

ANEXO I

PEIXES MANTIDOS EM INSTALAÇÕES DE INSTITUIÇÕES DE ENSINO OU PESQUISA CIENTÍFICA – II

I - INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o debate em torno do uso de animais para atender às necessidades humanas se intensificou. A mais controversa de todas é o uso de animais nas pesquisas biológicas, comportamentais e nos testes de produtos comerciais. Com a criação do CONCEA (Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal), surgiu uma série de leis e emendas que abrangem os cuidados com animais em laboratórios (tanto na pesquisa quanto no uso em aulas práticas) e em outras instalações. Essas leis e emendas incluem os preceitos dos três R's (do inglês Reduction, Refinement e Replacement): **Redução** no número de animais necessários para pesquisa; **Refinamento** de técnicas que possam causar menos estresse ou sofrimento; **Substituição** de animais vivos por simulações ou culturas de células sempre que possível (RUSSELL & BURCH, 1959).

Segundo Cleveland e colaboradores (2002), o desenvolvimento na biologia celular e molecular contribuiu para diminuir o uso de animais em estudos e testes de produtos químicos. Ele estimulou os pesquisadores a descobrir alternativas mais baratas e mais eficientes. No entanto, os computadores e o cultivo de células podem simular efeitos nos sistemas de organismos como, por exemplo, de drogas, e isto só pode ocorrer quando os princípios básicos envolvidos são bem conhecidos. Portanto, a modelagem computacional não é suficiente. Desta forma, estudos recentes demonstram que, embora a busca de alternativas para animais em pesquisa e testes continue, a substituição completa destes animais no futuro é praticamente nula (CLEVELAND *et al.*, 2002). Assim, os objetivos imediatos incluem a redução do número de animais utilizados (tanto mamíferos quanto outros vertebrados) e refinamento de procedimentos experimentais para reduzir o desconforto dos animais testados e manter o bem estar dos mesmos. O progresso da ciência depende da pesquisa realizada com animais. Todas as drogas e vacinas desenvolvidas para melhorar a saúde humana foram testadas primeiro em animais. A pesquisa com animais permitiu que a ciência médica eliminasse doenças como a varíola e a poliomielite e imunizasse contra doenças anteriormente comuns e com frequência fatais, incluindo a difteria, a caxumba e a rubéola. Também ajudou a criar tratamentos para o câncer, diabetes, doenças cardíacas e psicoses maníaco-depressivas, e para desenvolver procedimentos cirúrgicos, incluindo cirurgia cardíaca, transfusões de sangue e remoção de catarata. As pesquisas sobre a AIDS são totalmente dependentes de estudos que utilizam animais (CLEVELAND *et al.*, 2002).

Desta forma, a busca de novos modelos experimentais se intensificou nos últimos anos devido à necessidade de substituir alguns animais principalmente mamíferos (roedores e primatas não humanos) em determinados tipos de protocolos experimentais. Por esta razão, os peixes se mostraram um bom modelo biológico, visto que eles exibem enorme diversidade em sua morfologia, nos habitats que ocupam e em sua biologia. Segundo Nelson (2006), essa diversidade é, em parte, o que torna a compreensão da história evolutiva e o estabelecimento de uma classificação dos peixes tão difícil. De peixes bruxa e lampreias, tubarões, peixes ósseos a peixes pulmonados, eles incluem uma vasta gama de vertebrados distantes, mas relacionados. Com base na classificação cladística, os peixes ósseos, o grupo de peixes dominante em número de espécies, estão mais relacionados aos mamíferos do que aos

tubarões, o que os torna um excelente modelo experimental. Apesar de sua diversidade, eles são importantes para os pesquisadores por causa da riqueza de informações que não foram ainda totalmente elucidadas (NELSON, 2006).

Outro ponto forte dos peixes como bons modelos biológicos é o fato de serem de imenso valor para os seres humanos. Eles têm sido um item básico na dieta de muitos povos e são importantes na economia de muitas nações, ao mesmo tempo em que apresentam valor recreativo e psicológico incalculável. Aspectos particulares de várias espécies se prestam a estudos de comportamento, ecologia, evolução, genética e fisiologia. São usados como indicadores gerais ou somadores da poluição, em parte pelo benefício direto e importância para os seres humanos (NELSON, 2006).

O comportamento dos peixes é tão diverso quanto a sua morfologia. Eles são adaptados a uma grande variedade de dietas e vivem em quase todos os tipos conhecidos de habitat aquático. Alguns produzem veneno, eletricidade, som ou luz (NELSON, 2006).

Diante do exposto acima, várias espécies de peixes podem ser utilizadas como modelo experimental, basta que o pesquisador saiba escolher a espécie adequada para o seu arranjo experimental. O zebrafish (*Danio rerio*), um teleósteo da família Cyprinidae, conhecido como paulistinha no Brasil, é um bom exemplo. Inicialmente foi utilizado por George Streisinger como modelo em seus estudos genéticos (STREISINGER *et al.* 1981). Suas principais características tornam este peixe um modelo seguro na pesquisa nos dias atuais. Medindo aproximadamente de três a quatro centímetros de comprimento, este teleósteo pode ser facilmente mantido e distribuído nos aquários, necessitando de pouco espaço. Além disso, possui baixo custo, sendo mais barato do que roedores. Eles apresentam alta taxa de fecundidade e seus embriões são transparentes e possuem uma rápida maturação sexual, entre três e seis meses (HILL *et al.*, 2005).

Do ponto de vista evolutivo, o zebrafish é mais próximo dos seres humanos do que as drosófilas, há quase um século usadas como organismo modelo em genética. O genoma do zebrafish, concluído no início de 2013, indica que 70% de seus 26 mil genes são semelhantes aos genes humanos – essa similaridade é menor com a drosófila e maior com camundongos e ratos, que serviram de base para muito do que se conhece de fisiologia humana (ZORZETTO & GUIMARÃES, 2013). Segundo Zorzetto e Guimarães (2013), no Brasil, os primeiros trabalhos feitos com o Zebrafish foram realizados no laboratório da pesquisadora Rosana Mattioli, da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), no interior de São Paulo. Naquela época, o zebrafish começava a ser usado nas pesquisas em neurociências e teste de medicamentos, mas o comportamento natural da espécie ainda era pouco conhecido. Rosana, então, realizou uma série de experimentos simples que ajudou a identificar a preferência do peixe por viver em ambientes escuros.

A produção científica nacional utilizando o zebrafish, que inexistia há pouco mais de uma década, vem crescendo de modo acelerado nos últimos anos, num ritmo maior do que no restante do mundo. A produção brasileira saiu de 2 artigos por ano em 1999 para 36 em 2012, quando passou a representar cerca de 2% dos trabalhos com zebrafish publicados no mundo (ZORZETTO & GUIMARÃES, 2013). Este peixe é um modelo novo na área de neurociências no Brasil e a comunidade que trabalha com ele ainda é muito pequena.

Outro exemplo é o peixe teleósteo cavernícola, *Astyanax mexicanus*, pertencente à ordem Characiformes e intimamente relacionado ao zebrafish. Ele apresenta retinas

degeneradas e portanto é cego, globos de gordura no fígado, níveis elevados de açúcar no sangue e de insulina - tudo isso pode significar problemas de saúde para os humanos, mas para eles são um modo de vida. Agora, alguns pesquisadores argumentam que estas adaptações do *A. mexicanus* podem lançar luz sobre doenças que acometem os humanos (PENNISI, 2016). Este peixe apresenta também sono caracterizado por períodos prolongados de quiescência e reduzida capacidade de resposta aos estímulos sensoriais. Animais tais como insetos e mamíferos se adaptam a ambientes com pouco alimento, suprimindo o sono e aumentando sua resposta a estímulos alimentares, mas pouco se sabe sobre a relação genética e evolutiva. entre esses processos. Portanto, o *A. mexicanus* é um modelo poderoso para elucidar os mecanismos genéticos subjacentes à evolução comportamental (YOSHIZAWA *et al.*, 2015).

Mas não são só estes peixes que são utilizados como modelo experimental. Aqui no Brasil, a tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus* - peixe introduzido), o tambaqui (*Colossoma macropomum*), o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e muito outros são utilizados em vários estudos de fisiologia cardiorrespiratória e testes de memória (ARMELIN *et al.*, 2016; ZERAIK *et al.*, 2013; TAYLOR *et al.*, 2009; DELICIO & BARRETO, 2008; FLORINDO *et al.*, 2006). Mas, eles não têm apenas valor científico. São criados para produção de alimentos e, portanto, apresentam também um grande valor comercial, juntamente com outras espécies criadas para esse fim.

O objetivo deste guia é apresentar métodos e procedimentos adequados de criação e manutenção destes peixes em cativeiro, garantindo condições adequadas de estrutura e de saúde para a sua integridade como modelo de experimentação pautada nas normas de bem-estar animal. O que será apresentado abaixo foi obtido pelo esforço integrado de vários profissionais dentro de suas devidas áreas, com o objetivo fornecer, para aquelas pessoas que queiram trabalhar com peixes, subsídios e formas adequadas de mantê-los em cativeiro.

1.1. Bem-estar animal

Peixes sob tutela humana, como aqueles mantidos em biotérios e laboratórios, encontram-se em um ambiente em que são os humanos que determinam a maior parte dos aspectos de sua vida: tamanho do recinto, qualidade da água, quantidade e qualidade do alimento ingerido, regime de luz, presença de indivíduos da mesma espécie ou de espécies diferentes, ocorrência de manejo, entre outros. Por isso, cabe aos cuidadores de biotérios e laboratórios assegurar que as necessidades básicas dos peixes estão sendo saciadas e estes animais não estão sendo submetidos a situações de desconforto. Nesse contexto, devemos nos preocupar com a identificação e manutenção do bem-estar desses animais. O conceito de bem-estar é bastante complexo, sendo considerado uma característica individual da relação do animal com o meio e que pode variar em um contínuo que vai desde um bem-estar comprometido, ou pobre, até um bem-estar assegurado, ou bom (BROOM, 1991). O ambiente em que o animal vive pode ser considerado apropriado se é capaz de prover ao animal a satisfação de suas necessidades (BROOM, 2008). Quando o animal não é capaz de controlar suas interações com o ambiente e apresenta dificuldade em se adaptar a essa situação, ou quando suas necessidades não são atendidas, associamos essa condição a um bem-estar pobre ou comprometido (BROOM, 2008). Entretanto, embora muita atenção na questão do bem-estar tenha sido voltada para a redução de desconforto/sofrimento dos animais, devemos também considerar a satisfação das motivações e necessidades dos animais: a ausência de desconforto e doença não significa necessariamente bem-estar assegurado. O cuidado com o bem-estar animal não deve se limitar apenas a identificar e sanar situações de bem-estar

comprometido, mas também procurar promover condições para que os animais possam saciar sua motivação para realizar comportamentos recompensadores, melhorando seu bem-estar geral (MELLOR, 2016).

Uma questão constantemente abordada sobre a preocupação com o bem-estar é se o grupo animal em questão possui senciência, ou seja, se o animal em questão é capaz de ter experiências subjetivas como dor, prazer, desconforto. De acordo com Volpato e colaboradores (2007), três abordagens são importantes para a avaliação da ocorrência de senciência nos animais: a presença de estruturas encefálicas homólogas àquelas envolvidas na consciência humana; a presença dos mecanismos fisiológicos associados à sensação de dor; e a ocorrência de alterações comportamentais nos animais após serem submetidos a estímulos nocivos/potencialmente dolorosos. Grupos animais que apresentam essas três características seriam considerados sencientes e, portanto, seu bem-estar deve ser assegurado.

1.2. Senciência em peixes

O termo “senciência” refere-se à capacidade de um ser afetado positiva ou negativamente, ter experiências, estando diretamente associado à concepção de consciência. Embora se possa acreditar que somente animais com alta complexidade biológica, como os seres humanos, tenham esta capacidade, a senciência surgiu em algum momento na evolução e pode ter surgido há muito tempo e estar distribuída de maneira mais ampla através das espécies animais (MOLENTO, 2005).

1.2.1. Embora o telencéfalo dos peixes não seja estruturalmente capaz de sustentar estados avançados de consciência, o sistema nervoso desses animais permite processos como percepção, aprendizado e memória, tornando-os aptos a evitar estímulos e situações que causam desconforto e nocicepção (HOFFMANN, 2008). A consciência é uma função do sistema nervoso que comporta vários fenômenos (ROTH, 2001), podendo ser dividida em dois tipos: a consciência primária e a expandida (EDELMAN & TONONI, 2000), conforme descrição abaixo:

a) estados gerais da consciência ou consciência primária: a consciência primária não apresenta uma ligação clara com um conteúdo mental. Este tipo de consciência é responsável pelo controle da vigilância, da fadiga, do conforto, da percepção da duração temporal e do layout espacial e serve de suporte para tipos mais específicos ou complexos da consciência. Esses diferentes estados gerais da consciência podem ser afetados seletivamente por lesões específicas do sistema nervoso e essas estruturas foram conservadas ao longo da evolução entre os vertebrados. Uma dessas estruturas é a formação reticular do tronco cerebral, onde se situam alguns agrupamentos celulares que originam vias ascendentes que se projetam difusamente para todas as regiões anteriores do sistema nervoso, inclusive para as regiões neocorticais, diferenciadas mais recentemente (HOFFMANN, 2008).

b) consciência expandida: a consciência expandida comporta estados como percepção consciente do ambiente e do próprio corpo, atividades mentais (pensar, imaginar, lembrar e planejar), consciência autobiográfica, percepção da realidade e autopercepção. Foi o desenvolvimento do *pallium* nos mamíferos, sobretudo das áreas associativas do neocórtex, que permitiu o aparecimento dessa consciência (EDELMAN & TONONI, 2000).

Neste contexto, é possível que os peixes apresentem estados da consciência primária como uma função do sistema nervoso (CHANDROO *et al.*, 2004). Tem sido sugerido que a

consciência evoluiu gradativamente e que diferentes espécies de animais podem apresentar diferentes graus de consciência (DUNCAN, 1996). Sendo assim, a existência de uma consciência primária é uma justificativa plausível para se abordar a questão da percepção da dor e bem estar em peixes.

1.3. Questão da nocicepção e sensibilidade à dor em peixes

A percepção da dor e nocicepção em vertebrados primitivos, como peixes, tem sido um assunto amplamente debatido no meio científico. Devido ao seu encéfalo estruturalmente simples, associado à ausência de estruturas encefálicas como o neocórtex por exemplo, os peixes foram considerados, por muito tempo, animais insensíveis à dor (ROSE, 2002; ARLINGHAUS *et al.*, 2007). Entretanto, a percepção da dor e nocicepção também envolvem estruturas corticais e subcorticais presentes nos peixes, e estudos recentes apontam que estes animais podem ser sensíveis a estímulos nocivos (SNEDDON *et al.*, 2003a; NEWBY & STEVENS, 2008; REILLY *et al.*, 2008; ROQUES *et al.*, 2010; ALVES *et al.*, 2013; WOLKERS *et al.*, 2013, 2015a, 2015b). Sendo assim, o uso de peixes na pesquisa científica e no ensino deve considerar o bem-estar e as questões éticas envolvidas no uso destes animais.

1.3.1. De acordo com Bateson (1991), os principais critérios para se determinar se um animal é capaz de experimentar a dor são:

a) Nociceptores: a presença de nociceptores (terminações nervosas livres) em peixes foi descrita pela primeira vez na década de 1970 (WHITEAR, 1971) e, mais recentemente, foi demonstrado que estes receptores respondem a estímulos nocivos como pressão, calor e químicos irritantes (ácido acético) (SNEDDON, 2002; SNEDDON, 2003a, b).

b) Estruturas encefálicas e vias de condução: assim como os mamíferos, os peixes apresentam vias espinhais relacionadas à condução de informações nociceptivas, incluindo os tratos espinotalâmicos, espinomesencefálicos, espinoreticulares, espinolímbicos (CHANDROO *et al.*, 2004a) e o trato trigeminal. Além disso, dados eletrofisiológicos demonstram que a estimulação nociva cutânea de peixes provocam potenciais evocados em várias regiões do sistema nervoso central, incluindo o telencéfalo (DUNLOP & LAMING, 2005; NORDGREEN *et al.*, 2007), sugerindo que estas informações ascendem ao encéfalo para serem processadas. Com relação à estrutura encefálica, a despeito da ausência de um neocórtex, os peixes possuem um telencéfalo altamente diferenciado, com capacidade de processamento de informações sensoriais, sendo intensamente interconectado com outras regiões encefálicas como o mesencéfalo e o diencéfalo (RINK & WULLIMANN, 2004), apresentando atividade após a estimulação nociva (DUNLOP & LAMING, 2005) e contendo estruturas que guardam homologia com a amígdala (telencéfalo dorsomedial) e o hipocampo (telencéfalo dorsolateral) mamífero (PORTAVELLA *et al.*, 2002, 2004). Há, ainda, evidências da participação da região dorsomedial do telencéfalo na modulação da analgesia induzida pelo estresse no peixe *Leporinus macrocephalus* (WOLKERS *et al.*, 2015a, 2015b), sugerindo que essa região pode desempenhar um papel semelhante à amígdala dos mamíferos na modulação da nocicepção.

c) Substâncias opioides endógenas e receptores: os peixes apresentam um sistema opioide funcional, semelhante ao de outros vertebrados, apresentando todos os principais tipos de receptores opioides (delta, kappa e mu), com estrutura proteica semelhante aos dos receptores de mamíferos (BUATTI & PASTERNAK, 1981; VELLASCO *et al.*, 2009;

DREBROG *et al.*, 2008) e amplamente distribuídos nas regiões relacionadas ao processamento de informações sensoriais (GONZALEZ-NUNEZ & RODRIGUEZ, 2009).

d) Redução da resposta nociceptiva em resposta a analgésicos: embora pouco seja conhecido a respeito da analgesia em peixes, estudos demonstram que a aplicação de substâncias analgésicas opioides como a morfina (SNEDDON *et al.*, 2003a; NEWBY *et al.*, 2007) e o tramadol (CHERVOVA & LAPSHIN, 2000) reduz as respostas comportamentais e fisiológicas desencadeadas pelo estímulo nocivo. Além disso, situações estressantes, como um longo período de subordinação social (ASHLEY *et al.* 2007), a presença de substância de alarme de coespecífico (ALVES *et al.*, 2013) e a restrição de espaço (WOLKERS *et al.*, 2013) são capazes de ativar um sistema analgésico endógeno em peixes, de maneira similar ao observado e mamíferos.

e) Aprendizado de evitação e suspensão do comportamento normal: os peixes apresentam uma ampla variedade de respostas fisiológicas e comportamentais a estímulos nocivos incluindo comportamentos atípicos (rubbing e rocking) (SNEDDON, 2003a), aumento na frequência ventilatória (SNEDDON, 2003a; NEWBY & STEVENS, 2008; ALVES *et al.*, 2013), perda do equilíbrio (NEWBY & STEVENS, 2008), aumento da atividade natatória e hiperatividade (ROQUES *et al.*, 2010, ALVES *et al.*, 2013; WOLKERS *et al.*, 2013), além da liberação de muco pelas células das brânquias e alterações nos transportadores de íons da membrana (ROQUES *et al.*, 2010). Além disso, são capazes de aprender a evitar os estímulos nocivos, sendo esta aprendizagem flexível e dependente das condições ambientais (DUNLOP *et al.*, 2006; MILLSOPP & LAMING, 2007).

1.3.2. Sendo assim, embora não seja possível afirmar definitivamente a sensibilidade dos peixes à dor, estes atendem a todos os critérios definidos para se determinar a percepção da dor em animais, sendo, portanto, de extrema importância que a possibilidade de dor e sofrimento seja levada em consideração quando as práticas de manejo são definidas, visando ao bem estar destes animais.

II - OBTENÇÃO DE ANIMAIS

2.1. Captura de animais da natureza

A captura de peixes nativos em ambientes naturais deve obdecer à legislação vigente, devendo ser realizada apenas após emissão de licenças dos órgãos competentes, sejam eles Federais ou Estaduais, levando em consideração a espécie e seu habitat. Atualmente, a Portaria nº 445, de 17 de dezembro de 2014, do Ministério do Meio Ambiente, explicita as regras para uso das espécies de peixes ameaçadas de extinção.

2.1.1. Além desta Portaria, destacam-se as seguintes instruções normativas:

a) Instrução Normativa IBAMA nº 56, de 23 de novembro de 2004 - define os métodos de captura e transporte de exemplares vivos de peixes marinhos nativos do Brasil para uso ornamental.

b) Instrução Normativa MMA nº 30, de 13 de setembro de 2005 - define os métodos de captura, o transporte e o armazenamento de peixes da bacia hidrográfica do rio Paraná.

2.2. Reprodução em cativeiro

A reprodução de peixes em cativeiro é uma atividade de rotina tanto em biotérios quanto no setor produtivo e que veio substituir a dependência da captura de peixes do ambiente natural.

2.2.1 Origem das matrizes: a origem das matrizes que passarão a compor o plantel de reprodutores é dependente dos objetivos da unidade de produção de juvenis. Caso a reprodução dos peixes tenha como objetivo a produção de juvenis destinados à cadeia da piscicultura encarregada da produção de carne, devem ser escolhidos exemplares oriundos de programas de seleção e/ou de melhoramento genético que contenham as melhores características zootécnicas para maximizar o desempenho no ambiente de criação, ou mesmo às exigências do mercado consumidor. Por outro lado, caso o objetivo dos reprodutores seja a produção de juvenis destinados à estocagem no ambiente natural, também conhecido como repovoamento, a seleção dos reprodutores deve considerar a máxima diversidade genética do plantel, mantendo correspondência da diversidade genética do plantel de reprodutores com a variabilidade genética do estoque receptor, ou seja, aquele estoque de peixes do ambiente natural que receberá a suplementação com juvenis produzidos em cativeiro.

A seleção dos exemplares que serão acasalados a cada manejo reprodutivo igualmente varia com o destino dos juvenis produzidos, sendo normalmente adotados procedimentos antagônicos. Enquanto naquele que objetiva produzir juvenis para a engorda é desejada a homogeneidade genética e de desempenho dos descendentes, mantendo as características selecionadas nas matrizes, no outro, que objetiva destinar os juvenis para liberação no ambiente natural, com finalidade de estocagem, quase sempre é esperado a heterogeneidade genética dos juvenis.

2.2.2. Indução à reprodução: ao serem dominadas as técnicas de reprodução em cativeiro das diferentes espécies de peixes, vários protocolos de manejo foram definidos para atender às exigências fisiológicas e comportamentais de cada espécie. Apesar disso, as técnicas utilizadas para a reprodução de peixes em cativeiro pode ser dividida em duas, quais sejam, indução ambiental e indução hormonal (ZANIBONI-FILHO & NUÑER, 2004), assim descritas:

a) Indução ambiental: a possibilidade de estimular a reprodução de todos os peixes por meio da indução ambiental é viável, visto que esse é o mecanismo que desencadeia todo o processo reprodutivo em condições naturais. Apesar disso, a complexidade dos mecanismos de controle do desenvolvimento gonadal e do comportamento reprodutivo, em muitos casos, dificulta essa simulação em condições de cativeiro. Dessa forma, essa técnica é normalmente utilizada para indução à maturação final, espermição/ovulação e desova de peixes não-migradores, tais como cará, traíra, tilápia e diversas espécies de uso ornamental.

Dentre as técnicas usuais de manipulação ambiental para indução à reprodução de peixes, as mais utilizadas estão relacionadas à variação da temperatura da água, do fotoperíodo, da condutividade da água, da densidade de estocagem dos peixes, da colocação de substratos ou refúgios, ou ainda, da combinação de alguns deles.

Nestes casos, uma proporção adequada de machos e fêmeas é estocada no ambiente de criação e inicia-se a manipulação ambiental. Após acontecer a reprodução dos peixes, duas estratégias podem ser adotadas, com resultados bastante diversos dependendo da espécie utilizada, quais sejam:

i) manter os parentais juntamente com os ovos para conluirem o cuidado parental e posteriormente remover os descendentes na fase de larva ou juvenil; e

ii) retirar os ovos imediatamente após a desova para incubação em condições controladas.

b) Indução hormonal: apesar da influência determinante das condições ambientais no ciclo reprodutivo dos peixes, fisiologicamente, os mecanismos de ajuste de todo o processo de maturação gonadal e desova é controlado através de controles hormonais (CAROLSFELD, 1989; ZANIBONI-FILHO & NUÑER, 2004). Dessa forma, a indução hormonal é uma técnica que pode ser utilizada com sucesso para distintas espécies de peixes e com diferentes estratégias reprodutivas. A técnica é simples e consiste na administração de hormônios estimulantes da maturação final e a espermiacão/ovulação dos peixes. Os hormônios são hidrossolúveis e isso facilita sua administração através de uma solução aquosa. Geralmente, é utilizada solução salina (0,6% NaCl) ou água destilada. A aplicação da solução é normalmente feita via intramuscular ou intraperitonal. A quantidade de hormônio necessária para induzir a maturação final e desova dos peixes depende do grau de maturação dos reprodutores, da espécie e do método escolhido para fazer a aplicação (ZANIBONI-FILHO & NUÑER, 2004). Dessa forma, a dosagem recomendada para induzir diferentes espécies pode ser bastante distinta.

Há inúmeras variações nos métodos para administração de hormônio em peixes. Porém, as fêmeas geralmente requerem doses maiores de hormônio do que os machos, sendo que doses parceladas produzem resultados melhores que uma única dose (WOYNAROVICH & HORVÁTH, 1983). O método típico para indução de peixes utiliza duas aplicações nas fêmeas e uma única aplicação nos machos (WOYNAROVICH & HORVÁTH, 1983). Essa dosagem é calculada em relação ao peso corporal, havendo necessidade de perfeito controle da dosagem aplicada em cada reprodutor. Dessa forma, a identificação dos reprodutores é um cuidado fundamental para distinguir indivíduos que receberão diferentes quantidades de hormônio. Além disso, a identificação durante a seleção dos peixes possibilita o controle do desempenho reprodutivo de cada exemplar do plantel. Há uma diversidade de marcas internas e externas que podem ser utilizadas para peixes. Uma análise comparativa da qualidade de cada uma das principais delas é apresentada por HARVEY & CAROLSFELD (1993).

A capacidade do técnico para a seleção de peixes maduros é vital para o sucesso do processo de indução da maturação final e desova, sendo considerada a etapa mais importante (CAROLSFELD, 1989). A seleção consiste na escolha de exemplares que estão com as gônadas maduras, no “estádio de dormência”, ou seja, aqueles peixes que têm maior probabilidade de responder positivamente ao tratamento de indução hormonal, resultando na ovulação/espermiacão de gametas viáveis (ZANIBONI-FILHO & NUÑER, 2004).

Apesar da enorme importância da seleção de peixes maduros, os critérios utilizados estão normalmente baseados em características subjetivas. Por exemplo, fêmeas com abdômen dilatado e macio que apresentam a papila genital intumescida e avermelhada (WOYNAROVICH & HORVÁTH, 1983). A dificuldade para padronização dos critérios para seleção dos reprodutores tem estimulado o desenvolvimento de pesquisas na busca de métodos mais objetivos, principalmente para a seleção de fêmeas, dentre os quais através da realização de biopsia ovariana (ZANIBONI-FILHO & NUÑER, 2004).

