del Instituto de Ciencias Marinas y Limnología**, v. 13, p. 1-18. 1985.
- SOLÍS-RAMÍREZ, M. J. La pesquería del pulpo del Golfo de México y Caribe mexicano. In: **Atlas Pesquero y Pesquerías Relevantes de México**. Secretaría de Pesca, Colima: INP, CENEDIC, Universidad de Colima, México. 1994. CD-ROM.
- SWEENEY, M. J.; ROPER, C. F. E.; MANGOLD, K. M.; CLARKE, M. R.; BOLETZKY, S. V. **“Larval” and juvenile cephalopods: a manual for their identification**. Washington, D.C.: Smithsonian Institution Press, 1992. 282 p.
- TEIXEIRA, P. B.; BRANDÃO, A. G.; FERREIRA, J. F.; MELO, C. M. R. Engorda do polvo *Octopus vulgaris* em gaiolas flutuantes de pequeno porte. **Revista Agropecuária Catarinense**, v. 27, n. 1, p. 51–53. 2014.
- VAN HEUKELEM, W. F. Laboratory maintenance, breeding, rearing, and biomedical research potential of the Yucatan octopus (*Octopus maya*). **Laboratory Animal Science**, v. 27, n. 5, p. 852–859. 1977.

- VAN HEUKELEM, W. F. *Octopus maya*. In: BOYLE, P. R. (Ed.), **Cephalopod Life Cycles**. Vol. I. London: Academic Press, 1983. p: 311–323.
- VARGAS-ALBORES, F.; BARRACCO, M. **Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura**. México: Editorial LIMUSA, 2001. p. 147–146.
- VAZ-PIRES, P.; SEIXAS, P.; BARBOSA, A. Aquaculture potential of the common octopus (*Octopus vulgaris* Cuvier, 1797): a review. **Aquaculture**, v. 238, p. 221–238. 2004.
- VIDAL, E. A. G.; VILLANUEVA, R.; ANDRADE, J. P.; GLEADALL, I. G.; IGLESIAS, J.; KOUETA, N.; ROSAS, C.; SEGAWA, S.; GRASSE, B.; FRANCO-SANTOS, R. M.; ALBERTIN, C. B.; CAAMAL-MONSREAL, C.; CHIMAL, M. E.; EDSINGER-GONZALES, E.; GALLARDO, P.; LE PABIC, C.; PASCUAL, C.; ROUMBEDAKIS, K.; WOOD, J. Cephalopod culture: current status of main biological models and research priorities. In: VIDAL, E. A. G. (Ed). **Advances in Marine Biology. Advances in Cephalopod Science: Biology, Ecology, Cultivation and Fisheries**. Amsterdam: Elsevier, 2014. v. 67, p. 1–98.
- VILLANUEVA, R.; SYKES, A. V.; VIDAL, E. A. G.; ROSAS, C.; NABHITABHATA, J.; FUENTES, L.; IGLESIAS, J. Current Status and Future Challenges in Cephalopod Culture. In: IGLESIAS, J.; FUENTES, L.; VILLANUEVA, R. (Eds.) **Cephalopod Culture**. Springer: Dordrecht, Heidelberg, New York, London, 2014. p. 479–490.
- VOSS, G. L.; SOLÍS-RAMIREZ, M. J. *Octopus maya*, a new species from the Bay of Campeche, Mexico. **Bulletin of Marine Science**, v. 16, p. 615–625. 1966.
- WELLS, M. J. **Octopus: physiology and behaviour of an advanced invertebrate**. London: Chapman and Hall, 1978. 431 p.
- WEST, G.; HEARD, D.; CAULKETT, N. **Zoo Animal & Wildlife: Immobilization and Anesthesia**. Iowa: Blackwell Publishing, 2007. 718 p.