A seleção dos machos, na maioria das espécies, é feita através de pressão abdominal, de modo que os peixes maduros eliminam pequenas quantias de sêmen (ZANIBONI-FILHO & NUÑER, 2004). Em algumas espécies, a separação dos sexos é facilitada pela existência de dimorfismo sexual, tais como a presença de espículas na nadadeira anal dos machos de dourado (*Salminus brasiliensis*), matrinxã (*Brycon lundii*) e piracanjuba (*B. orbignyanus*), ou da emissão de sons pelos machos maduros de piauí (*Leporinus friderici*), piapara (*Megaleporinus obtusidens*) e curimatã (*Prochilodus lineatus*).

2.2.3. Manejo para seleção, aplicação de hormônios e desova: A reação ao manejo apresentada pelas diferentes espécies de peixes é bastante distinta, além da história de vida do lote a ser manejado. O manejo inadequado dos reprodutores pode estressar os animais e interferir negativamente no resultado final do tratamento, sem mencionar a possibilidade de perda do reprodutor. Existem métodos simples que podem ser adotados para reduzir o estresse durante o manejo, conforme indicação de Harvey e Carolsfeld (1993). São eles: reduzir a superpopulação de peixes apreendidos na rede, durante a captura; devolver os peixes ao tanque cuidadosamente, sem nunca jogá-los; sempre molhar as mãos e os equipamentos utilizados no manejo, para minimizar a retirada de muco e a perda de escamas; cobrir os olhos dos peixes com um pano úmido, sempre que possível; desenvolver técnicas para segurar os peixes sem maltratá-los; reduzir o ruído sonoro durante o manejo; utilizar, para peixes de água doce, água levemente salinizada durante o transporte dos peixes (1 a 2% de NaCl) e adicionar oxigênio quando o transporte for mais longo ou a densidade for elevada.

A administração de anestésicos pode auxiliar durante as práticas de reprodução. Apesar disso, a maior parte do estresse causado pelo manejo de grandes reprodutores utilizados na piscicultura ocorre durante a fase de captura (HARVEY & CAROLSFELD, 1993), no momento anterior àquele em que se pode administrar anestésico. Adicionalmente, há a necessidade de manejos repetidos dos peixes em curto espaço de tempo (1-3 dias), para a seleção, pesagem, aplicação do hormônio e a posterior extrusão dos gametas, condição que exigiria a repetição do uso de anestésicos em cada manejo. Considerando essas limitações, quando são utilizadas espécies dóceis ou linhagens domesticadas, e o manejo reprodutivo não impõe um estresse acentuado, a simples utilização de boas práticas de manejo pode eliminar a necessidade do uso de anestésicos. Porém, caso necessário, pode ser feita a utilização de anestésicos para reduzir a atividade e o metabolismo dos peixes durante a seleção, transporte, pesagem e biopsia dos reprodutores. Uma lista de produtos químicos que podem ser utilizados para sedar peixes é apresentada por Kubitzka (1999). Em alguns casos, o uso de anestésicos pode interferir na qualidade dos gametas. Por exemplo, o contato do anestésico MS-222 não diminui a qualidade dos ovos, porém reduz a motilidade do esperma em reprodutores de truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (WAGNER *et al.*, 2002). Assim, é recomendado o banho dos peixes em água isenta de anestésico anteriormente à extrusão dos gametas (POPOVIC *et al.*, 2012). A situação ideal seria o uso da técnica de desova natural com indução ambiental, em que não há necessidade de manipulação dos peixes (HARVEY & CAROLSFELD, 1993), já que o aumento excessivo dos níveis de estresse dos peixes submetidos ao manejo causa efeito negativo na reprodução (SOSO *et al.*, 2008; SCHRECK, 2010). Apesar disso, nem todas as espécies respondem a essa técnica, sendo, em alguns casos, necessário o manejo para a aplicação de hormônios e induzir artificialmente a desova (REYNALTE-TATAJE *et al.*, 2013).

2.2.4. Obtenção dos ovos: as fêmeas de várias espécies de peixes submetidas ao tratamento de indução hormonal iniciam a liberação dos óvulos na presença de machos, após a ovulação (WOYNAROVICH & HORVÁTH, 1983). Nesse caso, os óvulos são fertilizados pelos machos dentro do tanque sem a interferência do produtor e é denominada “reprodução induzida com desova natural” ou “desova semi-natural”. Apesar da redução do manejo dos peixes para a extrusão dos gametas, que em espécies mais sensíveis resulta no aumento da taxa de sobrevivência dos reprodutores após a desova (REYNALTE-TATAJE *et al.*, 2002), a desvantagem da desova semi-natural está relacionada com a necessidade de remoção dos ovos do tanque e transferência para as incubadoras. Esse manejo prejudica a evolução dos embriões e aumenta a possibilidade de infecção dos ovos por fungos, reduzindo assim a taxa de sobrevivência dos ovos e a qualidade das larvas (BERMUDEZ *et al.*, 1979).

Considerando que algumas espécies de peixes, quando em condições de cativeiro, não liberam os óvulos espontaneamente após a ovulação, é necessária a retirada dos gametas por extrusão (WOYNAROVICH & HORVÁTH, 1983). Essa é a técnica mais utilizada no Brasil e apresenta bons resultados para diferentes espécies de peixes (ZANIBONI-FILHO E BARBOSA, 1996; SATO, 1999), além da vantagem de reduzir a mão-de-obra operacional e permitir um maior controle da produção. Outras vantagens da desova por extrusão são destacadas por Harvey e Carolsfeld (1993).

A técnica de desova por extrusão consiste na retirada das fêmeas imediatamente após a ovulação, quando os óvulos estão soltos na luz do ovário, e através de pressão abdominal induzir a saída dos óvulos pela papila genital (ZANIBONI-FILHO & NUÑER, 2004). O mesmo procedimento é utilizado para a retirada do sêmen, sendo ambos os gametas recolhidos em recipientes secos para posterior mistura. Os reprodutores devem ser secos antes do início da extrusão, garantindo que os gametas não entrem em contato com nenhuma quantidade de água, condição que reduz a duração da viabilidade dos gametas. É necessário ainda determinar o momento exato da ovulação das fêmeas para garantir a obtenção de gametas de boa qualidade (BROMAGE *et al.*, 1994). A retirada dos óvulos antes ou depois de determinado tempo da ovulação pode comprometer a qualidade das larvas e proporcionar baixas taxas de fertilização (SPRINGATE *et al.*, 1984).

A fertilização a seco tem a vantagem de ampliar o tempo para o manejo dos gametas, permitindo a separação e a quantificação da desova nas porções a serem estocadas nas distintas incubadoras, além de aumentar a taxa de fertilização (ZANIBONI-FILHO & NUÑER, 2004). Após a mistura dos óvulos com o sêmen é adicionada água para ativação dos gametas. A quantidade a ser adicionada, porém, precisa ser bem dimensionada: a inclusão de água em excesso causa a diluição do sêmen e a diminuição das chances de encontro dos gametas para a fertilização, da mesma forma que uma quantidade insuficiente pode causar a obstrução da micrópila pelo muco do ovário ou mesmo pelo contato de outro óvulo (WOYNAROVICH & HORVÁTH, 1983).

A quantidade de óvulos liberado pela fêmea em cada desova, conhecido como fecundidade, é dependente do volume da cavidade celomática disponível para alojar ovários maduros e do volume desses ovócitos (VAZZOLER, 1996). O tamanho dos ovócitos maduros é bastante variável entre as espécies de peixes. Porém, avaliando mais de uma centena de espécies, Wootton (1990) verificou que variam entre 250 e 7000µm. A fecundidade dos peixes tende a aumentar com o crescimento do peixe, sendo mais relacionada ao comprimento do que com a idade do peixe (VAZZOLER, 1996). Esse

aumento na fecundidade dos peixes com o crescimento é atribuída à existência de uma fonte renovável e contínua de novos ovócitos a partir das células do epitélio folicular (CHAVES, 1991). Dessa forma, a fecundidade de peixes pode ultrapassar facilmente um milhão de óvulos produzidos em uma única desova. Considerando a fecundidade do dourado (*Salminus brasiliensis*), segundo Morais-Filho e Schubart (1955), cada quilo de fêmea produz em média 141.000 óvulos. Assim, um dourado fêmea de 20kg produzirá aproximadamente 3.000.000 de óvulos em uma única desova.

2.2.5. Incubação dos ovos: a espessura e dureza da membrana do ovo podem variar conforme a espécie (WOYNAROVICH & HORVATH, 1983), além do diâmetro que esse ovo atinge após a completa hidratação, condição que influi diretamente sobre a densidade dele. Essas variações exigem condições distintas de incubação dos ovos para garantir a eficiência de funcionamento das incubadoras para cada espécie (WOYNAROVICH, 1986). Apesar disso, o autor descreve algumas exigências que são comuns aos ovos de peixes, devendo ser garantidos elevados teores de oxigênio dissolvido, temperaturas adequadas, um mecanismo eficiente para remoção dos metabólitos, bactérias e outros organismos nocivos que se desenvolvem na matéria orgânica, evitando sempre romper ou danificar mecanicamente os ovos. Vários autores têm relacionado os diferentes métodos de incubação, descrevendo o mecanismo de funcionamento, as vantagens e desvantagens de cada um deles (HUET, 1978; WOYNAROVICH & HORVATH, 1983; WOYNAROVICH, 1986; KAFUKU, 1989; ZANIBONI-FILHO, 2000).

A determinação do fluxo de água, ideal para cada tipo de incubadora e de ovo, é extremamente importante para o sucesso da incubação. A forte correnteza provoca o desnudamento dos ovos, sendo facilmente observada à presença de células soltas no espaço perivitelínico (WOYNAROVICH, 1986). A respiração dos ovos e larvas de peixes é feita por difusão direta, de modo que exige a presença de elevados teores de oxigênio dissolvido na água para garantir a sobrevivência dos embriões. Adicionalmente, há um aumento da demanda de oxigênio pelo embrião com o seu desenvolvimento. Por exemplo, considerando o consumo de oxigênio pelos ovos de tainha *Mugil cephalus* na fase de fechamento do blastóporo, esse valor é aumentado em sete vezes quando os ovos estão embrionados e passa a ser dez vezes maior no momento da eclosão (WALSH *et al.*, 1989).

2.2.6. Larvicultura: a larvicultura pode ser realizada de modo extensivo, quando a criação é feita em tanques ou viveiros externos, expostos à condição ambiental natural e explorando alimentação natural produzida para nutrir os peixes, podendo ou não fazer a complementação do alimento com rações artificiais com pequena granulometria. Outra possibilidade é a larvicultura intensiva, normalmente realizada em ambientes fechados e com maior controle das condições ambientais. Neste caso, os peixes dependem da alimentação fornecida através de dietas artificiais e possibilita um aumento da densidade de criação, conforme explicitado a seguir:

a) Larvicultura extensiva: a dependência da produção do alimento natural, para suprir as necessidades nutricionais dos peixes, exige que o produtor mantenha níveis adequados de nutrientes para sustentar a cadeia trófica. O abastecimento de água dos viveiros está normalmente restrito à reposição de perdas por evaporação e infiltração, sendo evitadas as trocas de água. Essa condição de criação faz com que os tanques e viveiros de piscicultura sejam caracterizados pelas grandes variações nos parâmetros abióticos, principalmente na camada superficial, causada pela atividade fotossintética

(HINO, 1985). Apesar disso, essa grande amplitude de variação das condições ambientais parece ser tolerada pelas larvas de peixes, sem causar redução na taxa de sobrevivência (ZAIOS & BALDISSEROTTO, 2000; ZANIBONI-FILHO *et al.*, 2002). Nesses viveiros de piscicultura, existe uma cadeia alimentar baseada nas algas e outra baseada nas bactérias e detritos (PORTER, 1977), sendo que as bactérias são mais bem adaptadas, energeticamente, aos ambientes eutróficos (HINO, 1985), como são os viveiros onde se desenvolve a larvicultura extensiva. Dessa forma, o aumento da produtividade final de alevinos depende do acréscimo da quantidade de adubo utilizado na preparação dos tanques, devendo crescer proporcionalmente até a adição de uma determinada quantidade de adubo, quando a deterioração da qualidade de água passa a reduzir a produtividade (ZANIBONI-FILHO, 1992). Nesse sistema de larvicultura, os melhores resultados de produtividade final de juvenis têm sido obtidos com a estocagem mínima de 200 larvas/m² de viveiro (FONTES *et al.*, 1990; ZANIBONI-FILHO, 1992).

b) Larvicultura intensiva: nesse sistema de criação, a produção do alimento natural é desconsiderada e o fluxo de água é mantido elevado, mantendo um pequeno tempo de residência da água no ambiente de criação. Há possibilidade de maior controle das condições ambientais, apesar da completa dependência qualitativa e quantitativa do alimento artificial. Esse sistema de larvicultura é mais caro, necessita de maior qualificação e demanda da mão-de-obra envolvida. Apesar disso, tem uma produção final mais garantida do que aquela feita no sistema extensivo, onde há uma enorme dependência das condições ambientais e menor controle da condição de criação. A produtividade esperada, considerando o exemplo obtido com o tambaqui (*Colossoma macropomum*), pode ultrapassar a 2000 juvenis/m² (PÉREZ *et al.*, 1986).

2.3. Transporte de Peixes

O transporte de peixes muitas vezes é necessário, tanto para obtenção dos animais quanto no traslado entre diferentes laboratórios. Este processo pode ser estressante para os peixes, especialmente se não for feito adequadamente. O transporte em si já pode ser estressante, como veremos a seguir, mas a preparação para o mesmo, por si só, pode configurar estresse para os peixes, uma vez que é necessária a captura dos mesmos e sua transferência para o meio de transporte. É necessário muito cuidado durante a captura e acondicionamento pré-transporte para evitar perda de muco e escamas e a ocorrência de injúrias, que resultam em uma janela para troca osmótica e para ação de patógenos, bem como reduzir ao mínimo necessário o tempo de exposição aérea dos peixes.

O transporte pode ser feito em sistema fechado ou aberto (BERKA, 1986). O sistema fechado mais amplamente utilizado consiste no transporte em sacos plásticos selados, contendo uma parte de água, onde são acondicionados os peixes, e a injeção de duas ou mais partes de oxigênio puro antes de selar o saco plástico. A proporção de oxigênio/água depende da duração do transporte, sendo necessária maior quantidade do gás em transportes mais longos. Pode-se utilizar ensacamento duplo, ou seja, com um saco dentro do outro, para reduzir o risco de vazamentos e perda de oxigênio e água, ocorrência esta que pode levar os peixes à morte. Esse tipo de sistema é mais indicado para peixes menores (larvas e juvenis) e espécies que não possuem acúleos (também chamados de “espinhos”). Acúleos são raios enrijecidos presentes nas nadadeiras de algumas espécies de peixe e podem perfurar o saco de transporte resultando em vazamentos. Já o sistema aberto consiste em caixas de transporte, variáveis em formato e tamanho. As caixas são cheias de água e devem ser dotadas de bombas portáteis para aeração constante durante o transporte (BERKA, 1986). É a forma de transporte

mais indicada para espécimes de maior tamanho e para espécies que possuem acúleos perfurantes.

O tempo de transporte também é um fator determinante para o método utilizado. Períodos mais longos podem exigir que o transporte seja feito em sistema aberto, que possui aeração constante, uma vez que há limitações na quantidade de oxigênio que pode ser contido no sistema fechado. A densidade também é um fator importante. Altas densidades podem resultar em injúrias na pele, devido ao contato físico entre os peixes. Assim, recomenda-se que a proporção mínima entre o volume de peixes e o volume de água durante o transporte seja de 1:3 para indivíduos maiores e até 1:100 a 1:200 para indivíduos menores, sendo que a recomendação pode variar de espécie para espécie (BERKA, 1986).

A densidade também pode afetar outro fator muito importante durante o transporte: a qualidade da água. Quanto maior a densidade ou mais prolongado o transporte, maior o acúmulo de excretas na água e também maior a alteração dos parâmetros físico-químicos desse meio. A manutenção da temperatura adequada da água é muito importante, não apenas porque os peixes são ectotérmicos e, portanto, sua temperatura corpórea e metabolismo dependem da temperatura do meio, como também a temperatura influencia o pH, a fração não ionizada de amônia e a solubilidade de gases na água. Se a temperatura da água cair durante o transporte, o metabolismo dos peixes é reduzido, e se a temperatura subir durante o transporte, a solubilidade do oxigênio diminui, por isso deve-se tomar muito cuidado em transportes prolongados para que a temperatura da água não se altere em demasia.

A respiração dos peixes resulta na excreção de CO_2 , e o aumento da concentração desse gás na água circundante reduz a capacidade dos peixes de excretá-lo. Se o CO_2 se acumula no sangue dos peixes ocorre acidificação sanguínea, o que resulta em redução do transporte de oxigênio pelo efeito Root (a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio é menor em meios de pH mais baixos) (RANDALL & LIN, 1993). Ainda, a concentração elevada de CO_2 na água de transporte pode levar à acidificação da água (MACINTYRE *et al.*, 2008). Um indicativo de que os níveis de CO_2 na água de transporte estão elevados é a redução de atividade e até perda de equilíbrio dos peixes, uma vez que esse gás possui um efeito anestésico (MORAN *et al.*, 2008). O principal composto nitrogenado liberado pelos peixes é a amônia, que é excretada através das brânquias. A amônia em altas concentrações é tóxica. O aumento da temperatura e do pH aumentam a concentração de NH_3 na fração de amônia total, dificultando a excreção de amônia pelo peixe. Portanto, o cuidado para que a temperatura da água não aumente durante o transporte também ajuda a evitar o aumento da toxicidade da amônia. Uma boa estratégia para a redução da liberação de excretas, especialmente fezes e amônia, durante o transporte, é o jejum de ao menos 24 horas antes desse procedimento, o que pode ajudar a garantir a qualidade da água.

Durante o transporte, os peixes de água doce tendem a perder íons para o meio hiposmótico circundante e podem apresentar hemodiluição, tanto pelo aumento da permeabilidade branquial durante a resposta de estresse como também através da perda da impermeabilidade da pele em pontos onde houve perda de escamas e injúrias. A adição de sais, como cloreto de sódio na água, em baixas concentrações, nunca excedendo 0,6% de salinidade (6 g/L), podem reduzir a perda de íons e minimizar a resposta de estresse nos peixes transportados (para metodologia ver CARNEIRO & URBINATI, 2001; BENDHACK & URBINATI, 2009). Contudo, esse procedimento não funciona bem em algumas espécies (SALBEGO *et al.*, 2017), de modo que se deve verificar caso a caso a utilização do sal.

Por fim, ao término do transporte, a soltura deve ser feita com cuidado. À água do transporte deve ser adicionada, lentamente, água dos tanques de destino, para aclimatar os peixes a parâmetros como temperatura e dureza da água antes da transferência.

III - INSTALAÇÕES ANIMAIS

3.1. Tanques de manutenção

A manutenção de peixes para experimentação pode ser feita de diferentes formas e irá depender da capacidade instalada, da unidade de pesquisa e dos objetivos da pesquisa. Abaixo, são listados os principais tanques que podem ser utilizados para manutenção e experimentação dos peixes. A escolha da modalidade depende diretamente do nível de controle de variáveis limnológicas e de acesso ao alimento natural, assim como do delineamento experimental e da forma e frequência de manipulação dos indivíduos ao longo do período experimental.

3.1.1. Tanques escavados ou viveiros: Tanques escavados ou viveiros são estruturas escavadas no solo e podem ser de médias a grandes dimensões. Para que tenham assegurada sua estrutura física, devem ser construídos por profissionais capacitados, pois necessitam de dimensões e inclinações de taludes que se adequem às características na área onde serão construídos. Sua estrutura necessita de manutenção frequentemente (PEREIRA, 2006) e, muitas vezes, de intensa adequação do espaço físico para sua instalação. Por manterem os animais em contato direto com o sedimento, são os que melhor simulam o habitat natural e permite ainda a manutenção da alimentação natural dos peixes (ZIMMERMANN & FITZSIMMONS, 2004), o que deve ser considerado na condução dos experimentos. Há ainda a variação dos tanques escavados que podem ter suas paredes revestidas por cimento ou lonas, o que pode aumentar a vida útil do sistema com menor manutenção, mas exigindo maior investimento.

Em sua maioria, os tanques escavados dependem de sistema natural para o enchimento e reabastecimento da água, o que permite o controle do volume de entrada e da qualidade da água. A vazão da água é normalmente regulada por um monge de alvenaria ou um cotovelo articulado, por meio do qual ocorre também o escoamento da sujeira acumulada no fundo. Os sistemas de entrada e saída permitem então a simulação de circulação de água nos tanques escavados aumento ou diminuindo o tempo de residência nestes sistemas e permitindo controle de qualidade de água de entrada e saída durante a condução de experimentos. Por possuir entrada e saída de água, e por permitir o escoamento do fundo, o controle das variáveis limnológicas dos tanques escavados é maior, permitindo um maior controle das condições experimentais.

Segundo Queiroz (2012), a manutenção dos viveiros deve ser feita adequadamente adotando-se boas práticas aquícolas (BPA). As BPA, como calagem, secagem, aração, fertilização, revolvimento de fundo e fertilização, devem ser adotadas para que a boa qualidade do solo seja mantida e minimize fatores que ocasionam o estresse nos peixes e o surgimento de doenças. A periodicidade de adoção destes procedimentos irá depender diretamente do estudo das condições dos viveiros.

Para uso de tanques escavados em experimentos os peixes podem ser distribuídos livremente nos tanques e cada tanque ser considerado uma unidade experimental. Pode ainda

ser instalado nos tanques escavados gaiolas, ou tanques rede (MAINARDES-PINTO *et al.*, 2003), que permitiram o uso de um viveiro com mais de uma unidade experimental.

Em tanques escavados, manejo dos animais em experimentação é mais difícil, pois, para retirar os indivíduos, há que se promover a despesca com passagem de redes, o que pode estressar os animais e alterar suas respostas fisiológicas. Também há maior competição por alimento, se o processo de arraçoamento não for feito de forma adequada, o que pode desuniformizar os lotes experimentais. Em unidades de ensino e pesquisa são mais comumente usados para manutenção de animais ou para experimentos de desempenho e reprodução.

3.1.2. Tanques de lona: São estruturas modulares, normalmente menores que as dimensões dos tanques escavados. Sua mobilidade permite o deslocamento da estrutura e manuseio. Também requer manutenção. Porém, a adequação da área para instalação pode ser menor do que a dos tanques escavados. Podem ser utilizados para produção, manejo, quarentena, manutenção, depuração e pesquisas de várias naturezas, além de serem os mais recomendados para criação/manejo de larvas de peixes ou alevinos. Os tamanhos dos tanques de lona irão variar de acordo com a capacidade instalada do laboratório e o objetivo das pesquisas a serem realizadas. Assim como as demais estruturas descritas, os peixes podem ser distribuídos livremente nos tanques ou serem separados em gaiolas para maior controle. Por não ter contato com o ambiente natural, nestes sistemas os peixes dependem diretamente da alimentação externa.

Por serem sistemas mais controlados, devem ter maior atenção no processo de renovação e manutenção da qualidade da água. Desta forma, normalmente devem ser instalados filtros para remoção dos resíduos físicos e biológicos. Por esta característica, estes sistemas são relativamente mais caros que os anteriores. Porém, suportam maior capacidade animal.

Estes sistemas dependem totalmente dos filtros para que suas condições ideais de manutenção dos peixes sejam mantidas. Os filtros devem ter funcionalidade biológica (permite o crescimento de microorganismos favoráveis ao ambiente); química (carvão ativado, que elimina impurezas tóxicas) e mecânica (remove fezes e ração não consumida). Os filtros devem ser periodicamente verificados, de modo a não comprometer a qualidade da água e garantir o bem-estar dos animais (SCHNEIDER *et al.*, 2009).

Os tanques de lona, quando de maior dimensão, também permitem o uso de gaiolas para dividir os grupos experimentais e facilitar o manejo dos animais.

3.1.3. Aquários ou caixas: Sistemas experimentais que utilizem caixas plásticas ou aquários de vidro são uma opção prática e de menor custo, além de permitirem deslocamento das estruturas e alterações nas configurações. Podem ser utilizadas caixas ou aquários individualizados, sendo cada um uma unidade experimental fechada ou em unidades interligadas entre si, formando sistemas fechado de recirculação de água. Ambos devem ser dotados de sistemas de filtro físico e biológico, caso o experimento seja conduzido por um período maior. Caso não haja sistema de filtro, é necessário fazer renovação de água e dos resíduos. O sistema de filtros é necessário para limpeza e depuração de resíduos e demais impurezas presentes no ambiente. A filtração biológica permite reduzir compostos orgânicos nitrogenados pela ação de bactérias aeróbias; a filtração química elimina as pequenas partículas e odores; a filtração mecânica retira partículas maiores, que geralmente se

depositam no fundo dos aquários. Os filtros podem ser externos ou internos. A vantagem deste tipo de sistema é a reutilização da água, passando por etapas de filtragem até ficarem adequadas novamente a todas as condições de qualidade de água exigidas. Recomenda-se fazer a troca parcial da água e limpeza dos filtros frequentemente, desde que essa prática não comprometa as pesquisas em andamento.

Assim como nos tanques de lona, o controle das condições ambientais nos aquários e caixas é maior. Além das questões já descritas sobre o uso de filtros e remoção de resíduos nos aquários, o controle de variáveis como temperatura da água, pH, oxigênio dissolvido também é possível. Estes sistemas também permitem a instalação de controle de temperatura, utilizando resistências ou termostatos, o que permite o ajuste preciso da temperatura adequada à espécie utilizada.

A limpeza do aquário ou caixas deve ser realizada com água limpa e uma esponja ou pano limpo. Para desinfecção, é permitido somente o uso de sal, que deve ser aplicado nas paredes do aquário com o auxílio da esponja. Caso seja utilizado cascalho, canos de policloreto de vinila (PVC) para abrigos, ou qualquer objeto de enriquecimento ambiental, estes deverão ser bem lavados com água corrente previamente, nunca utilizando produtos de limpeza. Peixes mantidos em aquários nos laboratórios de pesquisa geralmente são colocados em locais que comprometem seu bem-estar. Contudo, o enriquecimento ambiental pode tornar a manutenção destes animais mais confortável, sendo o ambiente modificado em prol do bem-estar, incluindo aspectos comportamentais, reprodutivos etc (DELICIO *et al.*, 2006; BRYDGES E BRAITHWAITE, 2009).

Os aquários geralmente são de vidro, mas podem ser de polietileno ou acrílico, opacos ou transparentes, formas diferenciadas e tamanhos variados, obedecendo as propostas do estudo em questão. São indicados para experimentos de toxicidade de compostos, comportamento animal, reprodução, criação, entre outros objetivos.

O local de instalação do aquário deve ser escolhido cuidadosamente, devendo ser uma base plana e bem nivelada, evitando locais com excesso de iluminação natural, barulhos e ruídos, trânsito de pessoas ou veículos e demais agentes estressores para os peixes. Deve se atentar ainda para que o local possibilite fácil acesso ao aquário e segurança para o condutor do experimento, facilitando o processo de coleta dos animais para manuseio ao longo do período experimental.

Nos sistemas de aquário ou caixas é mais comum o uso de aeração para manter os níveis adequados de oxigênio dissolvido na água, elemento indispensável para a manutenção da vida dos peixes. Porém, os sistemas de tanques escavados de lona e tanques rede também podem utilizar a oxigenação para simulações experimentais. Sugere-se utilizar compressores de ar ligados a tubos ou mangueiras, em substituição a equipamentos de pequeno porte, quando o estudo for de longa duração ou a estrutura for de grande porte (GOUVEIA *et al.*, 2006).

A iluminação dos ambientes de experimentação, quando realizado em ambientes controlados, deverá ser adequada às espécie e ao experimento em questão, considerando que ambientes demasiadamente iluminados podem contribuir para o desenvolvimento de algas verdes e ambientes com pouca iluminação favorecem a formação de algas marrons.

Diariamente, deve-se verificar o funcionamento dos equipamentos, visando não comprometer o bem-estar dos peixes.

Antes de receber os animais, recomenda-se que o ambiente passe por um período mínimo de maturação superior a três dias.

3.1.4. Tanques-Rede: Tanques-rede são gaiolas, quadradas ou cilíndricas, constituídas de material resistente e seguro, para resistir ao manuseio (geralmente metal). Devem ser completamente fechadas por tela, inclusive a parte superior, para prevenir o ataque de predadores e fornecer sombreamento. As telas variam o tamanho de sua malha em função da fase de desenvolvimento e tamanho dos peixes. Os tanques-rede podem variar de tamanho, dependendo do número e do tamanho dos animais confinados e são medidos em m³. Deve ter acoplado à gaiola um sistema que permita sua flutuação na água. Nas gaiolas, geralmente existe um comedouro ou pode-se adaptar a forma de alimentação de acordo com os objetivos dos experimentos em questão (PEREIRA, 2006).

Os tanques-rede não obstruem a passagem de água, promovendo fácil circulação, sendo possível utilizar recursos hídricos já existentes como rios e reservatórios. Esta característica é contrária aos demais sistemas, pois dificulta a manutenção de condições controladas do ambiente. Por isso, muitas vezes este sistema experimental é escolhido para experimentos de desempenho animal e simulação de condições reais de produção. A escolha deste sistema deve ter em mente a dificuldade de controle de vazão e de variáveis físico química na área interna dos tanques rede. Como dito anteriormente, podem ser instalados em tanques escavados ou de lona, pois permitem melhorar o manejo dos animais em experimento.

3.2. Qualidade da água

3.2.1. Parâmetros de qualidade da água: No âmbito da piscicultura, o micro-habitat consiste do espaço onde os peixes serão acondicionados e todos os acessórios que compõe o ambiente onde os peixes são mantidos.

A qualidade da água é o principal fator entre os que compõem o micro-habitat. Cada espécie de peixe mantida em cativeiro pode ter diferentes condições ótimas de manutenção, bem como apresentar diferentes faixas de tolerância para as alterações nas condições físico-químicas da água. Embora as faixas de tolerância a determinados parâmetros possam ser amplas, alguns processos, como a postura de ovos, fertilização externa, crescimento e sistema imune, podem sofrer impactos consideráveis com pequenas variações nos espectros de tolerância. Cabe aos pesquisadores investigar quais são as melhores condições de manejo da espécie escolhida, antes de iniciar sua criação.

Nesse contexto, a qualidade da água é o principal fator a ser monitorado com regularidade quanto às suas propriedades físico-químicas, uma vez que alterações nos padrões preestabelecidos podem causar impactos consideráveis ao criadouro.

A frequência da checagem da qualidade da água deve obedecer a um sistema de periodicidade, levando em consideração a velocidade em que cada fator sofre alterações significativas. Para determinação dessa periodicidade, às primeiras checagens devem ser diárias e calculadas, levando em consideração a densidade populacional do tanque. Ainda há a possibilidade de observação de alguns indicativos visuais que podem servir de alerta para checagem de qualidade da água, tais como: atividade locomotora, agressividade, lesões ou manchas cutâneas, mortalidade, turbidez da água, quantidade de matéria orgânica na água, entre outros fatores que serão citados a seguir.

3.2.2. Origem da água: conforme o tipo de cativeiro, a água que irá abastecer os tanques pode ser proveniente preferencialmente de um corpo d'água natural (nascente, lago, córrego) ou, alternativamente, fornecida diretamente do sistema municipal de abastecimento. De qualquer forma é de extrema importância que, entre o tanque de criação e a fonte de água, haja um ponto de checagem da qualidade da água que irá entrar em contato com os animais, a chamada água de uso. Através do ponto de checagem, pode-se verificar possíveis alterações causadas por poluição, em caso de fonte natural, bem como um aumento nas concentrações de químicos como cloro, usado pelo fornecedor municipal, podendo assim condicionar a qualidade da água previamente, como uma medida profilática.

3.2.3. Filtragem de água: a água ainda pode sofrer filtragem por sistemas diversos, a fim de garantir melhor controle de seus parâmetros. Um sistema de osmose reversa pode ser usado para garantir controle, mas é importante garantir o reequilíbrio das condições iônicas adequadas para a espécie em questão, uma vez que este tipo de filtração diminui drasticamente os íons na água (BU-ALI *et al.*, 2007).

Existem diversos tipos de filtros e a escolha depende do tipo de tanque, preferência dos experimentadores, potencial sensibilidade dos animais à presença dos mesmos, entre outros fatores. A escolha dos filtros também impacta a rotina dos biotérios e criadouros uma vez que requerem manutenção para a garantia da qualidade de água. Os filtros comumente incluem elementos de filtragem mecânica para remoção de partículas (peneiras, fibras ou polímeros com diferentes porosidades), filtragem química ou de absorção de partículas (comumente carvão ativado). Além disso, comumente os elementos filtrantes de aquários com baixa taxa de renovação de água incluem peças de cerâmica ou polímeros sintéticos que abrigam bactérias nitrificantes que fazem a conversão de amônia, nitrato e nitritos, a fim de reduzir sua concentração, ou, no caso de tanques escavados e viveiros, pode-se utilizar ainda plantas aquáticas do gênero *Eichhornia*, mais conhecida como aguapé, reconhecidamente agente filtrante natural (JAFARI *et al.*, 2006; TODD & JOSEPHSON, 1996).

Aquários de vidro geralmente possuem filtros individuais em formato de torre mantidos em seu interior, ou em cascata em suas paredes laterais. Sistemas semi-fechados recirculantes muitas vezes usam filtros coletivos para a água de diversos aquários e incluem os elementos de filtragem supramencionados e a possibilidade de inclusão de fontes de radiação UV para esterilização da água antes do retorno aos aquários. No caso de aquários, os sistemas de filtração comumente são também os responsáveis pelo aporte de oxigênio na água. Por isso, deve-se levar em consideração a capacidade de vazão dos filtros em relação ao volume do aquário.

3.2.4. Temperatura: por serem animais ectotérmicos, os peixes são dependentes da temperatura do ambiente para manutenção da sua temperatura corporal, ficando assim suas atividades fisiológicas intimamente relacionadas à temperatura da água. Embora possam suportar uma grande variação na temperatura, cada espécie possui uma faixa considerada ideal em que melhor está adaptada e se desenvolve de forma eficiente (BOLTAÑA *et al.*, 2017; O'GORMAN *et al.*, 2016). Lembrando que mesmo suportando grandes variações de temperatura, uma mudança abrupta de temperatura na faixa de $\pm 5^{\circ}\text{C}$, pode caracterizar um choque térmico, tanto em casos de hipertermia quanto de hipotermia, podem ter como consequência aumento da taxa de mortalidade (DONALDSON *et al.*, 2008; SHENG & XU, 2008). Para peixes endêmicos de regiões tropicais a temperatura ideal fica em torno de 24-

28°C, embora na natureza estejam sujeitos a maiores variações de temperatura, o reflexo dessas variações está na menor taxa de reprodução e desenvolvimento (GARCIA *et al.*, 2008).

3.2.5. Termorreguladores: os aquecedores podem ser simples, necessitando de regulação manual e monitoramento frequente da temperatura ou ligados a um termostato que irá regular a temperatura da água, conforme o pré-estabelecido em seu controle, independentemente da temperatura externa. Já, um aquecedor simples não manterá a temperatura da água do aquário estável se houver variações na temperatura externa.

A aferição da temperatura da água deve ser realizada diretamente no tanque onde os animais são mantidos, lembrando que, em casos de tanques com profundidade maior que 1m, deve-se mensurar a temperatura na superfície e na parte mais profunda do tanque, uma vez que podem apresentar diferentes temperaturas. Para mensurar a temperatura, pode-se usar termômetro de mercúrio, termômetros digitais com sonda permanentemente mergulhada no tanque ou ainda termômetros digitais de bolso.

3.2.6. pH: Um dos parâmetros que podem sofrer variação com maior frequência em um sistema de criação de peixes é o pH, isso devido a uma série de fatores inerentes ao micro ecossistema, onde a interação entre os fatores bióticos e abióticos é intenso. Entre os fatores que podem contribuir para variação no pH da água no sistema de criação estão: Carbonatos provenientes de pedras, corais, fotossíntese realizada por algas ou outras plantas liberando CO₂, nitrificação por bactérias, decomposição de alimentos, excretas, entre outros.

O balanço (ou equilíbrio) ácido-básico é crítico para a fisiologia da maioria dos organismos vivos, principalmente para os vertebrados, entre eles, os peixes. A principal estrutura responsável pela troca de compostos ácido-básicos em peixes é o epitélio branquial, que pode sofrer alterações histológicas, conforme o estado físico-químico da água, assim prejudicando o equilíbrio osmótico e a respiração (CLAIBORNE *et al.*, 2002; GOSS *et al.*, 1998; REIS *et al.*, 2009). Em casos de pH muito baixo (≈ 3), essas modificações acabam causando aumento de muco no epitélio branquial, podendo levar o peixe à morte por anoxia, além de prejudicar o equilíbrio iônico, inibindo a captação de Na⁺ (EVANS, 2005; PACKER & DUNSON, 1972).

Variações no pH ainda podem prejudicar a viabilidade dos ovos bem como o desenvolvimento de larvas e alevinos. Foi observado que pH abaixo de 6,0 diminui a taxa de sobrevivência e a qualidade de embriões. Embora a tolerância possa variar de acordo com a espécie, o pH ideal para o melhor desenvolvimento e viabilidade de embriões da maioria das espécies é o neutro (NASCIMENTO *et al.*, 2007; REYNALTE-TATAJE *et al.*, 2015).

A maneira mais eficaz de controle dos níveis de pH é através da verificação periódica, que deve ser determinada de acordo com as características de cada tanque, uma vez que o tempo para variação do pH depende de fatores como a densidade no tanque, renovação da água, regime de alimentação, sistema de filtragem, composição do micro-habitat, entre outros. A verificação pode ser realizada a partir de uma amostra coletada da parte mais centralizada do tanque. O pH pode ser mensurado, utilizando indicadores de pH em forma de fitas ou reagentes líquidos halocrômicos, ou ainda utilizar medidores digitais, que conferem maior precisão à medida.

Mudanças comportamentais como atividade locomotora e agressividade podem ser um indicativo de alteração no pH (WOLFF & DONATTI, 2016). Peixes, quando expostos a

baixos valores de Ph, apresentam comportamento letárgico e um posicionamento corporal angular em relação a superfície da água.

3.2.7. Oxigênio dissolvido: Oxigênio dissolvido refere-se ao nível de oxigênio livre, que não está ligado a outro elemento presente na água ou em outro solvente. É um parâmetro importante na avaliação da qualidade da água, devido à sua influência nos organismos que vivem dentro de um corpo de água. O oxigênio livre na água, de forma geral, é proveniente de duas fontes;

a) difusão direta: absorvendo, na superfície, o oxigênio diretamente da atmosfera, nesse caso, de forma lenta, ou ser misturado, de forma mais rápida, através de processos que causem algum tipo de turbilhonamento, como quedas d'água ou correntezas, ou ainda, de forma artificial, através de aeradores mecânicos (bombas de ar); e

b) processos de fotossíntese: em caso de viveiros, a disponibilidade de oxigênio na água é preponderantemente oriunda da fotossíntese realizada por plantas aquáticas e fitoplânctons. No entanto, o aporte de oxigênio dissolvido na água proveniente de fotossíntese sofre variações durante o período de 24hs, apresentando maiores concentrações nos períodos de luz e sofrendo uma queda drástica durante a noite, podendo gerar hipóxia ambiental.

Alguns fatores, como turbidez, temperatura, densidade e salinidade, têm influência direta na quantidade de oxigênio disponível na água. Em águas com temperatura elevada, a concentração de oxigênio dissolvido é menor. Primeiro, porque a solubilidade do oxigênio diminui à medida que a temperatura aumenta, diminuindo a quantidade de oxigênio que a água precisa para alcançar o equilíbrio de saturação com o oxigênio atmosférico. Segundo, porque em temperaturas mais elevadas, há um aumento no consumo de oxigênio, devido ao aumento da taxa metabólica dos organismos presentes na água (CLARKE & JOHNSTON, 1999; LEMBI, 2001).

As concentrações ideais de oxigênio dissolvido na água variam de acordo com a espécie. Entretanto, para grande maioria das espécies, os níveis ficam entre 5 e 9 mg/L (AVDESH *et al.*, 2012; KRAMER, 1987; MOREIRA *et al.*, 2001).

Alguns comportamentos podem servir de indicativo de baixos níveis de oxigênio dissolvido na água, tais como: a) mudanças na atividade, b) aumento do uso de respiração de superfície aquática e c) mudanças de habitat verticais ou horizontais (KRAMER, 1987). Entre as consequências dos baixos níveis de oxigênio dissolvido na água estão a alta mortalidade, baixa taxa reprodutiva e menor taxa de desenvolvimento.

O monitoramento dos níveis de oxigênio deve ser diário, através de medidores colorimétricos, ou oxímetros, medidores eletrônicos portáteis ou de sondas permanentes. Em caso de diminuição do aporte de oxigênio dissolvido, algumas medidas emergenciais devem ser tomadas, como utilização de aeradores adicionais e recirculação da água. Utilização de aeradores pode ser permanente, no caso de tanques de pouca ou nenhuma circulação de água ou emergencial, sendo ativados apenas quando os níveis do oxigênio na água estão baixos.

O tipo e a potência do aerador a ser utilizado dependem do volume do tanque e a quantidade de biomassa que se pretende manter nesse espaço. Diversos tipos de sistema de areação podem ser empregados na criação de peixes. Aeradores de pá (funcionam causando circulação da água, recomendado para viveiros de alta produção e grandes dimensões), ainda

podem ser utilizados propulsores de ar, bombas verticais, bombas espessoras e difusores de ar. Embora possa ser calculado o consumo de oxigênio por biomassa no tanque, a forma mais eficiente ainda é o monitoramento diário, sendo necessárias duas checagens diárias em casos de grandes proporções, uma vez que diversos fatores podem alterar as quantidades de oxigênio dissolvido na água.

3.2.8. Salinidade: a salinidade consiste basicamente da concentração total de todos os sais dissolvidos na água. Uma vez que essas partículas dissolvidas na água carregam cargas positivas ou negativas, contribuem diretamente na condutividade da água (ZINABU *et al.*, 2002).

A maioria dos peixes é da espécie estenoalino, ou seja, tolera apenas uma faixa específica de salinidade, é ou exclusivamente água doce ou exclusivamente água salgada (WURTS, 1998). No entanto, existem alguns organismos que podem se adaptar a uma série de salinidades, conhecidos como eurialinos. Estes organismos podem ser eurialinos anádromos, catádromos ou verdadeiros. Organismos anádromos vivem em água salgada, mas desovam em água doce. As espécies catádromas são o oposto. Vivem em água doce e migram para a água salgada para desovar. As espécies verdadeiras de eurialinos podem ser encontradas em água salgada ou doce em qualquer ponto de seu ciclo de vida.

A tolerância aos níveis de salinidade de cada espécie depende de sua capacidade fisiológica de adaptação às condições osmóticas, sendo que organismos de água doce são considerados hiperosmóticos, por suas células terem a capacidades de eliminar água e reter ions.

O aumento da salinidade diminui drasticamente os níveis de oxigênio dissolvido na água, sendo assim um importante fator na criação de peixes, além do fato de que um aumento ou diminuição da salinidade pode ter impacto direto na condutividade da água, afetando assim uma série de atividades metabólicas dependentes da concentração iônica.

As medidas de condutividade são mensuradas por unidades de Siemens, sendo que as concentrações em água doce podem apresentar uma variação de 100-2000 micro Siemens($\mu\text{S}/\text{cm}$), água potável 30-1500 $\mu\text{S}/\text{cm}$, água marinha 55000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ e água destilada 0,5-3 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (MCCLESKEY *et al.*, 2011). Os valores de salinidade são medidos por ppt (Parts Per Thousand) ou partes por mil. Águas de rios apresentam em média salinidade menor que 0,5 ppt, estuários apresentam salinidade na faixa de 0,5-17 ppt, enquanto água marinha tem salinidade média de 35 ppt (LIKENS & HARRIS, 2009).

3.2.9. Níveis de amônia, nitrito e nitrato: no ambiente aquático, a amônia pode estar presente na forma dissolvida não ionizada NH_3 , ou na forma ionizada NH_4^+ , ou pode ser medida como amônia total, que é a soma das duas formas $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ (EMERSON *et al.*, 1975). Além da amônia, o nitrogênio pode ser encontrado na água nas formas de nitrato, nitrito, óxido nitroso, amoníaco dentre outros. Em sistema de criação de peixes, a formação de resíduos nitrogenados pode ter origem em fontes diversas, tais como: a) excretas dos peixes, principalmente em casos de dietas ricas em proteínas, b) fertilizantes a base de amônia e nitratos, e c) decomposição aeróbia e anaeróbia de matéria orgânica (SIMON DA SILVEIRA *et al.*, 2009).

O pH exerce grande influência quanto à forma que a amônia está presente na água, sendo que em condições neutras ou ácidas inferiores a 8, a forma NH_4^+ predomina, isso

devido ao fato de que, em meio aquoso ácido, a amônia formada é menos estável, sofrendo processo de hidratação, enquanto que, em meio alcalino, esse processo ocorre em menor escala, predominando a forma não ionizada NH_3 (KÖRNER *et al.*, 2001; LI *et al.*, 2012). O cálculo dos níveis de NH_3 na água é importante, não porque NH_3 seja a forma mais tóxica, mas sim porque o aumento da proporção de NH_3 na água leva a uma redução da excreção de amônia pelo peixe, com consequente acúmulo desse metabólito nos tecidos (BALDISSEROTTO, 2013).

Níveis elevados de amônia, mesmo que levemente, podem afetar negativamente o ecossistema de um criadouro. Os peixes podem sofrer uma redução no sucesso da eclosão; redução na taxa de crescimento e desenvolvimento morfológico; apresentar lesão no tecido branquial (hiperplasia), danos no fígado e rins (BENLI *et al.*, 2008; EDDY, 2005; MEADE, 1985; RANDALL & TSUI, 2002).

O elevado nível de amônia nas células do organismo pode interferir em processos metabólicos dependentes de ATP, uma vez que o aumento de amônia diminui a disponibilidade de alfacetoglutarato, importante intermediário no ciclo de Krebs, maior fonte metabólica de ATP. Além disso, o aumento de amônia provoca um aumento significativo de glutamina, e decréscimo de glutamato, o principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso (BRAISSANT *et al.*, 2013; MONFORT *et al.*, 2002; SHAFFI, 1980; SUÁREZ *et al.*, 2002). Elevadas concentrações de amônia ainda podem causar distúrbios na regulação iônica devido à alteração histopatológica nas brânquias (BENLI *et al.*, 2008).

A tolerância dos peixes às diferentes concentrações de amônia na água varia conforme a espécie e o estágio de desenvolvimento, além do fato dos valores totais de amônia toleráveis sofrerem variação em função da temperatura, pH e salinidade. Valores médios seguem conforme tabelas 1, 2 e 3.

Tabela 1. Níveis máximo toleráveis de nitrito para peixes de água doce em mg/L

Cloreto (mg/L)	Nitrito médio (mg.L ⁻¹) (N)
<2	0.02
2 - 4	0.04
4 -6	0.06
6 -8	0.08
8 - 10	0.10
> 10	0.20

Tabela 2. Níveis toleráveis de amônia para ambientes de água doce em mg/L(N)

pH	15°C	16°C	17°C	18°C	19°C	20°C	30°C
6.5	1.77	1.64	1.52	1.41	1.31	1.22	1.1
6.6	1.77	1.64	1.52	1.41	1.31	1.22	1.1
6.7	1.77	1.64	1.52	1.41	1.31	1.22	1.1
6.8	1.77	1.64	1.52	1.42	1.32	1.22	1.1
6.9	1.77	1.64	1.53	1.42	1.32	1.22	1.0
7.0	1.77	1.64	1.53	1.42	1.32	1.23	0.99
7.1	1.77	1.65	1.53	1.42	1.32	1.23	0.95
7.2	1.78	1.65	1.53	1.42	1.32	1.23	0.90

7.3	1.78	1.65	1.53	1.42	1.32	1.23	0.85
7.4	1.78	1.65	1.53	1.42	1.32	1.23	0.79
7.5	1.78	1.66	1.54	1.43	1.33	1.23	0.73
7.6	1.79	1.66	1.54	1.43	1.33	1.24	0.67
7.7	1.79	1.66	1.54	1.43	1.34	1.24	0.60
7.8	1.54	1.53	1.42	1.32	1.23	1.14	0.53
7.9	1.30	1.21	1.12	1.04	0.970	0.904	0.47
8.0	1.09	1.02	0.944	0.878	0.818	0.762	0.41
8.1	0.874	0.812	0.756	0.704	0.655	0.611	0.35
8.2	0.700	0.651	0.606	0.565	0.527	0.491	0.30
8.3	0.562	0.523	0.487	0.455	0.424	0.396	0.26
8.4	0.452	0.421	0.393	0.367	0.343	0.321	0.22
8.5	0.365	0.341	0.318	0.298	0.278	0.261	0.18
8.6	0.296	0.277	0.259	0.242	0.227	0.213	0.15
8.7	0.241	0.226	0.212	0.198	0.186	0.175	0.13
8.8	0.198	0.185	0.174	0.164	0.154	0.145	0.11
8.9	0.163	0.153	0.144	0.136	0.128	0.121	0.09
9.0	0.135	0.128	0.121	0.114	0.108	0.102	0.06

Tabela 3. Níveis toleráveis de amônia para ambientes de água salobra (10mg/kg) em mg/L(N)

pH	10°C	15°C	20°C	25°C
7.0	20	14	9.4	6.6
7.2	12	8.7	5.9	4.1
7.4	7.8	5.3	3.7	2.6
7.6	5.0	3.4	2.4	1.7
7.8	3.1	2.2	1.5	1.1
8.0	2.0	1.4	0.97	0.69
8.2	1.3	0.87	0.62	0.44
8.4	0.81	0.56	0.41	0.29
8.6	0.53	0.37	0.27	0.20
8.8	0.34	0.25	0.18	0.14
9.0	0.23	0.17	0.13	0.10

(U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1999)

Embora a medição dos níveis totais de amônia deva ser feita regularmente, por meio de indicadores colorimétricos ou eletrônicos, há ainda observações que podem ajudar a monitorar um possível aumento nos níveis de amônia em tanques e viveiros. Um dos sinais que demonstram aumento dos níveis de compostos nitrogenados é a proliferação de fitoplâncton, o que pode desencadear em um aumento significativo do pH, deixando a água assim com maior potencial tóxico (KUBITZA, 1999). Alguns fatores, como comportamento e lesões cutâneas, observadas nos peixes, colaboram na identificação de alterações na qualidade da água, devido a excesso de amônia. Os principais são letargia, perda de apetite, permanência no fundo do tanque (especialmente para peixes de superfície), busca de oxigênio na superfície, brânquias inflamadas, inflamação nas barbatanas, olhos ou ânus inflamados (GROUP, 1986; ISRAELI-WEINSTEIN & KIMMEL, 1998; WILKIE, 1997).

A aferição das concentrações de amônia pode ser baseada nas quantidades de amônia na forma NH_3 ou NH_4^+ , além da concentração total de nitrogênio na forma de amônia. No

entanto, deve-se levar em consideração fatores como temperatura, pH e salinidade. A periodicidade de aferição, principalmente em sistemas de cultivo fechado, deve ocorrer diariamente, até que se tenha um perfil das alterações ao longo do tempo, em função da biomassa e regime de alimentação empregado no criadouro.

A transformação da amônia, até sua forma menos tóxica através da nitrificação, envolve bactérias de dois gêneros, as Nitrossomonas, que oxidam a amônia até nitrito (NO_2^-) e as Nitrobacters, que oxidam o nitrito a nitrato (NO_3^-) Figura 1.

Algumas medidas podem ser tomadas quando o sistema de criação se encontra com concentrações de amônia ou nitrito acima do desejado. A primeira medida é a troca parcial da água, de maneira gradual, até que os níveis dos compostos nitrogenados na água alcancem os valores aceitáveis. No caso do cativeiro se tratar de um tanque de grandes dimensões em que a troca da água seja uma medida inviável, é importante que se controle o pH e a temperatura, lembrando que esses fatores podem influenciar no nível de toxicidade da amônia. Outra medida a ser tomada é reduzir a quantidade de fitoplâncton existente no sistema de criação, a fim de controlar o pH e o aporte de oxigênio no sistema. O regime de alimentação também deve ser reduzido, de forma a diminuir a quantidade de sedimentos e controlar a quantidade de excretas.

3.3. Densidade de estocagem

Densidade de estocagem é o termo normalmente usado para se referir ao peso de peixes por unidade de volume (g.L^{-1} ou g.m^3) (ELLIS, 2001; LAZZARI *et al.*, 2011). A densidade de estocagem mais adequada varia de acordo com a espécie trabalhada, o tamanho dos animais, o sistema experimental em que os peixes serão mantidos e sua idade (HOLM *et al.*, 1990; EL-SAYED *et al.*, 1995; LAZZARI *et al.*, 2011). Contudo, ela é também determinada por fatores externos, como temperatura da água em que serão mantidos os peixes, luz e taxa de alimentação (WALLACE *et al.*, 1988).

Ao pensarmos na densidade de estocagem para condução de experimentos é importante considerar a biomassa inicial e a final esperada e sua relação com a capacidade de suporte do sistema experimental utilizado, buscando uma densidade biológica ótima para a espécie de peixe trabalhada ao longo do período experimental (SILVA & SIQUEIRA, 1997), pois, apesar da densidade inicial, experimentos de longa duração devem contar com o crescimento dos peixes, com base na conversão alimentar e nas alterações da densidade de estocagem calculadas no início do experimento.

Instalações laboratoriais que consigam simular ao máximo os ambientes naturais poderão prover maior conforto aos animais e, desta forma, melhorar sua capacidade de suporte para recebimento dos peixes. E, para o delineamento experimental, é importante considerar as densidades de estocagem, realizando uma biometria média inicial dos peixes antes do experimento, para que haja uma densidade de estocagem semelhante entre os grupos experimentais, não influenciando os resultados obtidos.

Densidades inadequadas de peixes podem gerar diversas complicações. Uma baixa densidade pode influenciar no aparecimento de classes hierárquicas, dominantes e subordinadas, em que os animais dominantes monopolizam as zonas de alimentação e o alimento, diferenciando o crescimento nessas duas classes. A hierarquização também pode trazer prejuízos como brigas excessivas, acarretando em lesões e mortalidade; assim como

densidades excessivas também podem acarretar variação no crescimento dos peixes, onde o grande adensamento dificulta o acesso ao alimento e gera competição nas zonas de alimentação, afetando a homogeneidade dos lotes a serem estudados (SCHIMITTOU, 1993; HUNTINGFORD & LEANIZ, 1997; MACLEAN & METCALFE, 2001).

Alguns autores correlacionam ainda a densidade diretamente com a transmissão de doenças, pois existe maior contato entre os peixes (TACHIBANA *et al.*, 2008). Portanto, a alta densidade animal é um fator predisponente para o aparecimento de diversas infecções bacterianas as quais podem ser submetidos os peixes (FIGUEIREDO & LEAL, 2008).

A densidade de estocagem também deve ser respeitada nos testes de toxicidade (CL50), pois influenciam diretamente a proporção do material testado que estará disponível aos organismos expostos. No Guia da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 2000), para testes agudos de toxicidade em peixes, é recomendável a utilização da densidade de 1 g de peixe L-1 de água para ambientes estáticos e semiestáticos, e, para ambientes com recirculação, uma maior densidade pode ser aceita. Portanto, a densidade de estocagem influencia na toxicidade de alguns compostos. Para testes de crescimento utilizando peixes juvenis a densidade deve ser baixa o suficiente para que uma concentração de oxigênio dissolvido de, pelo menos, 60% do valor de saturação do ar possa ser mantida sem aeração (OECD, 2000).

3.4. Alimentação

O tipo de alimento a ser fornecido aos peixes no biotério depende da fase de desenvolvimento dos animais, bem como ao hábito alimentar da espécie. É importante identificar o hábito alimentar para adequar o tipo de ração que será necessária. Neste manual, serão descritas as características dos alimentos que devem ser fornecidos aos animais com hábitos carnívoros e onívoros. Enquanto os alimentos devem ter um elevado conteúdo de proteínas para a alimentação de animais carnívoros, alimentos de origem vegetal e com menor quantidade de proteína são bem aproveitados pelos peixes de hábitos onívoros.

A adequada alimentação dos peixes deve estar relacionada com a fase de desenvolvimento de cada espécie. Serão descritos aqui os principais alimentos e métodos de fornecimento desse alimento nas fases de desenvolvimento inicial (larvas), juvenis e adultos.

3.4.1. De acordo com Logato (2000) as formas físicas de fornecimento da ração são:

a) Ração farelada: principal tipo de alimento fornecido aos peixes na fases iniciais de desenvolvimento. O tamanho das micropartículas deve ser adaptado ao tamanho da boca do peixe. Este tipo de ração deve ser fornecida em quantidade e frequência suficientes para que a qualidade da água não seja afetada em função de sobras;

b) Ração peletizada: alimento usado nas formas juvenis e em adultos de peixes. Neste tipo de ração, todos os ingredientes são submetidos à umidade, alta pressão, temperatura elevada e expansão da mistura, produzindo peletes que flutuam na água. Desta forma, este tipo de ração é indicado por reduzir as perdas de nutrientes na água e para manter uma boa qualidade do ambiente aquático. Este tipo de ração é mais utilizada nas formas juvenis de peixes em cativeiro; e

c) Ração extrusada: este tipo de ração permanece por mais tempo na superfície da água. processo de extrusão permite o tratamento térmico com uma combinação de calor, umidade e trabalho mecânico. Este tipo de ração é o mais indicado para os animais em crescimento e adultos.

A quantidade de ração a ser fornecida está diretamente relacionada com a fase do desenvolvimento do animal e com o hábito alimentar. De forma que as pós-larvas devem ser alimentadas 4 vezes ao dia, as formas jovens e em crescimento podem ser alimentadas 2 vezes ao dia (carnívoras) ou 3 vezes ao dia, no caso de serem espécies onívoras. Os animais adultos, independentemente do hábito alimentar, devem receber alimentação duas vezes ao dia. A temperatura da água afeta o consumo de ração dos peixes. Em temperaturas mais baixas, o consumo diminui e, em temperaturas elevadas, o consumo tende a aumentar. Desta forma, se aconselha manter a temperatura da água de acordo com a exigência da espécie, para o melhor aproveitamento da ração fornecida.

A ração pode ser oferecida de forma manual ou automática (RIBEIRO *et al.* 2002). A quantidade de ração a ser fornecida varia de acordo com alguns fatores como, por exemplo, a densidade de estocagem, a espécie, o tipo de ração e a fase de crescimento do animal. O conceito de biomassa é adotado para o cálculo da quantidade de ração que deve ser fornecida aos animais, de forma que os peixes devem ser pesados para saber o seu peso e calcular a quantidade de ração que deve ser consumida. Em animais adultos, se recomenda uma quantidade de 3% do peso da biomassa.

Todos os cuidados acima descritos devem ser tomados para que a quantidade de ração ofertada aos peixes seja consumida em pequeno intervalo de tempo. Desta forma, a qualidade da água se mantém viável por mais tempo e os peixes estarão expostos a menor quantidade de resíduos.

3.5. Enriquecimento ambiental e social

Por questões práticas, como redução de custos e facilidade na limpeza e manipulação, muitas vezes tanques e aquários de manutenção dos peixes em laboratório acabam se tornando ambientes extremamente pobres. Entretanto, ambientes empobrecidos podem levar a alterações cognitivas, comportamentais e fisiológicas nos animais (STRAND *et al.*, 2010), inclusive, podendo invalidar ou tornar pouco confiáveis os dados obtidos em condições experimentais (REINHARDT, 2004). Para evitar esses efeitos e melhorar o bem-estar, é preciso fazer o enriquecimento ambiental dos recintos onde os peixes são mantidos sempre que for possível. Embora nem sempre o enriquecimento, tanto para animais terrestres como para aquáticos, comprovadamente, indique melhora no bem-estar (WILLIAMS *et al.*, 2009) e os efeitos do enriquecimento ambiental em peixes não sejam tão estudados como em espécies terrestres, já há evidências de que a manutenção em ambientes mais complexos aumenta a flexibilidade comportamental (BRAITHWAITE & SALVANES, 2005; SALVANES *et al.*, 2013), a plasticidade neural e o aprendizado dos peixes (SALVANES *et al.*, 2013). Esse aumento da complexidade pode ser feito por meio de elementos espaciais no ambiente, através do enriquecimento alimentar, com variação da alimentação e oferta de presas vivas e também considerar o enriquecimento social, ou seja, manter os peixes junto, a coespecíficos ou indivíduos de outras espécies, em contrapartida ao isolamento.

O enriquecimento espacial do ambiente pode ser feito, considerando a história natural da espécie em questão, com a adição de substrato (que além de promover filtragem biológica

extra, também favorece comportamentos de construção de ninhos e marcação de território, além de prover fundo com coloração para espécies com comportamento críptico); canos e outras estruturas para abrigo (fornece refúgio para os peixes. Entretanto, seu uso deve ser monitorado e o número de elementos deve ser adequado ao número de peixes, pois pode aumentar a disputa territorial em algumas espécies) e plantas (também fornecem abrigo, algumas espécies utilizam para postura de ovos) (WILLIANS *et al.*, 2009). O enriquecimento alimentar, com variação na dieta e utilização de presas vivas, também pode ser utilizado. As presas vivas favorecem a exibição de comportamentos de procura ativa por alimento e caça, promove variação na estimulação quimiossensorial e pode potencialmente melhorar o balanço nutricional (WILLIANS *et al.*, 2009).

O enriquecimento baseado no ambiente e modo de vida de uma determinada espécie de peixe pode favorecer a exibição do repertório comportamental normal pelos peixes, que consiste em uma das cinco liberdades descritas para o bem-estar de animais em ambiente de cativeiro. Uma vez que o conhecimento sobre o repertório comportamental natural de diversas espécies de peixe utilizadas em laboratório é escasso ou inexistente, muitas vezes é difícil determinar se o enriquecimento está promovendo a exibição desses comportamentos normais (WILLIANS *et al.*, 2009). Entretanto, no geral, conhecemos ao menos o hábito e a história natural da espécie (se bentônica, pelágica, etc.), e assim um enriquecimento com elementos básicos pode ser feito. É importante ressaltar, entretanto, que no ambiente enriquecido é preciso reposicionar os elementos (pedras, canos) semanalmente para mudar o ambiente (STRAND *et al.*, 2010; SALVANES *et al.*, 2013), ou este se tornará novamente monótono.

Embora o aumento da complexidade do ambiente possa reduzir alterações fisiológicas e comportamentais que afetariam os resultados exibidos pelos peixes em pesquisa e aulas práticas, é preciso ter em mente que o enriquecimento deve considerar também as particularidades do uso dos animais experimentais. Quando o enriquecimento é aplicado os recintos de manutenção e experimentação de peixes utilizados em pesquisas científicas, é necessário descrever as condições adequadamente ao publicar o estudo, de forma que seja possível manter sua replicabilidade. Ainda, em testes de toxicidade e efeito de compostos presentes na água, o enriquecimento deve levar em consideração os materiais utilizados, uma vez que pode haver absorção dos compostos químicos pelos objetos e conseqüentemente redução da concentração desejada (WILLIANS *et al.*, 2009).

O enriquecimento social também é muito importante, uma vez que a redução de estímulos de origem social é uma das condições mais problemáticas para as espécies gregárias (REINHARDT, 2004). Espécies que vivem em cardumes ou formam grupos hierárquicos podem ficar estressadas se mantidas em isolamento. Peixes de espécies que evoluíram o comportamento de viver em cardumes podem ter seu bem-estar diminuído quando mantidos isolados. Fazer parte de um cardume gera segurança, pois a detecção de predadores bem como a proteção dos indivíduos contra os ataques, são mais eficientes quando os peixes nadam de forma sincronizada em um grupo (PITCHER & PARRISH, 1993). Além disso, o enriquecimento social também auxilia no aprendizado, uma vez que os peixes podem assimilar novas atividades mais rapidamente, como captura de presas, quando em contato com coespecíficos mais experientes – fenômeno denominado aprendizado social (STRAND *et al.*, 2010). A forma de enriquecimento social não apenas é espécie-específica, como também deve considerar a ontogenia da espécie, uma vez que alguns peixes formam cardumes em algumas fases do desenvolvimento, enquanto vivem isolados em outras (WILLIANS *et al.*, 2009). É preciso tomar cuidado, entretanto, ao estabelecer a densidade,

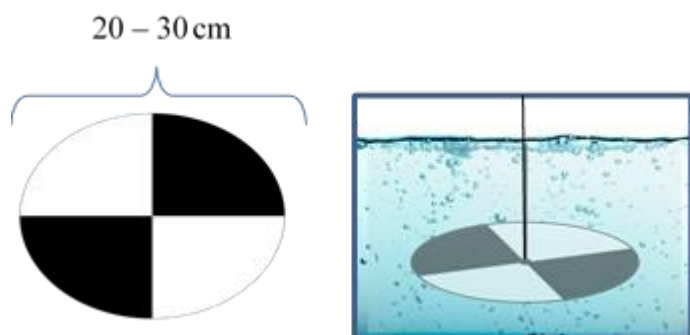
especialmente quanto ao monitoramento da qualidade da água e de interações agressivas. Ainda, há espécies cuja agressividade acaba exigindo o isolamento, como é o caso de machos de betas *Betta splendens*, mas deve-se sempre ter o cuidado de enriquecer o ambiente de peixes isolados (com elementos espaciais ou alimentação viva) para minimizar o efeito da redução de estímulos.

3.6. Regime de iluminação

A iluminação em um biotério de criação de peixes para experimentação ou em um regime de produção deve obedecer alguns critérios que podem ser determinantes para o sucesso da criação. A característica dos peixes, de não possuírem pálpebras capazes de bloquear a luminosidade, os torna muito susceptíveis às mínimas variações de intensidade de luz. A luminosidade é um dos mais importantes fatores para criação de peixes, uma vez que pode influenciar significativamente no desenvolvimento, fisiologia, maturação sexual, resposta imune e comportamento de predação (BLAXTER, 1986; HUNTER, 1981; ZHENG *et al.*, 2016). A luz que chega até os animais mantidos no tanque sofre influência de intensidade de luz aplicada sobre a superfície da água, seja ela artificial ou natural; da turbidez ou transparência da água, da profundidade do tanque, além da quantidade de sedimentos em suspensão e vegetação. No caso de biotérios, onde a iluminação na maioria dos casos é realizada por luz artificial, ainda deve ser levada em consideração a distância da fonte de luz em relação à superfície da água e o ciclo de tempo claro/escuro adotado.

A transparência da água consiste de sua capacidade em permitir a passagem de luz até suas regiões mais profundas, aumentando assim a visibilidade do meio interno do tanque. A presença de fitoplâncton no tanque, além de provocar turbidez na água, prejudicando a passagem de luz, pode ser um sinal de aumento de amônia e aumento do risco da escassez de oxigênio dissolvido na água, isso devido a um processo conhecido como bloom (florescimento), que é um aumento acelerado da população de fitoplâncton, seguido por escassez de nutrientes, morte e decomposição do fitoplâncton (SMITH & PIEDRAHITA, 1988; SMITH *et al.*, 2014).

Entre as formas de mensurar a turbidez da água, está o disco de Secchi, que consiste em um disco circular de cor branca (ou preto e branco), geralmente de 20 – 30 cm de diâmetro, produzido em material com capacidade de submersão, preso a uma haste ou corda no seu centro (Figura 1). A partir do registro da profundidade em que o disco deixa de ser visível, é possível determinar o nível de turbidez da água e o grau de penetrância da radiação solar (IDSO & GILBERT, 1974).



A intensidade de luz em tanques externos é dependente do clima. Por isso, está sujeita a variações. No entanto, no caso de biotérios ou tanques em lugares cobertos, a intensidade

depende da potência da luz artificial, da distância entre a fonte de luz e a superfície da água e da distribuição das fontes de luz. A luminosidade no tanque pode variar entre uma distribuição homogênea, ou optar pela criação de pontos de sombra, onde o peixe possa se ocultar, essa escolha deve levar em consideração os hábitos da espécie escolhida, uma vez que esse fator pode influenciar no comportamento de predação, além de poder ser um fator de estresse (CERRI, 1983; MAXIMINO *et al.*, 2010).

Para mensurar a intensidade de luz no tanque, pode ser usado um luxímetro posicionado próximo à superfície do tanque, com pontos de checagem distribuídos nas extremidades. A medida da intensidade de luz é mensurada em lux, que tem suas faixas ideais para a criação de peixes, dependente da espécie mantida no cativeiro. A primeira medida a ser tomada é a identificação do habitat natural da espécie escolhida, se é uma espécie de ambiente pelágico ou de bentônico. Animais de hábito pelágico ocupam as zonas mais superficiais dos corpos d'água, zona fotóptica, onde normalmente a temperatura é mais elevada e com maior intensidade de luz. Enquanto animais bentônicos ocupam regiões de maior profundidade, geralmente próximos ao substrato, onde a intensidade da luz é menor.

As faixas ideais de intensidade de luz para algumas espécies das famílias ciprynidae e cichlidae fica entre 180 – 500 lux (ALVAREZ-VERDE *et al.*, 2015; MATTHEWS *et al.*, 2002; RAJESWARI *et al.*, 2017). Para as espécies da família salmonidae, a faixa de intensidade de luz que propicia melhor desenvolvimento e maior taxa de sobrevivência fica entre 50 – 200 lux (WALLACE *et al.*, 1988).

Em termos fisiológicos, sabe-se que a iluminação pode afetar a regulação da pigmentação corporal de várias espécies. As variações na coloração podem ser indicativas de estresse e influenciar uma série de outros fatores como apetite, reprodução e resposta imune (ALY *et al.*, 2017; HÄRŞAN *et al.*, 2014; LOGAN *et al.*, 2006; SUGIMOTO, 2002).

Embora a maioria dos peixes tenha capacidade de percepção de cores, não foi observada a necessidade de nenhum espectro de luz específico para seu ambiente. Nesse caso, a iluminação por lâmpadas comuns é suficiente (PIGNATELLI *et al.*, 2010).

No caso de criadouros mantidos em ambientes fechados, onde a iluminação é artificial, o ciclo de luz escolhido é de fundamental importância. O ciclo de luz empregado no biotério deve respeitar as características do local de origem do animal modelo (Exemplo: Zebrafish originário da Índia onde o período de luz durante o verão possui aproximadamente 14 horas) (SPENCE *et al.*, 2008). No caso de espécies naturais de regiões equatoriais, pode-se adotar um ciclo de luz de 12/12 (claro/escuro), uma vez que essa região sofre poucas variações no ciclo de luz ao longo do ano. Por outro lado, no caso de animais endêmicos de regiões subtropicais e temperadas, ou seja, que não está entre os trópicos, o tempo de luz do dia pode chegar a 16hs durante o verão no Brasil, por exemplo (RANDLER & RAHAFAR, 2017).

Portanto, dependendo da espécie, região e da rotina do biotério, pode-se optar por um ciclo de luz fixo, utilizando como parâmetro a temporada de maior produtividade da espécie, normalmente vinculada aos períodos mais quentes, quando há menor gasto de energia e maior atividade, ou usar um ciclo flexível que mimetize a sazonalidade encontrada na natureza. No caso de espécies tropicais, usa-se um ciclo 12/12 e, para espécies de zona temperada, pode ser adotado um ciclo de até 16/8 (claro/escuro) (TAYLOR & MIGAUD, 2009). No entanto, qualquer mudança no fotoperíodo deve ocorrer de forma lenta e gradual, uma vez que já foi observado que mudanças repentinas no ciclo de luz podem acarretar em estresse, levando a

prejuízos reprodutivos devido à involução gônadal (NAVARRO *et al.*, 2014; SHIMIZU *et al.*, 1994).

Além da escolha de um fotoperíodo adequado, a utilização de artefatos, como tubos ou caixas no fundo dos tanques, pode contribuir para diminuição do estresse causado por uma iluminação excessiva, uma vez que podem servir como esconderijo, principalmente para animais de hábitos pelágicos, além de enriquecer o ambiente (SPANIER *et al.*, 2011).

IV - SANIDADE DE PEIXES

No Brasil, apesar do constante crescimento, a produção de peixes vem enfrentando entraves em virtude de problemas relacionados às enfermidades, levando à prejuízos econômicos e elevada taxa de mortalidade (SEBASTIÃO *et al.*, 2015). Com isso, cresce o número de estudos científicos visando à prevenção ou ao tratamento dessas doenças. Deve-se ficar atento para mudanças na natação, comportamento, coloração da pele, lesões cutâneas ou nas barbatanas ou perda de escamas, pois estas e outras alterações podem indicar que os peixes apresentam alguma enfermidade.

4.1. Principais doenças

4.1.1 Doenças bacterianas

Grande parte das doenças de peixes são de origem bacteriana e, dentre elas, destacam-se as bactérias do gênero *Aeromonas*, que causam a doença chamada aeromonose. As espécies mais estudadas são *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii*, *A. salmonicida* e *A. sobria*. Essas bactérias são gram-negativas, móveis e anaeróbicas facultativas, sendo causa de ulcerações cutâneas e septicemia hemorrágica em várias espécies de peixes de água doce (GHATAK *et al.*, 2016).

A bactéria gram-negativa *Flavobacterium columnare* é causadora da colunariose em peixes de água doce. Os sinais clínicos incluem letargia, perda de apetite, brânquias necróticas, lesões despigmentadas e necróticas na pele e barbatanas necrosadas (DAVIS, 1992).

A **edwardsiellose** é causada por bactérias bacilo gram-negativas do gênero *Edwardsiella*, das quais destacam-se a *E. tarda* e a *E. ictaluri*. Na primeira, o sinal clínico prevalente é dermatite necrosante ulcerativa, enquanto que, na segunda, apresentam septicemia entérica (DARWISH *et al.*, 2000; HAWKE *et al.*, 1981).

Bactérias gram-positivas do gênero *Streptococcus* são causadoras da estreptococose, a qual ocorre principalmente em peixes em situação de estresse e quando a temperatura da água está elevada. *Streptococcus agalactiae* é a espécie de maior incidência no Brasil, sendo comercializada uma vacina para a prevenção da doença causada por esta bactéria (RODRIGUES *et al.*, 2013). Deve-se remover os peixes acometidos para evitar a transmissão horizontal. Esse microrganismo apresenta alta virulência, sendo causadora de surtos de meningoencefalite e septicemia em eixes, especialmente em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (MIAN *et al.*, 2009).

A **franciselose** é causada por bactérias intracelulares gram-negativas do gênero *Francisella*, destacando-se as espécies patogênicas **F. tularensis**, **F. novocida** e **F. philomiragia**. A doença causa granulomatose sistêmica e alta mortalidade (KAMAISHI et al., 2005). Várias outras bactérias podem causar doenças em peixes, tais como: **Vibrio sp.**, **Pseudomonas sp.**, **Citrobacter freundii**, **Plesiomonas shigelloides** e **Flavobacterium sp.** (AUSTIN & AUSTIN, 2016).

O diagnóstico das doenças bacterianas é feito por observação dos sinais clínicos, isolamento das bactérias a partir dos órgãos acometidos em meios de cultura microbiológicos específicos e identificação por kits bioquímicos ou técnicas moleculares. Infecções induzidas experimentalmente são realizadas, através de inóculos em injeções intramusculares, gavagem, via ração ou via banho, a fim de pesquisar a dose de virulência ou a fim de testar novas substâncias capazes de prevenir ou combater essas bacterioses (BALDISSERA *et al.*, 2017; LIO-PO *et al.*, 1996).

4.1.2 Doenças fúngicas

A saprolegniose, também conhecida como “doença dos tufos de algodão”, é a micose mais frequente em peixes de cultivo. É causada por fungos do gênero *Saprolegnia*, os quais têm distribuição mundial. Acomete tanto os ovos quanto a pele dos peixes, mediante uma lesão (porta de entrada). O fungo multiplica-se na matéria orgânica acumulada no fundo do viveiro. Portanto, a remoção desses detritos é uma forma de prevenção da doença (VAN WEST, 2006).

Os fungos do gênero **Branchiomyces**, especialmente **B. sanguinis** e **B. demigrans**, são causadores da doença chamada branquiomicose (micose de brânquias). Ocorre transmissão horizontal por meio dos esporos em contato com as brânquias. As brânquias dos animais infectados tornam-se brancas ou castanhas, pálidas, devido ao comprometimento na circulação sanguínea, e necrosam. Os peixes ficam apáticos, anoréxicos, perdem o equilíbrio e podem morrer (MEYER & ROBINSON, 1973).

O ***Ichthyophonus hoferi*** causa a ictiofonose, uma micose sistêmica que afeta tanto peixes marinhos quanto de água doce. Há transmissão horizontal por meio de esporos móveis, relacionada ao consumo pelos peixes de pescados contaminados. Essa doença provoca inflamação sistêmica, gerando reações granulomatosas e necróticas em órgãos como coração, cérebro, fígado e rins. Esses efeitos, somados à inanição, podem levar o peixe à morte (RAHIMIAN & THULIN, 1996).

Dentre as micotoxinas (toxinas produzidas por fungos), a aflatoxina é a mais estudada delas. Vários ingredientes utilizados em rações de peixes têm potencial para desenvolver esses fungos produtores de micotoxinas, os quais destacam-se os dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. O risco é maior em locais com umidade e temperatura elevadas. Os sinais clínicos incluem perda de peso e de fertilidade e imunossupressão. Na histopatologia, evidencia-se danos hepáticos e teratogênese. Como prevenção, recomenda-se estocar a ração e seus ingredientes em locais secos e arejados e atentar para o prazo de validade da ração (SANTACROCE ET AL., 2008).

O diagnóstico das micoses é realizado por meio da observação dos sinais clínicos, exame microscópico do raspado das lesões para pesquisa de hifas, coloração das hifas e morfologia dos esporos. A identificação dá-se através da cultura celular em meio específico,

por técnicas bioquímicas e moleculares. Para prevenir essas doenças, deve-se manter a boa qualidade da água, evitar a introdução de peixes doentes e infectados, respeitar a densidade de estocagem recomendada, eliminar animais mortos, evitar acúmulo de matéria orgânica e desinfetar os viveiros afetados (RODRIGUES *et al.*, 2013).

4.1.3 Doenças virais

No Brasil, os vírus causadores de doenças em peixes pertencem ao gênero Rhabdovirus sp., sendo as rhabdoviroses doenças de comunicação obrigatória à Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2018).

A **Viremia Primaveril das Carpas (SVCV)** é uma doença infecciosa que leva à hemorragia aguda, ascite, edema no rim e no baço e apresenta altas taxas de morbidade e mortalidade, afetando principalmente as carpas comum e koi (*Cyprinus carpio*) (DIKKEBOOM *et al.*, 2004).

A **Septicemia Hemorrágica Viral (SHV)** é uma doença que acomete tanto peixes marinhos quanto de água doce e causa hemorragia cutânea severa, assim como hemorragia no rim e no fígado, com alta taxa de mortalidade (SMAIL, 2000).

O vírus da **Necrose Hematopoiética Infecciosa (NHI)** acomete principalmente salmonídeos, sendo originário da América do Norte e distribuindo-se para a Europa e a Ásia. A infecção ocorre através das brânquias, posteriormente acometendo órgãos internos, como o rim e o baço. Seus sinais clínicos incluem letargia intercalada com surtos de atividade frenética e anormal, escurecimento da pele, brânquias pálidas, ascite, abdome distendido, exoftalmia e hemorragias petequiais interna e externamente (OIE, 2017).

O diagnóstico das doenças virais é realizado pelo isolamento dos vírus em órgãos (rim, coração, baço, encéfalo, etc.), preferencialmente no estado agudo da doença. Para evitar a transmissão dos vírus, deve-se desinfetar os equipamentos e tanques de cultivo, segregar e descartar os animais acometidos e realizar vazão sanitário. A prevenção pode ser feita por meio de vacinação e pela eliminação de possíveis vetores (parasitas invertebrados do gênero *Argulus* e hirudíneos) (RODRIGUES *et al.*, 2013).

4.1.4 Doenças causadas por ectoparasitas

Piscinoodinium pillulare é um protozoário dinoflagelado de distribuição mundial. Peixes parasitados apresentam anorexia, alterações no nado, letargia, coloração mais escura que o normal, coloração de ferrugem e muco excessivo pelo corpo (SHAHAROM-HARRISON *et al.*, 1990).

Ichthyophthirius multifiliis é um protozoário ciliado de distribuição mundial que causa a doença popularmente conhecida como “**ictio**” ou “**doença dos pontos brancos**”. Cada ponto branco corresponde a um trofozoite, localizado abaixo das células epiteliais ou brânquias do hospedeiro. Infestações severas podem produzir altas taxas de mortalidade (BUCHMANN *et al.*, 2001).

Os **protozoários tricotrínicos** apresentam formato de campânula e cílios em forma de franja. Em infestações severas, os tricotrínicos alimentam-se de células epiteliais dos

hospedeiros. Os sinais clínicos incluem: corrosão das brânquias, produção excessiva de muco, hemorragias pontuais, hiperplasia e infecções secundárias (RODRIGUES *et al.*, 2013).

O **Gyrodactylus sp.** é um ectoparasita monogenético vivíparo, que infesta pele, barbatanas e brânquias dos peixes. Esse parasita é comumente associado a infestações com elevada mortalidade em salmão do Atlântico (*Salmo salar*) e truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (PEELER *et al.*, 2004).

Os **crustáceos braquiúros** dos gêneros **Argulus** e **Dolops**, conhecidos como “**piolhos de peixe**”, parasitam a superfície corporal dos peixes. Esses parasitas utilizam suas maxilas, em forma de ventosas, nos **Argulus sp.** e em forma de ganchos nos **Dolops sp.**, para perfurar a pele do hospedeiro e alimentar-se de células e sangue. Com isso, levam à abertura de pequenas feridas na pele, que servem de porta de entrada para infecções secundárias (FONTANA *et al.*, 2012).

Lernaea cyprinacea é um crustáceo copépode conhecido popularmente como “**verme âncora**”. O parasita adulto penetra no hospedeiro, provoca lesões hemorrágicas e fixa-se profundamente em seus tecidos, dificultando sua remoção. Em casos graves ou em peixes pequenos, pode causar a morte do hospedeiro (WAICHEIM *et al.*, 2017).

Os **isópodes** são crustáceos com mandíbulas adaptadas para perfuração. As formas jovens podem penetrar com maior intensidade nos tecidos, alojando-se em bolsas debaixo das escamas. Os sinais clínicos incluem perda de peso, dificuldade respiratória (quando se alojam na boca e brânquias) e lesões pelo corpo. Já os **hirudíneos** são crustáceos com hábito hematófago, sendo popularmente conhecidos como “**sanguessugas**”. Eles fixam-se no hospedeiro por meio de uma ventosa. Os principais sinais clínicos são brânquias pálidas e pequenas lesões ulcerativas. Possuem a capacidade de transmitir protozoários hemoparasitas (RODRIGUES *et al.*, 2013).

O diagnóstico das doenças causadas por ectoparasitas é feito através da visualização das lesões, de exame microscópico de raspado do muco e da biópsia de brânquias. A identificação da espécie deve ser feita com o auxílio de um especialista (RODRIGUES *et al.*, 2013).

4.1.5 Doenças causadas por endoparasitas

Dentre os **mixosporídeos**, destacam-se os dos gêneros **Myxobolus** e **Henneguya**. **Myxobolus sp.** é um parasita que afeta as brânquias, o músculo, o intestino, o rim e o fígado dos peixes. Dentre os principais sinais clínicos, estão palidez e inchaço das brânquias, presença de cistos nas brânquias e perda de peso até a morte devido à insuficiência hepática (MAFTUCH *et al.*, 2018). **Henneguya sp.** também afeta as brânquias, deixando-as inchadas e pálidas. Na histopatologia, encontram-se cistos nas brânquias, as quais revelam-se hemorrágicas e com focos inflamatórios. Esses cistos diminuem a eficiência respiratória, levando os peixes à morte por sufocamento (MARTINS *et al.*, 1999).

A respeito dos **trematódeos digenéticos**, destaca-se o **Clinostomum complanatum**, cujas metacercárias causam a “**doença dos pontos amarelos**”. Os peixes parasitados apresentam cistos amarelados distribuídos por todo o corpo. É uma doença de importância econômica, não só pela morbidade e mortalidade, mas também pelo aspecto repugnante que deprecia o valor do peixe. Sabe-se que os moluscos (hospedeiros intermediários) e as aves

migratórias (hospedeiros definitivos) exercem um importante papel na disseminação da doença entre os peixes (SILVA *et al.*, 2008).

Outro **trematódeo digenético** de importância é o **Ascocotyle (Phagicola) longa**. Os caramujos são hospedeiros intermediários das cercárias; os peixes, principalmente tainhas (*corpo d'água natural* spp.), são hospedeiros intermediários das metacercárias; e aves e mamíferos são hospedeiros definitivos. O homem é hospedeiro acidental, pois infecta-se ingerindo metacercárias no músculo de peixe cru ou mal cozido. Portanto, trata-se de uma zoonose, causando a doença chamada fagicolose humana (SIMÕES *et al.*, 2010).

Dentre os cestódeos, o mais importante é o **Diphyllobothrium latum**, que tem o corpo em forma de fita, com segmentos chamados proglótides, e habita o intestino dos peixes, sendo chamado de “**tênia dos peixes**”. Possui importância para a saúde pública, pois é uma zoonose transmitida através da ingestão de peixe cru ou mal cozido, levando à condição chamada de difilobotríase humana (GUSTINELLI *et al.*, 2016).

Por fim, em relação aos nematódeos, destacam-se o **Anisakis simplex**, o **Pseudoterranova decipiens** e o **Contracaecum osculatum**. Os parasitas adultos localizam-se no tubo digestório dos peixes (hospedeiros intermediários), enquanto que as fases larvais se localizam na musculatura, mesentério e outros órgãos, em forma de cistos. Sua maior importância dá-se em função de também ser uma zoonose, pois o humano (hospedeiro acidental) desenvolve a doença ao ingerir carne de peixe crua contendo esses cistos. Pode ocorrer a formação de granulomas eosinofílicos gastrointestinais, algumas vezes, havendo a necessidade de cirurgia endoscópica para o tratamento (BUCHMANN & MEHRDANA, 2016). O diagnóstico da maioria das endoparasitoses de peixes dá-se através da necropsia, com observação direta do parasita no intestino ou dos cistos na musculatura ou órgãos acometidos, seguida de identificação do parasita por especialista.

4.2. Métodos de tratamento das principais patologias

Na aquicultura, por se tratar de uma criação em larga escala, utiliza-se duas principais formas de administração de medicamentos: via oral (através da ração) ou via banhos (na água). Porém, também pode-se utilizar as vias subcutânea, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal e intracelomática.

Com relação aos agentes antibacterianos, no Brasil, as duas moléculas registradas para uso na aquicultura são o florfenicol e a oxitetraciclina, ambas com ação bacteriostática. Além desses dois antimicrobianos, apenas a sulfadimetoxina/ormetoprim também é aprovada pelo FDA - Food and Drug Administration para uso em aquicultura (BALDISSEROTTO *et al.*, 2017). Para peixes ornamentais, é utilizada a neomicina como agente antibacteriano.

Dentre os antifúngicos, destaca-se o verde malaquita por ser muito eficaz. Porém, foi banido mundialmente para uso em aquicultura, sendo utilizado apenas na criação de peixes ornamentais. Outros antifúngicos são: formalina, cloreto de sódio/cálcio, cobre, iodóforos, bronopol, quitosana, peróxido de hidrogênio e ozônio, sendo na maioria das vezes aplicados nos ovos, antes da eclosão (BALDISSEROTTO *et al.*, 2017).

Existem estudos avaliando a atividade *in vitro* de fármacos antivirais contra vírus de peixes e camarões, mas ainda não foi encontrado uso comercial na aquicultura. Devido à

estreita interação entre o vírus e o hospedeiro, a maioria dos agentes antivirais é tóxica (BALDISSEROTTO *et al.*, 2017).

Dentre os ectoparasitários, destacam-se o albendazol, o fembendazol, o mebendazol, o praziquantel, o levamisol, o diflubenzuron, o dióxido de cloro, a cloramina-T, a formalina (aprovada pelo FDA), o cloreto de sódio (bastante utilizado por ser barato, eficaz e seguro), o percarbonato de sódio, o sulfato de cobre, o permanganato de potássio, o peróxido de hidrogênio e o verde malaquita (não seguro para uso em aquicultura segundo o FDA, devido ao potencial carcinogênico) (BALDISSEROTTO *et al.*, 2017).

Já, em relação aos endoparasitários, destacam-se o **metronidazol**, para o tratamento de infestações por protozoários hexamitídeos; o **praziquantel**, para trematódeos digenéticos; o **praziquantel**, a **niclosamida** e o **mebendazol**, para cestóides; o **levamisol**, o **metrifonato**, o **fembendazol**, o **benzoato de emamectina** e a **ivermectina**, para nematóides; e o “**di-n-butyltinoxide**”, o **bitionol**, a **oxiclozanida** e a **loperamida**, para acantocéfalos. Estudos também demonstram atividades antibacteriana, antifúngica, antiviral e antiparasitária de compostos derivados de plantas (BALDISSEROTTO *et al.*, 2017).

4.3. Estresse em peixes mantidos em cativeiro

Assim como os outros grupos de vertebrados, quando submetidos a distúrbios, os peixes exibem uma resposta de estresse. No ambiente laboratorial, existem várias possíveis fontes de estresse para os peixes, como instalações e manejos inadequados, a presença dos tratadores, ruídos, além da própria manipulação referente ao uso dos peixes na pesquisa ou em práticas didáticas. A resposta de estresse a esses distúrbios consiste em uma cascata de alterações fisiológicas e comportamentais que permitem ao peixe lidar com a situação deletéria. As respostas comportamentais geralmente incluem comportamentos que permitem ao peixe evitar ou se afastar do distúrbio, como alterações na atividade (aumento, diminuição ou cessação da movimentação), além de alterações na alimentação e agressividade, entre outros padrões (SCHRECK *et al.*, 1997). As respostas fisiológicas podem ser divididas em respostas primárias, secundárias e terciárias. As respostas primárias consistem na ativação de dois eixos principais. O eixo simpático-cromafim consiste, após a detecção do estressor, na ativação do sistema nervoso autonômico simpático, cujas fibras eferentes estimulam a liberação das catecolaminas (noradrenalina e adrenalina) pelas células cromafins, situadas em torno dos vasos sanguíneos no rim cefálico dos peixes. As catecolaminas ficam armazenadas em grânulos dentro das células cromafins, e sua liberação, após a detecção do distúrbio, é bastante rápida, em questão de segundos. Entretanto, a meia vida desses neuro-hormônios é curta, de apenas alguns minutos. Portanto, o aumento das catecolaminas é rápido, mas transiente. Já, a resposta do eixo hipotálamo-hipófise-interrenais (HHI) se inicia no hipotálamo, com a liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH), que estimula a hipófise a liberar a corticotrofina (ACTH). O ACTH estimula as células interrenais, que se encontram agrupadas em torno dos vasos no rim cefálico nos peixes, a sintetizar e liberar cortisol (BARTON, 2002). O aumento dos níveis de cortisol começa cerca de minutos após a detecção do distúrbio (FOX *et al.*, 1997), uma vez que esse hormônio é um esteroide e não pode ser pré-sintetizado e armazenado, sua liberação depende de síntese imediata, demorando alguns minutos para seu aumento ser detectável, mas pode se manter por horas ou até mesmo dias. As alterações fisiológicas provocadas pelas catecolaminas e pelo cortisol são chamadas de respostas secundárias e envolvem adaptações metabólicas (aumento de energia disponível via glicogenólise, lipólise, proteólise e gliconeogênese), cardiorrespiratórias (aumento das frequências cardíaca e respiratória), iônicas (pode ocorrer desbalanço osmótico

devido ao aumento da permeabilidade da membrana branquial), sanguíneas e imunes (aumento do número das células vermelhas, ativação ou inibição das funções imunes dependendo da duração da resposta) (URBINATI *et al.*, 2015). Se o agente estressor for crônico e a resposta de estresse se sustentar por longos períodos, as alterações fisiológicas primárias e secundárias começam a se tornar deletérias, afetando o crescimento, imunidade e capacidade reprodutiva dos peixes, podendo levar a doenças ou até mesmo à morte dos indivíduos.

Além de importantes para assegurar um alto bem-estar para os peixes mantidos em laboratório, as diretrizes compiladas neste fascículo também são cruciais para evitar a ocorrência de estresse agudo e crônico nos peixes que serão utilizados em pesquisa e práticas didáticas, uma vez que as alterações comportamentais e fisiológicas da resposta de estresse afetam os resultados obtidos. O responsável pelo cuidado dos peixes deve não apenas se certificar de que as instalações, as condições de manutenção e o manejo dos animais estão de acordo com o recomendado para a espécie, como também estar atento para sinais indicativos de estresse nos peixes. As alterações comportamentais decorrentes do estresse são uma boa ferramenta de detecção, pois são uma das primeiras linhas de defesa dos animais contra estímulos adversos (BEITINGER, 1990), ocorrem no início da resposta e sua observação é não invasiva (HUNTINGFORD *et al.*, 2006). Algumas espécies podem apresentar escurecimento da coloração quando estressadas, mas vale ressaltar que alterações na coloração também ocorrem devido a interações sociais, por adaptação à cor do ambiente (coloração críptica) ou como sinalização sexual. Então, o tratador deve estar atento a todos os fatores que podem estar influenciando a coloração dos peixes. Peixes estressados também podem exibir alteração no apetite e até mesmo anorexia, bem como padrões alterados de locomoção (espécies de fundo permanecendo na superfície e vice-versa; espécies mais sedentárias apresentando aumento acentuado na locomoção, ou espécies mais ativas apresentando redução na movimentação). Um estressor agudo frequentemente resulta em aumento da frequência respiratória devido à ação das catecolaminas, observada pela alta frequência do batimento opercular (WENDELAAR BONGA, 1997), o que pode ser um indício de estresse, desde que descartada uma queda nos níveis de oxigênio na água. Qualquer alteração do comportamento dos peixes deve ser investigada, pois pode indicar a presença de um estressor não percebido pelo tratador. Além das alterações externas, a avaliação do estado de estresse pode recorrer a análises fisiológicas se houver a suspeita de perturbação dos peixes. A medição das catecolaminas é pouco usada como indicador de estresse em peixes, pois seu aumento rápido e transiente, no início da resposta de estresse, pode ser perdido ou mesmo o aumento detectado ser referente ao manejo da coleta de sangue para análise *in situ*. O indicador mais utilizado é o cortisol. Seus níveis podem ser detectados no sangue (plasma ou soro), ou mesmo após a extração em amostras de tecido. Entretanto, os níveis de cortisol variam ao longo do dia nos peixes e deve-se tomar o cuidado de sempre coletar o sangue no mesmo horário para evitar inferências erradas devido a essas flutuações. Indicadores relativos às respostas secundárias de estresse também podem ser utilizados, embora sejam bastante variáveis, como a glicemia, que aumenta durante a resposta de estresse (WENDELAAR BONGA, 1997), mas também após a alimentação. As proteínas de choque térmico (Heat Shock Proteins - HSPs), proteínas constitutivas e que desempenham um papel no metabolismo proteico (MORIMOTO *et al.*, 1990), também aumentam em diversos tecidos nos peixes em situações de estresse (IWAMA *et al.*, 1999). As HSPs podem mediar reparo, degradação ou agir como chaperonas moleculares em proteínas desnaturadas (KIANG & TSOKOS, 1998) e seu aumento vem sendo utilizado como indicador de estresse, embora ainda sejam escassos na literatura os valores de referência para que se utilize apropriadamente esse parâmetro para todas as espécies. Vale ressaltar, entretanto, que a

coleta de material fisiológico em si já é um estressor. Portanto, deve ser feita para a avaliação do estresse apenas quando for estritamente necessário.

Pode-se fazer a análise de metabólitos e hormônios através da água, ao invés da coleta de fluidos dos peixes. A detecção de esteroides na água dos peixes, por exemplo, já mostrou boa correlação com os níveis de esteroides endógenos dos indivíduos (ELLIS *et al.*, 2004), sendo portanto uma alternativa para a detecção do cortisol sem o estresse da manipulação. Entretanto, a análise da água pressupõe que apenas a média de todos os indivíduos presentes será inferida, exceto em casos em que os peixes sejam mantidos isolados. Portanto, pode não ser adequada para determinação de estresse dos peixes individualmente ou mesmo em grupo onde alguns peixes podem estar estressados e outros não, pois níveis altos de cortisol de alguns indivíduos podem acabar diluídos na média e não serem detectáveis.

V - Manejo de animais em laboratório

5.1. Captura

Os principais cuidados que devem ser observados na captura dos peixes no laboratório estão relacionados com a redução do estresse ao realizar a manipulação. A captura deve ser realizada após a redução do volume de água do aquário de manutenção dos animais, de forma a facilitar a captura usando um puçá com tamanho adequado de acordo ao peso do animal. O tempo de permanência dos peixes em ambiente sem oxigênio depende de vários fatores como a espécie, a fase de desenvolvimento e o tamanho. De maneira geral, ao manipular o animal fora da água, o uso de anestésicos deve ser recomendado. Neste caso, devem ser tomados os devidos cuidados, mantendo o animal hidratado (pano limpo e umedecido) e em ambiente com pouca luminosidade.

5.2. Administração de fármacos

A forma menos invasiva de se administrar substâncias a peixes é através de banhos de imersão, sendo esta a via de eleição principalmente quando se trata de lotes de animais. A substância é dissolvida na água (na concentração adequada ao volume da mesma) e absorvida através das brânquias (ou outros órgãos respiratórios) e/ou da pele. O método dispensa contenção física, poupando os animais de manipulações que podem ser estressantes e evitando lesões no tegumento, as quais podem tornar-se porta de entrada para agentes infecciosos. Todos os parâmetros físico-químicos da água devem ser controlados, uma vez que podem influenciar a farmacodinâmica de substâncias dissolvidas na mesma. Ao se observar sinais de toxicidade, deve-se transferir prontamente os peixes para recipiente contendo água pura e devidamente aerada. Os antiparasitários são exemplos de fármacos geralmente administrados em banho de imersão (CARPENTER, 2005; SUTILI *et al.*, 2013).

Em se tratando de terapia parenteral, as vias subcutânea, intramuscular, intravenosa e intracelomática podem ser utilizadas. A musculatura dorsal, ventrolateralmente à nadadeira dorsal é o local indicado para injeções intramusculares, que podem ser usadas para aplicação de antibióticos, por exemplo. Quando se optar por administração intracelomática, deve-se evitar a inoculação em órgãos internos (YANONG, 2006). Algumas substâncias, como os aditivos, podem ser incorporadas à dieta a ser oferecida aos peixes, sendo absorvidas no trato gastrointestinal (SACCOL *et al.*, 2013).

5.3. Anestesia

Existem meios físicos (por ex., hipotermia) e químicos (por ex., fármacos) de se promover a anestesia de peixes. No entanto, o uso de alternativas não farmacológicas vem sendo desencorajado devido ao aspecto desumano que lhes é inerente (COYLE *et al.*, 2004).

A anestesia de peixes é mais comumente realizada pelo método de imersão, sendo o fármaco dissolvido na água na concentração adequada para a espécie e de acordo com o objetivo do procedimento. Após absorção, o fármaco atinge a circulação sanguínea e chega ao SNC, promovendo seus efeitos no organismo. Fatores inerentes ao anestésico (por ex., grau de lipossolubilidade), à espécie (por ex., área de superfície branquial) e ao ambiente (por ex., temperatura) podem afetar a eficácia do procedimento anestésico (BURKA *et al.*, 1997; KING *et al.*, 2005; SNEDDON, 2012, 2015; ZAHL *et al.*, 2012).

Os anestésicos também podem ser administrados em peixes pelas vias intravenosa, intracelômica, intramuscular e oral e por aspersão branquial. No entanto, a necessidade de contenção física, a possibilidade de dano visceral e a inconsistência na taxa de absorção e no tempo de indução tornam estas opções bem menos práticas e seguras que o banho de imersão (FLEMING *et al.*, 2003).

Em diversos países, os anestésicos sintéticos mais comumente utilizados para anestésiar peixes em banho de imersão são o metanossulfonato de triclaína (MS-222), a benzocaína, o etomidato, o metomidato, o fenoxietanol e a quinaldina (ROSS & ROSS, 2008). Dentre estes, apenas a benzocaína e o fenoxietanol estão disponíveis no mercado brasileiro a um custo acessível. Outra opção é o propofol, anestésico geral de uso típico intravenoso amplamente utilizado nas Medicinas Veterinária e Humana. Sua eficácia na anestesia de peixes em banho de imersão foi comprovada (GRESSLER *et al.*, 2012) e subsequentes estudos testaram seu uso em variadas espécies de peixe empregando diferentes protocolos experimentais (GHOLIPOURKANANI & AHADIZADEH, 2013; GOMULKA *et al.*, 2014; GRESSLER *et al.*, 2015, 2016).

Dentre os anestésicos de origem natural empregados na anestesia por imersão de peixes, o óleo de cravo e o eugenol são os principais produtos com reconhecido potencial anestésico em vários países, inclusive no Brasil (JAVAHERY *et al.*, 2012; SUTILI *et al.*, 2014). Óleos essenciais extraídos de plantas brasileiras também têm sido explorados como anestésicos para banho de imersão para esta classe de animais, representando alternativas para futura comercialização no mercado local (CUNHA *et al.*, 2010; AZAMBUJA *et al.*, 2011; BECKER *et al.*, 2012; BENOVIĆ *et al.*, 2012; GRESSLER *et al.*, 2014; TONI *et al.*, 2014).

Inicialmente, os anestésicos induzem um efeito sedativo. Em seguida, há perda de equilíbrio, de mobilidade, de consciência e, por fim, de ação reflexa (ROSS & ROSS, 2008). Tais mudanças correspondem a estágios de indução à anestesia (Tabela 1), sendo o nível de depressão anestésica monitorado, de acordo com o objetivo do procedimento. No caso de cirurgias, por exemplo, a indução é feita até o estágio 4. A partir de então, é realizada a manutenção da anestesia durante o tempo necessário para executar a intervenção, utilizando uma concentração anestésica mais baixa do que aquela usada para induzir à anestesia. Ao final do procedimento, a exposição ao anestésico é interrompida, sendo o peixe transferido para recipiente contendo água pura para que ocorra a recuperação da anestesia. Os estágios observados durante a indução são gradualmente revertidos e o animal retoma natação e atividade normais.

Tabela 4. Estágios de indução à anestesia em peixes.

Estágio	Descrição	Características
1	Sedação leve	Perda parcial da reação aos estímulos externos.
2	Sedação profunda	Perda parcial do equilíbrio, nenhuma reação aos estímulos externos.
3a	Perda total do equilíbrio	Os peixes viram, mas retêm a habilidade da natação.
3b	Perda total do equilíbrio	A habilidade da natação pára, mas responde à pressão no pedúnculo caudal.
4	Anestesia	Perda da atividade reflexa, nenhuma reação aos estímulos externos.
5	Colapso medular	O movimento respiratório cessa (morte).

Fonte: SCHOETTGER & JULIN (1967).

5.4. Analgesia

Há evidência que os peixes são capazes de perceber estímulos nociceptivos e, em decorrência, apresentar não só respostas reflexas como também alterações comportamentais e fisiológicas (SNEDDON *et al.*, 2003; DUNLOP & LAMING, 2005; ASHLEY *et al.*, 2007; ROQUES *et al.*, 2010; WOLKERS *et al.*, 2013). Uma das razões subjetivas mais plausíveis para se administrar analgésicos a peixes é a inapetência ou anorexia, que geralmente resultam de procedimentos diagnósticos ou cirúrgicos (WEBER, 2011). Além destes, outros sinais como taxa de ventilação aumentada, posição anormal e imobilidade são indicativos de dor em peixes. No entanto, são poucos os estudos investigando os efeitos farmacocinéticos de analgésicos nestes animais, o que faz com que a administração empírica dos mesmos seja baseada no conhecimento obtido a partir de outras espécies animais (MURRAY, 2002; SNEDDON, 2012, 2015).

A maioria dos relatos do uso de analgésicos em peixes refere-se aos opióides butorfanol e morfina (LEWBART *et al.*, 1998; SNEDDON *et al.*, 2003a; HARMS & LEWBART, 2000; HARMS *et al.*, 2005; NORDGREEN *et al.*, 2009; WEBER *et al.*, 2009). O sistema nervoso central (SNC) de peixes apresenta receptores opióides μ e κ . Então, parece razoável que opiáceos sejam capazes de produzir analgesia nestes animais (CHERVOVA & LAPSHIN, 2000; HARMS *et al.*, 2005; VELASCO *et al.*, 2009; WOLKERS *et al.*, 2013). As propriedades analgésicas de antiinflamatórios não-esteróides (por ex., cetoprofeno e carprofeno) e anestésicos (por ex., lidocaína) também têm sido testadas para prevenir ou tratar a dor em peixes (WEBER *et al.*, 2009; ROBERTS, 2010; SNEDDON, 2012, 2015). Fármacos com ação analgésica podem ser administrados nestes animais pelas vias intramuscular, subcutânea e intracelomática (CARPENTER, 2005).

5.5. Cirurgia

Previamente a um procedimento cirúrgico, deve-se manter o peixe em ambiente tranquilo, com água aerada e em condições ideais para a espécie, a fim de reduzir o estresse fisiológico (MURRAY, 2002). Se houver a presença de infecções parasitárias ou bacterianas, por exemplo, tratar dias antes de submeter o animal ao procedimento cirúrgico para que sua capacidade imunológica esteja aumentada (WILDGOOSE, 2000).

O jejum de no mínimo 24 horas é necessário para evitar regurgitação e bloqueio dos ramos branquiais durante a anestesia profunda (LEWBART & HARMS, 1999). A manipulação cuidadosa previne a perda excessiva da camada protetora de muco, evitando a ocorrência de infecções cutâneas secundárias que poderiam prolongar a recuperação do animal (MURRAY, 2002).

Após a cirurgia, o peixe deve ser mantido em tanque de recuperação até que os efeitos da anestesia não sejam mais visualizados. Em seguida, o animal pode ser devolvido ao ambiente de origem, devendo ser mantido em isolamento para facilitar a inspeção frequente e a manutenção dos parâmetros da água em condições ótimas para que não haja estresse adicional. A presença de esconderijos pode proporcionar mais tranquilidade àquelas espécies que normalmente os utilizam. O uso de antibióticos e analgésicos no período pós-operatório deve ser considerado (WILDGOOSE, 2000; MURRAY, 2002; HARMS *et al.*, 2005).

Um dos aspectos mais importantes no que se refere à cirurgia de peixes é a necessidade de conhecimento da anatomia normal da espécie. Este, aliado a um protocolo anestésico adequado, pode garantir o sucesso do procedimento, já que conceitos gerais de anestesia, como hemostasia e manipulação delicada dos tecidos, também se aplicam a estes animais (MURRAY, 2002; WEBER *et al.*, 2009).

Neoplasias, distúrbios do globo ocular (por ex., catarata), biópsias de fígado, rins e baço, distúrbios da bexiga natatória, problemas reprodutivos e ingestão de corpo estranho constituem os procedimentos cirúrgicos mais comumente realizados em peixes (WOOSTER *et al.*, 1993; WILDGOOSE, 2000).

A constatação de desordens internas requer diagnóstico via equipamentos de imagem ou laparotomia exploratória (HARMS *et al.*, 1995; LEWBART *et al.*, 1998).

As cirurgias em peixes podem ser realizadas tanto com o animal dentro da água quanto fora dela. No primeiro caso, há risco de contaminação tecidual, o campo cirúrgico pode se tornar um tanto obscuro pela presença de sangue na água e as suturas não são de fácil realização. Por isso, a maioria dos procedimentos é feita fora da água. No entanto, o tempo de execução deve ser restrito e o equipamento adequado. A manipulação cuidadosa e a manutenção da umidade da pele evitam lesões e perda excessiva de muco (LEWBART & HARMS, 1999; BRATTELID & SMITH, 2000; MURRAY, 2002). O uso de equipamentos para monitorar os parâmetros vitais assegura maior segurança durante o transoperatório, uma vez que reflexos que indiquem o nível de depressão anestésica (principalmente os oculares) não são visualizados nestes animais. Peixes não possuem pálpebras e a alteração do tamanho pupilar é lenta (WILDGOOSE, 2000). Para manipulação fora da água, deve haver um sistema que promova um fluxo de água devidamente aerada através das brânquias e com uma concentração mais baixa de anestésico que a utilizada para anestesia rápida, a fim de evitar o colapso medular e consequente morte do peixe.

Estudos biológicos em peixes têm utilizado técnicas cirúrgicas minimamente invasivas como a intubação esofágica, a canulação da aorta dorsal e o cateterismo urinário, a fim de reduzir o estresse relacionado à manipulação e amostragem. No caso da intubação esofágica, o objetivo é a administração de compostos diretamente no trato gastrointestinal, minimizando inconvenientes como a regurgitação (GLOVER & HOGSTRAND, 2002). A canulação da aorta dorsal permite o monitoramento de parâmetros sanguíneos e/ou plasmáticos através de coletas repetidas (GINGERICH & DROTTAR, 1989; BELANGER *et al.*, 2001;

KIESSLING *et al.*, 2009; DJORDJEVIC *et al.*, 2012). Outras técnicas de canulação vascular incluem a veia e a artéria caudal, vasos dos arcos branqueais e a veia porta hepática (WELLS *et al.*, 1984; MCLEAN & ASH, 1989; BELANGER *et al.*, 2001; KARLSSON *et al.*, 2012). O cateterismo urinário tem sido realizado para estudar as funções renais e da bexiga urinária (WOOD & PATRICK, 1994). Algumas destas técnicas são utilizadas em combinação durante protocolos experimentais, permitindo a avaliação da cinética de absorção, distribuição, metabolismo e excreção de certos compostos (DENG *et al.*; 2000, 2001; FAN *et al.*, 2002). Outras técnicas cirúrgicas já descritas em peixes são: remoção do órgão endócrino pancreático, possibilitando o estudo de Diabetes mellitus insulino-dependente (KELLEY, 1993); celiotomia, para implantação de marcadores eletrônicos (COLLINS *et al.*, 2000; COOKE & WAGNER, 2004; ERICKSON & WEBB, 2007; HARMS & LEWBART, 2011); biópsias teciduais (GILLILAND, 1994; GRANT, 1996; MURRAY, 2010); e cirurgias reprodutivas com ou sem o uso de técnicas endoscópicas (HERNANDEZ-DIVERS *et al.*, 2004; PARAGAMIAN *et al.*, 2005; WEBB & ERICKSON, 2007; DIVERS *et al.*, 2009; MATSCHE *et al.*, 2011). Todos esses procedimentos devem ser feitos em peixes sob anestesia profunda.

5.6. Coleta de material biológico

Biópsias externas (pele, escamas, nadadeiras e brânquias) podem auxiliar no diagnóstico de enfermidades bacterianas, virais, fúngicas e parasitárias e ainda na identificação de nódulos tumorais. O peixe pode ser contido manualmente ou ainda ser submetido à anestesia. No entanto, o uso da anestesia pode causar grande perda de ectoparasitas ou deixá-los imóveis, o que dificulta sua visualização (EIRAS *et al.*, 2000; CALLAHAN & NOGA, 2002).

A coleta de amostras é feita em áreas com aparência anormal, como locais descolorados, úlceras, erosões e massas, eliminando-se primeiramente o muco. Lamínulas são utilizadas para raspagem da epiderme, enquanto tesouras ou lâminas de bisturi são empregadas na obtenção de amostras de nadadeiras e brânquias. No caso das brânquias, o arco branquial não deve ser cortado. Coleta-se apenas um fragmento pequeno do filamento. Em peixes maiores, o raspado de brânquias também pode ser realizado. As amostras devem ser colocadas em uma lâmina com uma gota de água (doce ou salgada, dependendo da classe ictícola em questão) e cobertas com uma lamínula para subsequente avaliação (YANONG, 2006).

Material fecal pode ser coletado para visualização de parasitas no exame direto em microscópio. A coleta é feita facilmente, pressionando-se regiões próximas à abertura anal. Por isso, deve-se atentar para a contaminação de outros tipos de amostras, como raspados de epiderme, pois a pressão da lâmina pode induzir a eliminação tanto de fezes quanto de esperma nos machos. A pressão exercida sobre o abdômen do peixe não deve ser muito grande e nem feita com objetos abrasivos, para evitar lesões epiteliais e perda de escamas. As fezes também podem ser obtidas via sonda cloacal. Ainda, uma forma não invasiva de coletar as fezes dos peixes é através da decantação, mantendo os animais em tanques com fundo cônico e com uma abertura na extremidade inferior, onde as fezes se concentram, permitindo a coleta sem perturbação dos peixes. No entanto, essa técnica não permite a individualização dos peixes, exceto quando são mantidos isoladamente, e está mais sujeita à contaminação, como restos alimentares e escamas.

Quanto à obtenção de sêmen, deve-se eliminar a urina e as fezes antes da extração do mesmo. Se isto não for possível, descarta-se a amostra. Se o macho estiver pronto para a

reprodução, a liberação de sêmen ocorrerá quando a região abdominal for pressionada da frente para trás até as proximidades do poro urogenital. O sêmen é então utilizado para avaliar as condições de saúde espermática, como motilidade, viabilidade e concentração de espermatozoides, podendo ser usado para criopreservação (EIRAS *et al.*, 2000; YANONG, 2006). Entretanto, é necessário muito cuidado na extração do sêmen, pois a pressão da extrusão mecânica pode levar à perda de escamas, escoriações na pele e severa perda epitelial (ZANUZZO *et al.*, 2015).

Amostras de tecido muscular também são úteis no diagnóstico de formas parasitárias (por ex., cistos). Preparados úmidos de órgãos internos obtidos durante a necropsia são igualmente utilizados para avaliação microscópica, como no caso de infestações por parasitas protozoários no aparelho gastrointestinal (EIRAS *et al.*, 2000).

No caso de suspeita de enfermidade bacteriana em uma grande população ictícola, recomenda-se a eutanásia de exemplares moribundos para amostragem microbiológica usando técnicas estéreis apropriadas. Podem ser realizadas culturas de encéfalo, rins, fígado e baço em se tratando se suspeita de infecção sistêmica. A região a ser amostrada deve ser externamente esterilizada com álcool, o qual deve secar antes da realização da incisão com uma lâmina de bisturi. Para a coleta, pode-se utilizar um *swab* estéril ou ainda inserir uma tesoura esterilizada para obtenção de um fragmento do tecido. As culturas de sangue também são úteis no diagnóstico de enfermidade bacteriana sistêmica, com a vantagem de que a amostra é coletada a partir do animal vivo. A agulha deve ser inserida em local previamente limpo com gaze estéril e solução salina (YANONG, 2006).

A coleta de sangue em peixes é extensamente realizada para a avaliação de parâmetros hematológicos, bioquímicos e morfológicos e pesquisa de hemoparasitas. O acesso mais explorado são os vasos da região caudal. Para tal procedimento, o peixe pode ser apenas contido mecanicamente (no grupo controle em estudos para verificar o efeito de anestésicos) ou ainda estar sob efeito de um sedativo ou anestésico. Porém, apesar de serem utilizados para minimizar o estresse, tais fármacos podem promover alterações nos índices a serem avaliados (VELISEK *et al.*, 2007; ZAHL *et al.*, 2010; GHOLIPOURKANANI & AHADIZADEH, 2013; GOMULKA *et al.*, 2014; GRESSLER *et al.*, 2014). A coleta de sangue dos vasos caudais consiste na inserção da agulha ventrolateralmente da porção caudal pós-anal do peixe, evitando assim a cavidade peritoneal, em um ângulo de aproximadamente 45° na direção da coluna vertebral, onde os vasos estão localizados ventrolateralmente à medula espinhal. O ângulo de inserção pode variar de acordo com a anatomia do peixe e seu tamanho. A punção intracardíaca é menos utilizada, sendo a anestesia indispensável neste caso e que consiste na inserção da agulha perpendicularmente em relação ao ventre do peixe, diretamente no coração. Anticoagulantes (por ex., heparina, EDTA) são utilizados em quantidade mínima apenas para umedecer internamente a agulha e a seringa (RANZANI-PAIVA *et al.*, 2013). A secção caudal, que consiste na coleta de sangue diretamente dos vasos após o corte do pedúnculo caudal, deve ser evitada, pois, além de necessariamente resultar na morte do peixe, o sangue no geral é contaminado por outros fluidos teciduais exsudados no corte (CONGLETON & LAVOIE, 2001). Caso a secção caudal seja estritamente necessária, como no caso de peixes muito pequenos, onde as punções vaso-caudal ou cardíaca não são possíveis, é imprescindível que o animal seja profundamente anestesiado ou eutanasiado previamente. A coleta de sangue por punção dos vasos branquiais é possível nos peixes de maior tamanho, onde a visualização desses vasos é mais fácil. Por se tratar de uma área com maior pressão sanguínea, deve-se tomar muito cuidado para não romper os vasos, o que causa grande perda de sangue pelo peixe.

Em todos os métodos de coleta de sangue, é imprescindível tomar o cuidado de selecionar agulhas de tamanho adequado ao tamanho do peixe e à parte do corpo onde a coleta será feita. Embora agulhas de maior calibre resultem em uma coleta mais rápida, por permitirem maior fluxo de sangue, agulhas com um diâmetro inadequadamente grande podem romper os vasos ou o tecido cardíaco (no caso da punção cardíaca) e levar o peixe a óbito. Em relação à quantidade de sangue a ser amostrada, devemos levar em consideração o tamanho do animal e o ambiente em que vive. A coleta deve sempre considerar a quantidade de sangue no peixe, tomando-se o cuidado de utilizar peixes no tamanho adequado ao volume de sangue que precisa ser obtido. Estima-se em peixes que de 2 a 5% do peso corporal seja composto de sangue (JOHANSEN *et al.*, 2006). Peixes de água doce recuperam a volemia (volume sanguíneo) mais rapidamente, uma vez que seus fluidos corpóreos são mais concentrados em solutos do que a água do ambiente e por isso o animal adquire água facilmente. Já, para peixes marinhos, a reposição é mais demorada, dado que tendem a desidratar facilmente, por viverem em um meio mais concentrado em solutos.

5.7. Eutanásia

A eutanásia é utilizada com o intuito de causar a morte rápida de animais com o mínimo de dor e sofrimento possíveis (ver definição de eutanásia, critérios a serem adotados para eutanásia e condições necessárias para eutanásia na Resolução Normativa do CONCEA).

A preparação para o procedimento deve considerar, em primeiro plano, o bem-estar do peixe, sendo este mantido dentro da sua zona de conforto (por ex., parâmetros físico-químicos da água, intensidade de luz e nível de ruído). O jejum prévio de 12 a 24 horas também é indicado (AVMA, 2013).

Os métodos mais comumente utilizados para eutanasiar peixes são o farmacológico e o físico. Os métodos químicos, ou farmacológicos, referem-se à exposição à overdose de anestésicos em banhos de imersão ou por vias injetáveis. Em se tratando de imersão, o peixe deve ser mantido na solução anestésica por, no mínimo, 10 minutos após a cessação do batimento opercular (NEIFFER & STAMPER, 2009). Outros parâmetros como a perda de movimento, perda de reatividade a estímulos e flacidez (previamente ao rigor mortis) também devem ser observados a fim de se confirmar o óbito.

5.7.1. Métodos Químicos:

Dentre os fármacos recomendados (AVMA, 2013) estão os seguintes:

a) Benzocaína: a benzocaína, similar a triclaína, pode ser usada para imersão e sistema de recirculação para peixes. A forma isolada de benzocaína não é hidrossolúvel e deve ser preparada em álcool. Por outro lado, o hidrocloreto de benzocaína é hidrossolúvel e pode ser usado diretamente tanto para a anestesia como para a eutanásia;

b) Fenoxietanol: o 2-fenoxietanol é aceito com restrição em peixes, desde que os outros métodos recomendáveis interfiram comprovadamente nos resultados da pesquisa. O 2-fenoxietanol pode ser usado em concentrações de 0,5 a 0,6 mL/L ou 0,3 a 0,4 mg/L para causar a morte em peixes. A morte ocorre por colapso respiratório e os peixes devem ser

mantidos imersos na solução por pelo menos 10 minutos após cessar o movimento opercular como recomendado anteriormente;

c) Eugenol e óleo de cravo: o eugenol e o óleo de cravo da Índia podem ser utilizados para eutanásia de peixes. O óleo de cravo da Índia contém de 70 a 90% de eugenol. O eugenol, da classe dos fenilpropanoides, causa bloqueio neuromuscular competitivo, aparentemente potencializa o ácido gama aminobutírico (GABA) e é antagonista de receptores NMDA. É pouco solúvel em água e solúvel em solventes orgânicos, como o álcool. O eugenol e o óleo de cravo devem ser utilizados na concentração adequada de acordo com a espécie e as condições ambientais; e

d) MS222: o sulfonato metano de tricafina, ou MS222, pode ser administrado por diversas vias para causar a morte. Para peixes, pode ser colocado na água. Os peixes grandes podem ser removidos da água e pode-se esguichar uma solução concentrada da substância sob as brânquias. Dada a acidez do fármaco, quando usado em concentrações superiores a 500 mg/L, a solução pode ser tamponada com solução de bicarbonato de sódio saturada, o que resulta em um pH da solução de 7,0 a 7,5 e, assim, ser injetada nos espaços linfáticos e cavidades pleuroperitoneais. A eficiência deste anestésico é variável e pode apresentar alguns efeitos adversos, como perda de muco, irritação das brânquias e olhos, bem como danos a córnea.

e) Fármacos injetáveis: com relação aos fármacos injetáveis, que podem ser administrados em overdose pelas vias intravenosa, intracelomática, intramuscular e intracardíaca, para provocar a morte. As alternativas viáveis para uso no Brasil incluem o pentobarbital, a cetamina e o propofol.

5.7.2. Métodos físicos:

A utilização de meios físicos para eutanasiar peixes representa uma alternativa importante, principalmente no caso de pesquisas farmacológicas, nas quais deve-se evitar a interação entre as substâncias testadas (por ex., anestésicos e analgésicos) e os fármacos usados na eutanásia. As técnicas devem ser realizadas por pessoal treinado, assegurando-se a eficácia e a segurança das mesmas. São indicadas aos seguintes métodos:

a) Decapitação e concussão: a decapitação (destruição das conexões entre o encéfalo e a medula espinhal), a transecção cervical (corte da medula espinhal e de vértebras cervicais) e a concussão cranial (golpe no crânio), todas seguidas pela destruição do encéfalo, para assegurar a perda rápida da função cerebral, são métodos que podem ser empregados com as devidas ressalvas. A menos que a anestesia comprovadamente interfira no resultado da pesquisa, os animais devem ser anestesiados previamente antes do uso destes métodos. A decapitação tem a vantagem de não contaminar o material biológico a ser utilizado e não danificar o cérebro, sendo um procedimento rápido. As principais desvantagens são as seguintes: O manuseio e a contenção são estressantes para os animais, a permanência de atividade cerebral após a decapitação estabelece controvérsia se o método é humanitário, é visualmente desagradável e requer habilidade do profissional. A concussão cerebral é aceita com restrições no caso dos peixes. Só pode ser utilizada em circunstâncias excepcionais, para alívio do sofrimento em situação de emergência, de animais intensamente traumatizados, quando não houver outro método disponível no momento ou diante da total impossibilidade de uso de outros métodos que possam comprovadamente interferir nos resultados da

pesquisa. Sempre deve ser seguido por outro método que assegure a morte, como a decapitação;

b) Choque hipotérmico: o choque hipotérmico (2° a 4° C) é aceito para espécies pequenas oriundas de regiões tropicais e subtropicais (por ex., zebrafish) e para aquelas intolerantes a temperaturas mínimas acima dos 4° C. A hipotermia é aceita com restrições e deve ser usada em associação com outros métodos aceitos, como a decapitação, por exemplo (AVMA, 2013). Este método pode ser utilizado em peixes desde que outros métodos aceitos cientificamente comprometam os resultados da pesquisa e que a justificativa seja detalhada na proposta submetida à análise pela Ceua da Instituição;

c) Eletronarcore: este método também pode ser utilizado na eutanásia de peixes. Os sinais de atordoamento elétrico efetivo são extensão dos membros, opistótono, rotação ventral do globo ocular, espasmos tônicos seguidos de clônicos, com eventual flacidez muscular. Deve ser seguida de eletrocussão, para indução de fibrilação ventricular ou de outro método, tal como a decapitação, que assegure a morte; e

d) Imersão em nitrogênio líquido: esta técnica pode ser aplicada com restrição em peixes de pequeno porte que não ultrapassem 200 mg (0,2 g) de peso.

5.8. Necropsia

Técnicas necroscópicas devem ser realizadas em todos os exemplares, uma vez que podem auxiliar em investigações epidemiológicas e condutas terapêuticas. O ideal é realizar o exame logo após a morte dos peixes, já que estes autolisam mais rapidamente que outras espécies animais (MATUSHIMA, 2006). Durante a necropsia, coleta-se material biológico para testes diagnósticos, os quais incluem exame histopatológico, microbiológico, toxicológico, parasitológico e citológico, a fim de determinar a causa mortis (MATUSHIMA, 2006).

A necropsia de peixe inicia por uma inspeção macroscópica externa, a fim de avaliar o estado das escamas, da pele e das cavidades naturais e o aspecto geral do tegumento. Observa-se a presença de ectoparasitas e formações nodulares, por exemplo, sendo qualquer alteração amostrada para exames diagnósticos. Ectoparasitas podem ser fixados em álcool 70% para posterior identificação (MATUSHIMA, 2006).

Uma vez concluída a avaliação macroscópica externa, a cavidade celomática é aberta através de uma incisão ao longo da linha média ventral.

Imagens fotográficas feitas ao longo da inspeção podem auxiliar na elaboração do laudo necroscópico, o qual deve incluir a causa mortis, a moléstia principal e a descrição das alterações anatomopatológicas observadas (MATUSHIMA, 2006). As fotografias também servem para documentar achados de necropsia, como tumores viscerais e presença de conteúdo atípico em órgãos ocos.

5.9. Destino de carcaças

Carcaças de animais utilizados em experimentação são classificados Resíduos Sólidos do Grupo A (“resíduos que apresentam risco potencial à saúde pública e ao meio ambiente, devido à presença de agentes biológicos”), de acordo com a Resolução CONAMA nº 5, de 5

de agosto de 1993, seja a carcaça contaminada ou não por agentes patogênicos. As carcaças a serem descartadas devem ser acondicionadas em sacos plásticos adequados ao tamanho e peso do resíduo, devidamente identificados quanto ao seu conteúdo (CARDOSO, 2002). Se não for possível dar destino às carcaças imediatamente, recomenda-se que estas sejam acondicionadas em sacos plásticos identificados e armazenadas em câmaras frias ou freezer (-16°C ou temperatura mais baixa). O destino das carcaças pode ser aterro sanitário (desde que atenda às normas de biossegurança e de proteção ao meio ambiente), autoclavação (uma vez autoclavada, a carcaça está livre de contaminação e pode ser descartada em lixo comum) e incineração (calcinação da matéria orgânica, destruindo agentes patogênicos e gerando cinzas como resíduos) (CARDOSO, 2002). O destino das carcaças depende das instalações à disposição do laboratório de experimentação animal e de aulas práticas da instituição.

Referências Bibliográficas

- ALVAREZ-VERDE, C.A., SAMPAIO, L.A., OKAMOTO, M.H. Effects of light intensity on growth of juvenile brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*. Bol. DO Inst. PESCA, 2015.
- ALVES, F.L.; BARBOSA JUNIOR, A.; HOFFMANN, A. Antinociception in piaçu fish induced by exposure to the conspecific alarm substance. *Physiology and Behavior*, 110-111: 58-62, 2013.
- ALY, H.A., ABDEL RAHIM, M.M., ABDELATY, B.S., LOTFY, A.M. Impact of Different Colors of Artificial Light on Pigmentation and Growth Performance of Hybrid Red Tilapia (*Oreochromis mosambicus* × *O. hornorum*) Reared in Saline Well Water. *J. Mar. Sci. Res. Dev.* 7, 2017
- ARLINGHAUS, R.; COOKE, S.J.; SCHWAB, A.; COWX, I.G. Fish welfare: a challenge to the feelings-based approach, with implications to recreational fisheries. *Fish Fisheries*, 8:57–71, 2007.
- ARMELIN, V. A.; BRAGA, V. H. S.; TEIXEIRA, M. T.; RANTIN, F. T.; FLORINDO, L. H.; KALININ, A. L. Gill denervation eliminates the barostatic reflex in a neotropical teleost, the tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 42, p. 1213-1224, 2016.
- ASHLEY, P.J.; SNEDDON, L.U.; McCROHAN, C.R. Nociception in fish: stimulus-response properties of receptors on the head of trout *Oncorhynchus mykiss*. *Brain Research*, v.1166, p.47-54, 2007.
- AUSTIN, B.; AUSTIN, D. A. *Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish*. 6 ed. Switzerland: Springer International Publishing, 2016. 732 p.
- AVDESH, A. et al. Regular care and maintenance of a zebrafish (*Danio rerio*) laboratory: an introduction. *Journal of visualized experiments : JoVE*, 2012.
- AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition. Disponível em: <http://www.avma.org/issues/animal_welfare/euthanasia.pdf>. Acesso em 30 out. 2013.
- AZAMBUJA, C. R. M.; MATIAZZI, J.; RIFFEL, A. P. K.; FINAMOR, I. A.; GARCIA, L. O.; HELDWEIN, C. G.; HEINZMANN, B. M.; BALDISSEROTTO, B.; PAVANATO, M. A.; LLESUY, S. F. Effect of the essential oil of *Lippia alba* on oxidative stress parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) subjected to transport. *Aquaculture International*, v.319, p.156-161, 2011.
- BALDISSERA, M. D.; SOUZA, C. F.; BANDEIRA JUNIOR, G.; DE VARGAS, A. C.; BOLIGON, A. A.; CAMPOS, M. M. A.; STEFANI, L. M.; BALDISSEROTTO, B. *Melaleuca alternifolia* essential oil enhances the non-specific immune system and prevents oxidative damage in *Rhamdia quelen* experimentally infected by *Aeromonas hydrophila*:

Effects on cholinergic and purinergic systems in liver tissue. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 61, p. 1-8, 2017.

BALDISSEROTTO, B. *Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura*. EDUFMS, 2013. 349p.

BARTON, B. A. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology*, v.42, p.517–525, 2002.

BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C.; HEINZMANN, B. M.; DA CUNHA, M. A. *Farmacologia aplicada à aquicultura*. 1 ed. Santa Maria, RS: Editora UFSM, 2017. 653 p.

BATESON, P. Assessment of pain in animals. *Animal Behavior*, 42: 827–839, 1991.

BECKER, A.G.; CUNHA, M.A.; GARCIA, L.O.; ZEPPENFELD, C. C.; PARODI, T.V.; MALDANE, G.; MOREL, A. F.; BALDISSEROTTO, B. Transportation of silver catfish, *Rhamdia quelen*, in water with eugenol and the essential oil of *Lippia alba*. *Fish Physiology and Biochemistry*, v.38, p.789-796, 2012.

BECKER, A. G.; CUNHA, M. A.; GARCIA, L. O.; ZEPPENFELD, C. C.; PARODI, T. V.; MALDANE, G.; MOREL, A. F.; BALDISSEROTTO, B. Transportation of silver catfish, *Rhamdia quelen*, in water with eugenol and the essential oil of *Lippia alba*. *Fish Physiology and Biochemistry*, v.38, p.789-796, 2012.

BELANGER, J.M.; SON, J. H.; LAUGERO, K. D.; MOBERG, G. P.; DOROSHOV, S. I.; LANKFORD, S. E.; CECH, J. J. Effects of short-term management stress and ACTH injections on plasma cortisol levels in cultured white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. *Aquaculture*, v.203, p.165-176, 2001.

BENDHACK, F.; URBINATI, E. C. Mitigating stress effects during transportation of matrinxã (*Brycon amazonicus* Günther, 1869; Characidae) through the application of calcium sulfate. *Journal of Applied Ichthyology*, v. 25, p. 201–205, 2009.

BENLI, A. C. K.; KÖKSAL, G.; ÖZKUL, A. Sublethal ammonia exposure of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.): effects on gill, liver and kidney histology. *Chemosphere*, v. 72, n. 9, p. 1355–8, jul. 2008.

BENOVIT, S. C.; GRESSLER, L. T.; SILVA, L. L.; GARCIA, L. O.; OKAMOTO, M. H.; PEDRON, J. S.; SAMPAIO, L. A.; RODRIGUES, R. V.; HEINZMANN, B. M.; BALDISSEROTTO, B. Anesthesia and transport of Brazilian Flounder, *Paralichthys orbignyanus*, with essential oils of *Aloysia gratissima* and *Ocimum gratissimum*. *Journal of the World Aquaculture Society*, v.43, n.6, 2012.

BERKA, R. The transport of live fish: a review. EIFAC Technical Paper, n. 48, 52 pp, 1986.

BERMUDEZ, D.A., PRADA C.H., N.R. AND KOSSOWSKI, C. Ensayo sobre la reproducción de Cachama *Colossoma macropomus* (Cuvier) 1818 en cautiverio. Universidad Centro Occidental, Escuela de Agronomía, 23 pp., 1979

BEITINGER, T.L. Behavioral reactions for the assessment of stress in fishes. *Journal of Great Lakes Research*, v.16, p.495-528, 1990.

BLAXTER, J.H.S. Ninth larval fish conference: Development of sense organs and behaviour of Teleost larvae with special reference to feeding and predator avoidance. *Trans. Am. Fish. Soc.* 1986

BOLTAÑA, S. et al. Influences of thermal environment on fish growth. *Ecology and Evolution*, 2017.

BRAISSANT, O.; MCLIN, V. A.; CUDALBU, C. Ammonia toxicity to the brain *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2013.

BRAITHWAITE, V. A.; SALVANES, A. G. V. Environmental variability in the early rearing environment generates behaviourally flexible cod: implications for rehabilitating wild populations. *Proceedings of the Royal Society B*, v.272, p.1107-1113, 2005.

- BRATTELID, T.; SMITH, A. J. Methods of positioning fish for surgery or other procedures out of water. *Laboratory Animals*, v.34, p.430-433, 2000.
- BROMAGE, N.; M. BRUCE; N. BASAVARAJA; RANA, K. Egg quality determinants in finfish: The role of overripening with special reference to the timing of stripping in the Atlantic Halibut *Hippoglossus hippoglossus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 25 (1): 13-21, 1994.
- BROOM, D.M. Animal welfare: concepts and measurement. *Journal of Animal Science* 69 (10): 4167-4175, 1991.
- BROOM, D.M. Welfare assessment and relevant ethical decisions: key concepts. *Annual Review of Biomedical Sciences* 10: 79-90. 2008
- BRYDGES, N. M.; BRAITHWAITE, V. A. Does environmental enrichment affect the 33 behaviour of fish commonly used in laboratory work? *Applied Animal Behaviour Science* v. 118, p. 137-143, 2009.
- BU-ALI, Q.; AL-ASEERI, M.; AL-BASTAKI, N. An experimental study of performance parameters and ion concentration along a reverse osmosis membrane. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 2007.
- BUATTI, M.C.; PASTERNAK, G.W. Multiple opiate receptors: phylogenetic differences. *Brain Research*, 218: 400-405, 1981.
- BUCHMANN, K.; SIGH, J.; NIELSEN, C. V.; DALGAARD, M. Host responses against the fish parasitizing ciliate *Ichthyophthirius multifiliis*. *Veterinary Parasitology*, v. 100, p. 105-116, 2001.
- BUCHMANN, K.; MEHRDANA, F. Effects of anisakid nematodes *Anisakis simplex* (s.l.), *Pseudoterranova decipiens* (s.l.) and *Contracaecum osculatum* (s.l.) on fish and consumer health. *Food and Waterborne Parasitology*, v. 4, p. 13-22, 2016.
- BURKA, J. F.; HAMMEL, K. I.; HORSBERG, T. E.; JOHNSON, G. R.; RAINNIE, D. J.; SPEARS, D. J. Drugs in salmonid aquaculture - a review. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v.20, p.333-349, 1997.
- CALLAHAN, H. A.; NOGA, E. J. Tricaine dramatically reduces the ability to diagnose protozoan ectoparasite (*Ichthyobodo necator*) infections. *Journal of Fish Diseases*, v.25, p.433-437, 2002.
- CARDOSO, C. V. P. Destino de carcaças. In: Andrade, A.; Pinto, S. C.; Oliveira, R. S. *Animais de Laboratório: criação e experimentação*. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, p.280-288, 2002.
- CARNEIRO, P. C. F.; URBINATI, E. C. Salt as a stress response mitigator of matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther), during transport. *Aquaculture Research*, v. 32, p. 297–304, 2001.
- CAROLSFELD, J. Reproductive physiology e induced breeding of fish as related to culture of Colossomas. Páginas 37-73 in Armando Hernandez, editor. *Cultivo de Colossoma* (SUDEPE-Colciencias-CIID). Canada, 1989.
- CARPENTER, J. W. *Exotic Animal Formulary*, 3 ed. St. Louis, MO: Elsevier Saunders, 564 p., 2005.
- CERRI, R.D. The effect of light intensity on predator and prey behaviour in cyprinid fish: Factors that influence prey risk. *Anim. Behav.*, 1983.
- CHANDROO, K. P., DUNCAN, I. J. H; MOCCIA, R. D. Can fish suffer? Perspectives on sentience, pain, fear and stress. *Applied Animal Behavior Science*, 86 (3-4):225-250, 2004.
- CHAVES, P. T. C. Aspectos convergentes da dinâmica ovariana nos peixes, com uma contribuição à biologia reprodutiva de 14 espécies do litoral de São Paulo. Tese de Doutorado. Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo. 123p.; 1991.

- CHERVOVA, L. S.; LAPSHIN, D. N. Opioid modulation of pain threshold in fish. *Doklady Biological Science*, v.375, p.590-591, 2000.
- CLAIBORNE, J. B.; EDWARDS, S. L.; MORRISON-SHETLAR, A. I. Acid-base regulation in fishes: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of experimental zoology*, 2002.
- CLARKE, A.; JOHNSTON, N. M. Scaling of metabolic rate with body mass and temperature in teleost fish. *Journal of Animal Ecology*, 1999.
- CLEVELAND P. H. JR., LARRY S. R., ALLAN L. *Animal Diversity*. 3^a Ed, McGraw-Hill Science, 464 p. 2002.
- COLLINS, M.; SMITH, T.; POST, W.; PASHUK, O. Habitat utilization and biological characteristics of adult Atlantic sturgeon in two South Carolina rivers. *Transactions of American Fisheries Society*, v.129, p.982-988, 2000.
- COYLE, S. D.; DURBOROW, R. M.; TIDWELL, J. H. *Anaesthetics in aquaculture*. Southern Regional Aquaculture Center Publication, v.3900, 2004.
- CONGLETON, J. L.; LAVOIE, W. L. Comparison of Blood Chemistry Values for Samples Collected from Juvenile Chinook Salmon by Three Methods. *Journal of Aquatic Animal Health*, v.13, p.168-172, 2001.
- COOKE, S. J.; WAGNER, G. N. Training, experience and opinions of researchers who use surgical techniques to implant telemetry devices into fish. *Fisheries*, v.29, p.10-18, 2004.
- CUNHA, M. A.; BARROS, F. M. C.; GARCIA, L. O.; VEECK, A. P. L.; HEINZMANN, B. M.; LORO, V. L.; EMANUELLI, T.; BALDISSEROTTO, B. Essential oil of *Lippia alba*: a new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Aquaculture*, v.306, p.403-406, 2010.
- DARWISH, A.; PLUMB, J. A.; NEWTON, J. C. Histopathology and pathogenesis of experimental infection with *Edwardsiella tarda* in channel catfish. *Journal of Aquatic Animal Health*, v. 12, p. 255-266, 2000.
- DAVIS, H. S. A new bacterial disease of fresh-water fishes. *Bulletin of the United States Bureau of Fisheries*, v. 38, p. 261-280, 1992.
- DELICIO, H.C.; BARRETO, R.E.; NORMANDES, E.B.; LUCHIARI, A.C.; MARCONDES, A.L. A place preference test in the fish Nile tilapia. *Journal of Experimental Animal Science* v. 43, p. 141-148, 2006.
- DELICIO, H.C.; BARRETO, R.E. Time-place learning in food-restricted Nile tilapia. *Behavioural Processes*, v. 77, p. 126–130, 2008.
- DENG, D. F.; REFSTIE, S.; HEMRE, G.-I.; CROCKER, C. E.; CHEN, H. Y.; CECH JR., J. J.; HUNG, S. S. O. A new technique of feeding, repeated sampling of blood and continuous collection of urine in white sturgeon. *Fish Physiology and Biochemistry*, v.22, n.4, p.191-197, 2000.
- DENG, D. F.; REFSTIE, S.; HUNG, S. S. O. Glycemic and glycosuric responses in white sturgeon after oral administration of simple and complex carbohydrates. *Aquaculture*, v.199, p.107-117, 2001.
- DIKKEBOOM, A. L.; RADI, C.; TOOHEY-KURTH, K.; MARCQUENSKI, S.; ENGEL, M.; GOODWIN, A. E.; WAY, K.; STONE, D. M.; LONGSHAW, C. First report of Spring Viremia of Carp Virus (SVCV) in wild common carp in North America. *Journal of Aquatic Animal Health*, v. 16, p. 169-178, 2004.
- DIVERS, S.; BOONE, S.; HOOVER, J.; BOYSEN, K.; KILLGORE, K.; MURPHY, C.; GEORGE, S.; CAMUS, A. Field endoscopy for identifying gender, reproductive stage and gonadal anomalies in free-ranging sturgeon (*Scaphirhynchus*) from the lower Mississippi River. *Journal of Applied Ichthyology*, v.25, p.68-74, 2009.

DJORDJEVIC, B.; KRISTENSEN, T.; ØVERLI, Ø.; ROSSELAND, B. O.; KIESSLING, A. Effect of nutritional status and sampling intensity on recovery after dorsal aorta cannulation in free-swimming Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiology and Biochemistry*, v.38, n.1, p.259-272, 2012.

DONALDSON, M. R. et al. Cold shock and fish *Journal of Fish Biology*, 2008.

DREBROG, S.; REL SUNDSTROM, G.; LARSSON, T.A. Evolution of vertebrate opioid receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 105(40):15487–15492, 2008.

DUNLOP, R.; LAMING, P. Mechanoreceptive and nociceptive responses in the central nervous system of goldfish (*Carassius auratus*) and trout (*Oncorhynchus mykiss*). *The Journal of Pain*, v.6, n.9, p.561-568, 2005.

DUNLOP, R.; MILLSOPP, S. LAMING, P. Avoidance learning in goldfish (*Carassius auratus*) and trout (*Oncorhynchus mykiss*) and implications for pain perception. *Applied Animal Behaviour Science*, 97:255-271, 2006.

DUNCAN, I. J. H. Animal welfare defined in terms of feelings. *Acta Agriculturae Scandinavica, Supplementum*, v.27, p. 29-35, 1996.

EDDY, F. B. Ammonia in estuaries and effects on fish *Journal of Fish Biology*, 2005.

EDELMAN, G. M.; TONONI, G.A. *Universe of consciousness*. Basic Books, New York, NY, 2000.

EIRAS, J. C.; TAKEMOTO, R. M.; PAVANELLI, G. C. *Métodos de Estudo e Técnicas Laboratoriais em Parasitologia de Peixes*. Maringá: Eduem, 173 p., 2000.

EL-SAYED, A. F. M.; MOSTAFA, K. A.; ALMOHAMMADI, J. S.; EL-DEHAIMI, A.; KAYID, M. Effects of stocking density and feeding levels on growth rates and feed utilization of rabbitfish *Siganus canaliculatus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, Baton Rouge, v. 26, n. 2, p. 212-216, 1995.

ELLIS, T. What is stocking density. *Trout News CEFAS* 32:35-37; 2001.

ELLIS, T.; JAMES, J. D.; STEWART, C.; SCOTT, A. P. A non-invasive stress assay based upon measurement of free cortisol released into the water by rainbow trout. *Journal of Fish Biology*, v.65, p.1233–1252, 2004.

EMERSON, K. et al. Aqueous Ammonia Equilibrium Calculations: Effect of pH and Temperature. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 1975.

ERICKSON, D.; WEBB, M. Spawning periodicity, spawning migration, and size at maturity of green sturgeon, *Acipenser medirostris*, in the Rogue River, Oregon. *Environmental Biology of Fishes*, v.79, p.255-268, 2007.

EVANS, D. H. The Multifunctional Fish Gill: Dominant Site of Gas Exchange, Osmoregulation, Acid-Base Regulation, and Excretion of Nitrogenous Waste. *Physiological Reviews*, 2005.

FAN, T. W. M.; TEH, S. J.; HINTON, D. E.; HIGASHI, R. M. Selenium biotransformations into proteinaceous forms by foodweb organisms of selenium-laden drainage waters in California. *Aquatic Toxicology*, v.57, n.1-2, p.65-84, 2002.

FIGUEIREDO, H. C. P.; LEAL, C. A. G. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 37, p. 8-14, 2008.

FLEMING, G. J.; HEARD, D. J.; FLOYD, R. F.; RIGGS, A. Evaluation of propofol and metamidone-ketamine for short-term immobilization of Gulf of Mexico sturgeons (*Acipenser oxyrinchus desotoi*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v.34, p.153-158, 2003.

FONTANA, M.; TAKEMOTO, R. M.; MALTA, J. C. O.; MATEUS, L. A. F. Parasitism by argulids (Crustacea: Branchiura) in piranhas (Osteichthyes: Serrasalminidae) captured in the Caiçara bays, upper Paraguay River, Pantanal, Mato Grosso State, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, v. 10, p. 653-659, 2012.

FONTES, N. A.; SENHORINI, J. A.; LUCAS, A.F.B. Efeito de duas densidades de estocagem no desempenho larval do pacu (*Piaractus mesopotamicus* (fêmea) HOLMBERG, 1887) X *Colossoma macropomum* (macho) (CUVIER, 1818), em viveiros. Boletim Técnico do CEPTA, Pirassununga, v. 3, p. 23-32, 1990.

FOX, H. E.; WHITE, S. A.; KAO, M. H. F.; FERNALD, R. D. Stress and dominance in a social fish. *The Journal of Neuroscience*, v.17, p.6463–6469, 1997.

FLORINDO, L. H.; LEITE, C. A. C.; KALININ, A. L.; REID, S. G.; MILSOM, W. K.; RANTIN, F. T. . The Role of Branchial and Orobranchial O₂ Chemoreceptors in The Control Of Aquatic Surface Respiration (ASR) in The Neotropical Fish Tambaqui (*Colossoma macropomum*): Progressive Response to Prolonged Hypoxia. *Journal of Experimental Biology*, Inglaterra, v. 209, n.9, p. 1709-1715, 2006.

GARCIA, L. D. O. et al. Freshwater temperature in the state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil, and its implication for fish culture. *Neotropical Ichthyology*, 2008.

GHATAK, S.; BLOM, J.; DAS, S.; SANJUKTA, R.; PURO, K.; MAWLONG, M.; SHAKUNTALA, I.; SEN, A.; GOESMANN, A.; KUMAR, A.; NGACHAN, S. V. Pan-genome analysis of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii* and *Aeromonas caviae* indicates phylogenomic diversity and greater pathogenic potential for *Aeromonas hydrophila*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 109, p. 945-956, 2016.

GHOLIPOURKANANI, H.; AHADIZADEH, S. Use of propofol as an anesthetic and its efficacy on some hematological values of ornamental fish *Carassius auratus*. *SpringerPlus*, v.2, p.1-5, 2013.

GILLILAND, E. R. Comparison of absorbable sutures used in Largemouth Bass liver biopsy surgery. *Progressive Fish-Culturist*, v.56, p.60-61, 1994.

GINGERICH, W. H.; DROTTAR, K. R. Plasma catecholamine concentrations in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) at rest and after anesthesia and surgery. *General and Comparative Endocrinology*, v.73, n.3, p.390-397, 1989.

GLOVER, C. N.; HOGSTRAND, C. In vivo characterization of intestinal zinc uptake in freshwater rainbow trout. *Journal of Experimental Biology*, v.205, p.141-150, 2002.

GHOLIPOURKANANI, H.; AHADIZADEH, S. Use of propofol as an anesthetic and its efficacy on some hematological values of ornamental fish *Carassius auratus*. *SpringerPlus*, v.2, p.1-5, 2013.

GOMULKA, P.; WLASOW, T.; SZCZEPKOWSKI, M.; MISIEWICZ, L.; ZIOMEK, E. The effect of propofol anaesthesia on haematological and biochemical blood profile of European whitefish. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v.14, p.331-337, 2014.

GONZALEZ-NUNES, V.; RODRIGUEZ, R. The zebrafish: a model to study the endogenous mechanisms of pain. *ILAR Journal*, 50(4): 373-385, 2009.

GOSS, G. G. et al. Gill morphology and acid-base regulation in freshwater fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 1998.

GOUVEIA JR, A.; MAXIMINO, C.; BRITO, T. M. Comportamento de peixes: Vantagens e utilidades nas neurociências. Faculdade de Ciências/UNESP. Bauru: SP, p. 80, 2006.

GRANT, G. C. RNA-DNA ratios in white muscle tissue biopsies reflect recent growth rates of adult Brown Trout. *Journal of Fish Biology*, v.48, p.1223-1230, 1996.

GRESSLER, L. T.; PARODI, T. V.; RIFFEL, A. P. K.; DA COSTA, S. T.; BALDISSEROTTO, B. Immersion anaesthesia with tricaine methanesulfonate or propofol on different sizes and strains of *Rhamdia quelen*. *Journal of Fish Biology*, v.81, p.1436-1445, 2012.

GRESSLER, L. T.; RIFFEL A. P. K., PARODI, T. V.; SACCOL, E. M. H.; KOAKOSKI, G.; DA COSTA, S. T.; PAVANATO, M. A.; HEINZMANN, B. M.; CARON, B.; SCHMIDT, D.; LLESUY, S. F.; BARCELLOS, L. J. G.; BALDISSEROTTO, B. Silver catfish *Rhamdia*

quelen immersion anaesthesia with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Hérit) Britton or tricaine methanesulfonate: effect on stress response and antioxidant status. *Aquaculture Research*, v. 45, p. 1061-1072, 2014.

GRESSLER, L. T.; SUTILI, F. J.; DA COSTA, S. T.; PARODI, T. V.; PÊS, T. S.; KOAKOSKI, G.; BARCELLOS, L. J. G.; BALDISSEROTTO, B. Hematological, morphological, biochemical and hydromineral responses in *Rhamdia quelen* sedated with propofol. *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 41, p.463-472, 2015.

GRESSLER, L. T.; SUTILI, F. J.; LOEBENS, L.; SACCOL, E. M. H.; PES, T. S.; PARODI, T. V.; DA COSTA, S. T.; PAVANATO, M. A.; BALDISSEROTTO, B. Histological and antioxidant responses in *Rhamdia quelen* sedated with propofol. *Aquaculture Research*, v.47, p. 2297-2306, 2016.

GROUP, W. H. O. W. *Ammonia*. *Environmental Health Criteria* , 54 (1986) 210 p, 1986.

HARVEY, B.; CAROLSFELD, J. *Induced breeding in tropical fish culture*. Ottawa: International Development Research Center, 144p., 1993.

GUSTINELLI, A.; MENCONI, V.; PREARO, M.; CAFFARA, M.; RIGHETTI, M.; SCANZIO, T.; RAGLIO, A.; FIORAVANTI, M. L. Prevalence of *Diphyllbothrium latum* (Cestoda: Diphyllbothriidae) plerocercoids in fish species from four Italian lakes and risk for the consumers. *International Journal of Food Microbiology*, v. 235, p. 109-112, 2016.

HÄRŞAN, R.; OGNEAN, L.; NICA, C. Light Influence on Chromatophores Activity in *Poecilia reticulata*. *Bull. Univ. Agric. Sci. Vet. Med. Cluj-Napoca. Vet. Med.* 71, 110–113, 2014.

HARMS, C. A.; BAKAL, R. S.; KHOO, L. H.; SPAULDING, K. A.; LEWBART, G. A. Microsurgical excision of an abdominal mass in a gourami. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.207, n.9, p.1215-1217, 1995.

HARMS, C.A.; KISHIMORI, J.; BOYLAN, S.; LEWBART, G. A.; SWANSON, C. Behavioral and clinical pathology changes in koi carp (*Cyprinus carpio*) subjected to anesthesia and surgery with and without peri-operative analgesics. *Comparative Medicine*, v.55, n.3, p.221-226, 2005.

HARMS, C. A.; LEWBART, G. A. The veterinarian's role in surgical implantation of electronic tags in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, v.21, p.25-33, 2011.

HAWKE, J. P.; MCWHORTER, A. C.; STEIGERWALT, A. G.; BRENNER, D. J. *Edwardsiella ictaluri* sp. nov., the causative agent of enteric septicemia of catfish. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 31, p. 396-400, 1981.

HERNANDEZ-DIVERS, S. T.; BAKAL, R. S.; HICKSON, B. H.; RAWLINGS, C. A.; WILSON, H. G.; RADLINSKY, M.; HERNANDEZ-DIVERS, S. M.; DOVER, S. R. Endoscopic sex determination and gonadal manipulation in Gulf of Mexico sturgeon (*Acipenser oxyrinchus desotoi*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v.35, n.4, p.459-470, 2004.

HILL, A., TERAOKA, H., HEIDEMAN, W., PETERSON, R. Zebrafish as a model vertebrate for Investigating Chemical Toxicity. *Toxicological Sciences*, 86, 6-19, 2005.

HINO, K. Mixing patterns and productivity of phytoplankton in a small artificial pond. *Ciência e Cultura*, v. 37, n. 8, p. 1331-40, 1985.

HOFFMANN, A. *A dor na perspectiva da evolução filogenética. Reflexões em torno da dor*. 1 ed., 169-196. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP: Ribeirão Preto, 2008

HOLM, J. C.; REFSTIE, T.; BO, S. The effect of fish density and feeding regimes on individual growth rate and mortality in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, Amsterdam, v. 89, p. 225-232, 1990.

- HUET, M. Tratado de Piscicultura. Mundi-Prensa, Madri, 1978.
- HUNTER, J.R. Feeding ecology and predation of marine fish larvae, in: Marine Fish Larvae: Morphology, Ecology and Relation to Fisheries; 1981.
- HUNTINGFORD, F. A.; LEANIZ, C. G. Social dominance, prior residence and acquisition of profitable feeding sites in juvenile Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology*, London, v. 51, n. 5, p. 1009-1014, 1997.
- HUNTINGFORD, F.A.; ADAMS, C.; BRAITHWAITE, V.A.; KADRI, S.; POTTINGER, T.G.; SANDØE, P.; TURNBULL, J.F. Current issues in fish welfare. *Journal of Fish Biology*, v.68, p.332-372, 2006.
- IDSO, S.B., GILBERT, R.G. On the Universality of the Poole and Atkins Secchi Disk-Light Extinction Equation. *J. Appl. Ecol.* 11, 399, 1974.
- ISRAELI-WEINSTEIN, D.; KIMMEL, E. Behavioral response of carp (*Cyprinus carpio*) to ammonia stress. *Aquaculture*, 1998.
- IWAMA, G. K.; VIJAYAN, M. M.; FORSYTH, R. B.; ACKERMAN, P. A. Heat shock proteins and physiological stress in fish. *American Zoologist*, v.39, p.901-909, 1999.
- JAFARI, N. G.; TRIVEDY, R. K.; FOROUTAN, A. Possible practical and environmental applications of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *Pollution Research*, 2006.
- JAVAHERY, S.; NEKOUBIN, H.; MORADLU, A. H. Effect of anaesthesia with clove oil in fish (review). *Fish Physiology and Biochemistry*, v.38, p.1545-1552, 2012.
- JOHANSEN, R.; NEEDHAM, J. R.; COLQUHOUN, D. J.; POPPE, T. T.; SMITH, A. J. Guidelines for health and welfare monitoring of fish used in research. *laboratory Animals*, v.40, p.323-340, 2006.
- KAFUKU, T. Changes in technique for hatching of eggs spawned in flow. *Int. J. Aq. Fish. Technol.*, 1: 99-108, 1989.
- KAMAISHI, T.; FUKUDA, Y.; NISHIYAMA, M.; KAWAKAMI, H.; MATSUYAMA, T.; YOSHINAGA, T.; OSEKO, N. Identification and pathogenicity of intracellular *Francisella* bacterium in three-line grunt *Parapristipoma trilineatum*. *Fish Pathology*, v. 40, p. 67-71, 2005.
- KARLSSON, A.; ROSSELAND, B. O.; MASSABUAU, J-C.; KIESSLING, A. Pre-anaesthetic metomidate sedation delays the stress response after caudal artery cannulation in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Fish Physiology and Biochemistry*, v.38, p.401-411, 2012.
- KELLEY, K. M. Experimental diabetes mellitus in a teleost fish. I. Effect of complete isletectomy and subsequent hormonal treatment on metabolism in the goby, *Gillichthys mirabilis*. *Endocrinology*, v.132, n.6, p.2689-2695, 1993.
- KIANG, J. G.; TSOKOS, G. C. Heat shock proteins 70kDa: Molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacology e Therapeutics*, v.80, p.183-201, 1998.
- KIESSLING, A.; JOHANSSON, D.; ZAHL, I. H.; SAMUELSEN, O. B. Pharmacokinetics, plasma cortisol and effectiveness of benzocaine, MS-222 and isoeugenol measured in individual dorsal aorta-cannulated Atlantic salmon (*Salmo salar*) following bath administration. *Aquaculture*, v.286, p.301-308, 2009.
- KING, W. V.; HOOPER, B.; HILLSGROVE, S.; BENTON, C.; BERLINSKY, D. The use of clove oil, metomidate, tricaine, methanesulphonate and 2-phenoxyethanol for inducing anaesthesia and their effect on the cortisol stress response in black sea bass (*Centropristis striata* L.). *Aquaculture Research*, v.36, p.1442-1449, 2005.
- KÖRNER, S. et al. The effect of pH variation at the ammonium/ammonia equilibrium in wastewater and its toxicity to *Lemna gibba*. *Aquatic Botany*, 2001.
- KRAMER, D. L. Dissolved oxygen and fish behavior *Environmental Biology of Fishes*, 1987.
- KUBITZA, F. Qualidade da água na produção de peixes. 3. ed Jundiaí: Degaspari. 97p, 1999.
- KUBITZA, F. Técnicas de transporte de peixes vivos. Degaspari, Jundiaí, 1999.

- LAZZARI, R.; RADÜNZ NETO, J.; CORRÊIA, V.; VEIVERBERG, C. A.; TAFFAREL BERGAMIN, G.; EMANUELLI, T.; PORTES RIBEIRO, C. Densidade de estocagem no crescimento, composição e perfil lipídico corporal do jundiá. *Ciência Rural*, v. 41, n. 4, 2011.
- LEMBI, C. A. Limnology, Lake and River Ecosystems. *Journal of Phycology*, 2001.
- LEWBART, G. A.; HARMS, C. Building a fish anesthesia delivery system. *Exotic DVM*, v.1, p.25-28, 1999.
- LEWBART, G. A.; SPODNICK, G.; BARLOW, N.; LOVE, N. E.; GEOLY, F.; BAKAL, R. S. Surgical removal of an undifferentiated abdominal sarcoma from a koi carp (*Cyprinus carpio*). *Veterinary Record*, v.143, p.556-558, 1998.
- LI, L. et al. Ammonium stability and nitrogen isotope fractionations for NH₄⁺-NH₃(aq)-NH₃(gas) systems at 20-70°C and pH of 2-13: Applications to habitability and nitrogen cycling in low-temperature hydrothermal systems. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2012.
- LIKENS, G. E.; HARRIS, G. Salinity. In: *Encyclopedia of Inland Waters*. [s.l: s.n.].
- LIO-PO, G. D.; ALBRIGHT, L. J.; LEANO, E. M. Experiments on virulence dose and portals of entry for *Aeromonas hydrophila* in walking catfish. *Journal of Aquatic Animal Health*, v. 8, p. 340-343, 1996.
- LOGAN, D.W., BURN, S.F., JACKSON, I.J Regulation of pigmentation in zebrafish melanophores. *Pigment Cell Res.*, 2006.
- LOGATO, P. V. R. Nutrição e alimentação de peixes de água doce. Editorial Emerson de Assis Viera, Viçosa: Aprenda Fácil. 2000. 128p.
- MACINTYRE, C. M.; ELLIS, T.; NORTH, B. P.; TURNBULL, J. F. The Influences of Water Quality on the Welfare of Farmed Rainbow Trout: a Review In: BRANSON, E. J. (Org.). *Fish Welfare*. Oxford: Blackwell Publishing, p. 150-184; 2008.
- MACLEAN, A.; METCALFE, N. B. Social status, access to food, and compensatory growth in the juvenile Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology*, London, v. 58, n. 5, p. 1331-1346, 2001.
- MAFTUCH, M.; SANOESI, E.; FARICHIN, I.; SAPUTRA, B. A.; RAMDHANI, L.; HIDAYATI, S.; FITRIYAH, N.; PRIHANTO, A. A. Histopathology of gill, muscle, intestine, kidney, and liver on *Myxobolus* sp.-infected Koi carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Parasitic Diseases*, v. 42, p. 137-143, 2018.
- MAINARDES-PINTO, C.S.R. *et al.* Viability of Thailand tilapia, *Oreochromis niloticus* culture raised in small volume net cages placed in populated ponds. In: *WORLD AQUACULTURE*, Salvador, Bahia, BA. Book of Abstracts... Salvador: WAS, 2003. p.442, 2003.
- MATSCHE, M. A.; BAKAL, R. S.; ROSEMARY, K. M. Use of laparoscopy to determine sex and reproductive status of shortnose sturgeon (*Acipenser brevirostrum*) and Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus oxyrinchus*). *Journal of Applied Ichthyology*, v.27, p.627-636, 2011.
- MARTINS, M. L; SOUZA, V. N.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R. Gill infection of *Leporinus macrocephalus* Garavello & Britski, 1988 (Osteichthyes: Anostomidae) by *Henneguya leporinicola* n. sp. (Myxozoa: Myxobolidae). Description, histopathology and treatment. *Revista Brasileira de Biologia*, v. 59, p. 527-534, 1999.
- MATTHEWS, M., TREVARROW, B., MATTHEWS, J. A virtual tour of the guide for zebrafish users. *Lab Anim.* (NY). doi:10.1038/5000140, 2002.
- MATUSHIMA, E. R. Técnicas Necroscópicas. In: Cubas, Z. S.; Silva, J. C. R.; Catão- Dias, J. L. *Tratado de Animais Selvagens*. São Paulo: Roca, Cap. 61, p.980-990, 2006.

- MAXIMINO, C., MARQUES DE BRITO, T., DE MATTOS DIAS, C.A.G., GOUVEIA, A., MORATO, S. Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. *Nat. Protoc.* 2010.
- MCCLESKEY, R. B.; KIRK NORDSTROM, D.; RYAN, J. N. Electrical conductivity method for natural waters. *Applied Geochemistry*, 2011.
- MCLEAN, E.; ASH, R. Chronic cannulation of the hepatic portal vein in rainbow trout, *salmo gairdneri*: a prerequisite to net absorption studies. *Aquaculture*, v.78, p.195-205, 1989.
- MEADE, J. W. Allowable Ammonia for Fish Culture. *The Progressive Fish-Culturist*, 1985.
- MELLOR, D.J. A. Updating Animal Welfare Thinking: Moving beyond the “Five Freedoms” towards “A Life Worth Living”. *Animals* 6(3): 21, 2016.
- MEYER, F. P.; ROBINSON, J. A. Branchiomycosis: A new fungal disease of North American fishes. *The Progressive Fish-Culturist*, v. 35, p. 74-77, 1973.
- MIAN, G. F.; GODOY, D. T.; LEAL, C. A. G.; YUHARA, T. Y.; COSTA, G. M.; FIGUEIREDO, H. C. P. Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. *Veterinary Microbiology*, v. 136, p. 180-183, 2009.
- MILLSOPP, S.; LAMING, P. Trade-offs between feeding and shock avoidance in goldfish (*Carassius auratus*). *Applied Animal Behaviour Science*, 113:247-254,2007.
- MOLENTO, C. F. M.. Senciência Animal. *Revista do Conselho Regional de Medicina Veterinária*, Curitiba, v. 16, p. 18-18, 2005.
- MONFORT, P. et al. Molecular mechanism of acute ammonia toxicity: Role of NMDA receptors. *Neurochemistry International*, 2002.
- MORAIS-FILHO, M.B.; SCHUBART, O. Contribuição ao estudo do dourado (*Salminus maxillosus* Val.) do rio Mogi Guassu (Pisces, Characidae). EGRT-Ministério da Agricultura-Divisão de Caça e Pesca. São Paulo, SP, 1955.
- MORAN, D.; WELLS, R. M. G.; PETHER, S. J. Low stress response exhibited by juvenile yellowtail kingfish (*Seriola lalandi* Valenciennes) exposed to hypercapnic conditions associated with transportation. *Aquaculture Research*, v. 39, p. 1399-1407, 2008.
- MOREIRA, H. L. M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R. P.; ZIMMERMANN, S. Fundamentos da moderna aquicultura. Canoas: Ulbra, 2001.
- MORIMOTO, R. I.; KROEGER, P. E.; COTTO, J. J. 1990. The transcriptional regulation of heat shock genes: A plethora of heat shock factors and regulatory conditions. In: Feige, U.; Morimoto, R. I.; Yahara, I.; Polla, B. S. *Stress-inducible cellular responses*. Basel: Birkhauser, p.139-164, 1996.
- MURRAY, M. J. Fish Surgery. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, v.11, n.4, p.246-257, 2002.
- MURRAY, M. J. Endoscopy in sharks. *Veterinary Clinic of Exotic Animal*, v.13, p.301-313, 2010.
- NASCIMENTO, T. S. R.; BOIJINK, C. DE L. .; PÁDUA, D. M. C. Efeito do pH da água no equilíbrio iônico de alevinos de *Piaractus mesopotamicus*. 2007 Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/115054/1/QAGUA-06.pdf>>
- NAVARRO, F.K.S.P., NAVARRO, R.D., MURGAS, L.D.S., FELIZARDO, V. DE O. Effect of photoperiod stress assessment and locomotor activity of female lambari (*Astyanax bimaculatu*). *Ciência e Agrotecnologia* 38, 173–180, 2014.
- NEIFFER, D. L.; STAMPER, M. A. Fish sedation, anaesthesia, analgesia, and euthanasia: considerations, methods, and types of drugs. *Institute for Laboratory Animal Research Journal*, v.50, n.4, p.343-360, 2009.
- NELSON, J. S. *Fishes of the world*. 4ª Ed. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 622 p. 2006.

NEWBY, N.C.; GAMPERL, A.K.; STEVENS, E.D. Cardiorespiratory effects and efficacy of morphine sulfate in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *American Journal of Veterinary Research*, 68: 592–597, 2007.

NEWBY, N.C.; STEVENS, E.D. The effects of the acetic acid “pain” test on feeding, swimming, and respiratory responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Applied Animal Behaviour Science*, 114-260-269, 2008.

NORDGREEN, J.; HORSBERG, T.E.; RANHEIM, B.; CHEN, A.C.N. Somatosensory evoked potentials in the telencephalon of Atlantic salmon (*Salmo salar*) following galvanic stimulation of the tail. *Journal of Comparative Physiology A*, v. 193, p.1235-1242, 2007.

NORDGREEN J.; GARNER, J. P.; JANCZAK, A. M.; RANHEIM, B.; MUIR, W. M.; HORSBERG, T. E. Thermonociception in fish: effects of two different doses of morphine on thermal threshold and post-test behaviour in goldfish (*Carassius auratus*). *Applied Animal Behaviour Science*, v.119, p.101-107, 2009.

OIE - World Organization for Animal Health. Infectious haematopoietic necrosis. *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*, Chapter 2.3.4, p. 1-16, 2017.

OIE - World Organization for Animal Health. Listed diseases, infections and infestations in force in 2018. Disponível em: <<http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2018/>>. Acesso em: 25 abr. 2018.

O’GORMAN, E. J. et al. Temperature effects on fish production across a natural thermal gradient. *Global Change Biology*, 2016.

PACKER, R. K.; DUNSON, W. A. Anoxia and sodium loss associated with the death of brook trout at low pH. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology*, 1972.

PARAGAMIAN, V.; BEAMESDERFER, R.; IRELAND, S. Status, population dynamics, and future prospects of the endangered Kootenai River white sturgeon population with and without hatchery intervention. *Transactions of the American Fisheries Society*, v.134, p.518-532, 2005.

PEELER, E. J.; GARDINER, R.; THRUSH, M. A. Qualitative risk assessment of routes of transmission of the exotic fish parasite *Gyrodactylus salaris* between river catchments in England and Wales. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 64, p. 175-189, 2004.

PENNISI, E. Blind cave fish may provide insights into human health. *Science* 352 (6293), p. 1502-1503, 2016.

PEREIRA, F. A. Cultivo de peixes. – Brasília, DF : Embrapa Informação Tecnológica: il. – (ABC da Agricultura Familiar, 8), p. 19, 2006.

PÉREZ, L. E.; MARTINO, G.; RAVELO, C.V. An intensive *Colossoma macropomum* fry rearing method. 1st Interamerican Congress of Aquiculture. Salvador, BA. p. 44, 1986.

PIGNATELLI, V., CHAMP, C., MARSHALL, J., VOROBYEV, M. Double cones are used for colour discrimination in the reef fish, *Rhinecanthus aculeatus*. *Biol. Lett.*, 2010.

PITCHER, T. J.; PARRISH, J. K. Functions of shoaling behaviour in teleosts. In: Pitcher, T. J. *The behaviour of teleost fishes*. Sydney: Springer, 1993, p.337-364.

POPOVIC, N. T.; STRUNJAK-PEROVIC, I.; COZ-RAKOVAC, R.; BARISIC, J.; JADAN M.; BERAKOVIC, A. P.; KLOBUCAR, R. S. Tricaine methane-sulfonate (MS-222) application in fish anaesthesia. *Journal of Applied Ichthyology*, v. 28, p. 553-564, 2012.

PORTAVELLA, M.; VARGAS, J.P.; TORRES, B.; SALAS, C. The effects of telencephalic pallial lesions on spatial, temporal, and emotional learning in goldfish. *Brain Research Bulletin*, 57: 397–399, 2002.

- PORTAVELLA, M.; TORRES, B.; SALAS, C. Avoidance response in goldfish: emotional and temporal involvement of medial and lateral telencephalic pallium. *Journal of Neuroscience*, 24: 2335–2342, 2004.
- PORTER, K. G. The plant-animal interface in freshwater ecosystems. *American Scientist*, v. 65, n. 2, p. 159-170, 1977.
- QUEIROZ, J. F. Boas práticas aquícolas (BPA) em viveiros garantem sucesso da produção. Embrapa Meio Ambiente-Artigo em periódico indexado (ALICE), *Visão Agrícola* n. 11, p. 36-39, 2012.
- RAHIMIAN, H.; THULIN, J. Epizootiology of *Ichthyophonus hoferi* in herring populations off the Swedish west coast. *Diseases of Aquatic Organisms*, v. 27, p. 187-195, 1996.
- RAJESWARI, M.V., RAJASREE, S.R.R., BALASUBRAMANIAN, T. Effect of Light Levels on Growth, Survival and Skin Colour Enhancement of Marine Angelfish, *Apolemichthys xanthurus* (Bennett, 1833). *Turkish J. Fish. Aquat. Sci.* 17, 2017.
- RANDALL, D. J.; LIN, H. Effects of Variations in Water pH on Fish. In: LAHLOU, B.; VITIELLO, P. (Org.). *Aquaculture: Fundamental and Applied Research*. Washington: American Geophysical Union, 1993.
- RANDALL, D. J.; TSUI, T. K. N. Ammonia toxicity in fish. *Marine Pollution Bulletin*. Anais. 2002
- RANDLER, C., RAHAFAR, A. Latitude affects Morningness-Eveningness: evidence for the environment hypothesis based on a systematic review. *Sci. Rep.* 7, 39976, 2017.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T.; DE PÁDUA, S. B.; TAVARES-DIAS, M.; EGAMI, A. I. Métodos para análise hematológica em peixes. Maringá: Eduem, 120 p., 2013.
- REILLY, S.C.; QUINN, J.P.; COSSINS, A.R.; SNEDDON, L.U. Behavioural analysis of a nociceptive event in fish: Comparisons between three species demonstrate specific responses. *Applied Animal Behaviour Science*, 114: 248-259, 2008.
- REINHARDT, V. Common husbandry-related variables in biomedical research with animals. *Laboratory Animals*, v.38, p.213–235, 2004.
- REIS, A. B. et al. Alterações do epitélio branquial e das lamelas de tilápias (*Oreochromis niloticus*) causadas por mudanças do ambiente aquático em tanques de cultivo intensivo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 2009.
- REYNALTE-TATAJE, D. A.; ESQUIVEL, B. M.; ESQUIVEL, J. R.; ZANIBONI-FILHO, E. Reproducción inducida del piaçu, *Leporinus macrocephalus* GARAVELLO y BRITSKI, 1988 (Characiformes, Anostomidae). *Boletim do Instituto da Pesca*, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 11-18, 2002.
- REYNALTE-TATAJE, D. A.; LOPES, C. A.; ÁVILA-SIMAS, S.; GARCIA, J. R. E.; ZANIBONI-FILHO, E. Artificial reproduction of neotropical fish: Extrusion or natural spawning?. *Natural Science (Print)*, v. 05, p. 1-6, 2013.
- REYNALTE-TATAJE, D. A.; BALDISSEROTTO, B.; ZANIBONI-FILHO, E. The effect of water pH on the incubation and larviculture of curimatá *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1837) (Characiformes: Prochilodontidae). *Neotropical Ichthyology*, 2015.
- RIBEIRO, P. A. P.; GOMIERO, J. S. G.; LOGATO, P. V. R. Manejo alimentar de peixes. *Boletim de extensão* nº 98, Universidade Federal de Lavras, 2002. 17p.
- RINK, E.; WULLIMANN, M.F. Connections of the ventral telencephalon (subpallium) in the zebrafish (*Danio rerio*). *Brain Research*, v.1011, p.206-220, 2004.
- ROBERTS, H. E. Anesthesia, analgesia, and euthanasia. In: Roberts HE. *Fundamentals of ornamental fish health*. Ames (IA): Blackwell Publishing, 2010. 169 p.
- RODRIGUES, A. P. O.; LIMA, A. F.; ALVES, A. L.; ROSA, D. K.; TORATI, L. S.; DOS SANTOS, V. R. V. *Piscicultura de água doce: multiplicando conhecimentos*. Brasília, DF: Embrapa, 2013. 440 p.

ROQUES, J.A.C.; ABBINK, W.; GEURDS, F. van de VIS, H.; FLIK, G. Tailfin clipping, a painful procedure: studies on Nile tilapia and common carp. *Physiology and Behavior*, 101: 533-540, 2010.

ROSE, D. J. The neurobehavioral nature of fishes and the question of awareness and pain. *Review in Fisheries Science*, 10: 1-38, 2002.

ROSS, L. G.; ROSS, B. *Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals*. 3 ed. Oxford: Blackwell Publishing, 222 p., 2008.

ROTH, G. The evolution of consciousness. Pp. 555–582 in *Brain Evolution and Cognition*, G. Roth and M. F. Wullimann, eds. John Wiley, New York, 2001.

RUSSELL, W. M. S. AND BURCH, R. L. *The Principles of Humane Experimental Technique*. London: Methuen, 1959.

SACCOL, E. M. H.; UCZAY, J.; PÊS, T.; FINAMOR, I. A.; OURIQUE, G. M.; RIFFEL, A. P. K.; SCHMIDT, D.; CARON, B. O.; HEINZMANN, B. M.; LLESUY, S. F.; LAZZARI, R.; BALDISSEROTTO, B.; PAVANATO, M. A. Addition of *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown essential oil to the diet of the silver catfish: an analysis of growth, metabolic and blood parameters and the antioxidant response. *Aquaculture*, v.416-417, p.244-254, 2013.

SALBEGO, J.; SIMÕES, L.N.; BALDISSEROTTO, B. Aditivos no transporte de animais aquáticos. pp.539-568 In: Baldisserotto, B.; Gomes, L.C.; Heinzmann, B.M.; Cunha, M.A. (eds.). *Farmacologia aplicada à aquicultura*. EDUFMS, 2017.

SALVANES, A. G. V.; MOBERG, O.; EBBESSON, L. O. E.; NILSEN, T. O.; JENSEN, K. H.; BRAITHWAITE, V. A. Environmental enrichment promotes neural plasticity and cognitive ability in fish. *Proceedings of the Royal Society B*, v.280, 20131331, 2013.

SANTACROCE, M. P.; CONVERSANO, M. C.; CASALINO, E.; LAI, O.; ZIZZADORO, C.; CENTODUCATI, G.; CRESCENZO, G. Aflatoxins in aquatic species: metabolism, toxicity and perspectives. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, v. 18, p. 99-130, 2008.

SATO, Y. *Reprodução de peixes da bacia do Rio São Francisco: indução e caracterização de padrões*. Tese - Universidade Federal de São Carlos, 1999.

SCHIMITTOU, H. R. *Produção de peixes em alta densidade em tanques-rede de pequeno volume*. Campinas: Associação Americana de Soja/Mogiana Alimentos, 1993. p. 78.

SCHNEIDER, A. C. R.; SANTOS, J. L. D.; PORAWSKI, M.; SCHAEFER, P. G.; MAURER, R. L.; MATTE, U. D. S.; SILVEIRA, T. R. D. Implementação de um novo modelo de experimentação animal: zebrafish. *Revista HCPA*. Vol. 29, n. 2, p. 100-103, 2009.

SCHOETTGER, R.A.; JULIN, A.M. Efficacy of MS-222 as an anaesthetic on four salmonids. *Investigation of Fisheries Contribution*, U.S. Department of Interior, v.13, p.1-15, 1967.

SCHRECK, C. B.; OLLA, B. L.; DAVIS, M. W. Behavioral responses to stress. In: Iwama, G. K.; Pickering, A. D.; Sumpter; J. P. Schreck, C. B. *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Cambridge: Cambridge University Press, p.119-144, 1997.

SCHRECK, C. B. Stress and fish reproduction: The roles of allostasis and hormesis. *General Comparative Endocrinology*, v.165, p. 549–556, 2010.

SEBASTIÃO, F. A.; FURLAN, L. R.; HASHIMOTO, D. T.; PILARSKI, F. Identification of bacterial fish pathogens in Brazil by direct colony PCR and 16S rRNA gene sequencing. *Advances in Microbiology*, v. 5, p. 409-424, 2015.

SHAFFI, S. A. Ammonia toxicity: Metabolic disorder in nine freshwater teleosts. *Toxicology Letters*, 1980.

SHAHAROM-HARRISON, F. M.; ANDERSON, I. G.; SITI, A. Z.; SHAZILI, N. A. M.; ANG, K. J.; AZMI, T. I. Epizootics of Malaysian cultured freshwater pond fishes by

Piscinoodinium pillulare (Schaperclaus 1954) Lom 1981. *Aquaculture*, v. 86, p. 127-138, 1990.

SHENG, L.; XU, J. Effects of Thermal Shock on Some Freshwater Fishes 2008 2nd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering. *Anais...IEEE*, maio 2008 Disponível em: <<http://ieeexplore.ieee.org/document/4535173/>>

SHIMIZU, A., AIDA, K., HANYU, I. Effects of photoperiod and temperature on gonadal activity and plasma steroid levels in an autumn-spawning bitterling, *Acheilognathus rhombea*, during different phases of its annual reproductive cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.* 93, 137–50, 1994.

SILVA, A. L. N.; SIQUEIRA, A. T. *Piscicultura em tanques-rede: princípios básicos*. Recife: Sudene/Imprensa Universitária da UFRPE, p. 72; 1997.

SILVA, A. S.; MONTEIRO, S. G.; DOYLE, R. L.; PEDRON, F. A.; FILIPETTO, J. E. S.; RADÜNZ NETO, J. *Clinostomum complanatum* occurrence in different fishes species from a farming of the municipal of Santa Maria - RS. *Veterinária e Zootecnia*, v. 15, p. 27-32, 2008.

SIMÕES, S. B. E.; BARBOSA, H. S.; SANTOS, C. P. The life cycle of *Ascocotyle (Phagicola) longa* (Digenea: Heterophyidae), a causative agent of fish-borne trematodosis. *Acta Tropica*, v. 113, p. 226-233, 2010.

SIMON DA SILVEIRA, U. et al. Fatores estressantes em peixes. *Revista Eletrônica Nutritime*, 2009.

SMAIL, D. A. Isolation and identification of Viral Haemorrhagic Septicaemia (VHS) viruses from cod *Gadus morhua* with the ulcus syndrome and from haddock *Melanogrammus aeglefinus* having skin haemorrhages in the North Sea. *Diseases of Aquatic Organisms*, v. 41, p. 231-235, 2000.

SMITH, D.W., PIEDRAHITA, R.H. The relation between phytoplankton and dissolved oxygen in fish ponds. *Aquaculture*, 1988.

SMITH, J.M., CHAVEZ, F.P., FRANCIS, C.A. Ammonium uptake by phytoplankton regulates nitrification in the sunlit ocean. *PLoS One*, 2014.

SNEDDON, L.U. Anatomical and electrophysiological analysis of the trigeminal nerve in a teleost fish, *Oncorhynchus mykiss*. *Neuroscience Letters*, 319(3): 167-171, 2002.

SNEDDON, L. U. The evidence for pain perception in fish: the use of morphine as an analgesic. *Applied Animal Behaviour Science*, 83: 153-162, 2003a.

SNEDDON, L. U. Trigeminal somatosensory innervation of the head of the rainbow trout with particular reference to nociception. *Brain Research*, 972: 44-52, 2003b.

SNEDDON, L. U.; BRAITHWAITE, V. A.; Gentle, J. M. Do fish have nociceptors: evidence for the evolution of a vertebrate sensory system. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 270: 115-1122, 2003c.

SNEDDON, L. U. Clinical anesthesia and analgesia in fish. *Journal of Exotic Pet Medicine*, v.21, p.32-43, 2012.

SNEDDON, L. U. Pain in aquatic animals. *Journal of Experimental Biology*, v. 218, p.967-976, 2015.

SOSO, A. B.; BARCELLOS, L. J. G.; RANZANI-PAIVA, M. J.; KREUTZ, L. C.; QUEVEDO, R. M.; LIMA, M.; BOLOGNESI-SILVA, L.; RITTER, F.; BEDIN, A. C.; FINCO, J. A. The effects of stressful broodstock handling on hormonal profiles and

reproductive performance of *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard) females. *Journal of the World Aquaculture Society*, v. 39, p. 835–841, 2008.

SPANIER, E., LAVALLI, K.L., EDELIST, D. Artificial reefs for lobsters. An overview of their application for fisheries enhancement, management and conservation, 2011, in: *Artificial Reefs in Fisheries Management*.

SPENCE, R., GERLACH, G., LAWRENCE, C., SMITH, C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 83, 13–34, 2008.

SPRINGATE, J.R.C.; BROMAGE, N.R.; ELLIOTT, J.A.K.; HUDSON, D.L. The timing of ovulation and stripping and the effects on the rates of fertilization and survival to eying, hatch and swim-up in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* L.). *Aquaculture* 43: 313-322, 1984.

STRAND, D. A.; UTNE-PALM, A. C.; JAKOBSEN, P. J.; BRAITHWAITE, V. A.; JENSEN, K. H.; SALVANES, A. G. V. Enrichment promotes learning in fish. *Marine Ecology Progress Series*, v.412, p.273-282, 2010.

STREISINGER, G., WALKER, C., DOWER, N., KNAUBER, D. & SINGER, F. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*brachydanio rerio*). *Nature*. 291, 293–296, 1981.

SUÁREZ, I.; BODEGA, G.; FERNÁNDEZ, B. Glutamine synthetase in brain: Effect of ammonia. *Neurochemistry International*, 2002.

SUGIMOTO, M. Morphological color changes in fish: Regulation of pigment cell density and morphology. *Microsc. Res. Tech.* doi:10.1002/jemt.10168, 2002.

SUTILI, F. J.; GRESSLER, L. T.; VARGAS, A. C.; ZEPPEFELD, C. C.; BALDISSEROTTO, B.; CUNHA, M. A. The use of nitazoxanide against the pathogens *Ichthyophthirius multifiliis* and *Aeromonas hydrophila* in silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Veterinary Parasitology*, v.197, p.522-526, 2013.

SUTILI, F. J.; GRESSLER, L. T.; BALDISSEROTTO, B. Clove Oil, eugenol effective anesthetics for silver catfish, other Brazilian species. *The Global Aquaculture Advocate*, May/June 2014.

TACHIBANA, L.; LEONARDO, A. F. G.; CORRÊA, C. F.; SAES, L. A. Densidade de estocagem de pós-larvas de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) durante a fase de reversão sexual. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 34, n. 4, p. 483-488, 2008.

TAYLOR, J., MIGAUD, H. Timing and duration of constant light affects rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) growth during autumn-spring grow-out in freshwater. *Aquac. Res.* doi:10.1111/j.1365-2109.2009.02260.x., 2009.

TODD, J.; JOSEPHSON, B. The design of living technologies for waste treatment. *Ecological Engineering*, 1996.

TONI, C.; BECKER, A.G. ; SIMÕES, L. N.; PINHEIRO, C. G.; SILVA, L.; HEINZMANN, B. M.; Caron, B. O.; Baldisserotto, B. Fish anesthesia: effects of the essential oils of *Hesperozygis ringens* and *Lippia alba* on the biochemistry and physiology of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Fish Physiology and Biochemistry*, v.40, p.701-714, 2014.

URBINATI, E. C.; ZANUZZO, F. S.; SERRA, M.; WOLKERS, C. P. B.; SABIONI, R. E. Avanços da fisiologia do estresse e suas implicações em espécies nativas. In: Tavares-Dias, M.; Mariano, W. S. *Aquicultura no Brasil: novas Perspectivas*. São Carlos: Editora Pedro e João, p.381-416, 2015.

VAN WEST, P. *Saprolegnia parasitica*, an oomycete pathogen with a fishy appetite: new challenges for an old problem. *Mycologist*, v. 20, p. 99-104, 2006.

VAZZOLER, A.E.A.M. *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: Teoria e prática*. Maringá:EDUEM, 1996. 169p.

VELASCO, E. M. F.; LAW, P. Y.; RODRIGUEZ, R. E. Mu opioid receptor from the zebrafish exhibits functional characteristics as those of mammalian Mu opioid receptor. *Zebrafish*, v.6, p.259-268, 2009.

- VELISEK, J.; WLASOW, T.; GOMULKA, P.; SVOBODOVA, Z.; NOVOTNY, L. Effects of 2- phenoxyethanol anaesthesia on sheatfish (*Silurus glanis* L.). *Veterinari Medicina*, v.52, p.103-110, 2007.
- VOLPATO, G. L.; GONÇALVES-DE-FREITAS, E. e FERNANDES-DE-CASTILHO, M. Insights into the concept of fish welfare. *Diseases of Aquatic Organisms* 75 (2): 165-171, 2007.
- WAGNER, E.; ARNDT, R.; HILTON, B. Physiological stress responses, egg survival and sperm motility for rainbow trout broodstock anesthetized with clove oil, tricaine methanesulfonate or carbon dioxide. *Aquaculture*, v. 211, p. 353–366, [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00878-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00878-X), 2002.
- WAICHEIM, M. A.; BLASETTI, G.; CORDERO, P.; RAUQUE, C. A.; VIOZZI, G. P. The invasive copepod *Lernaea cyprinacea* Linnaeus, 1758 (Copepoda, Cyclopoida, Lernaeidae): first record for Neuquén River, Patagonia, Argentina. *Check List*, v. 13, p. 997-1001, 2017.
- WALLACE, J. C.; KOLBEINSHAVN, A. G.; REINSNES, T. The effects of stocking density on early growth in Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.). *Aquaculture*, Amsterdam, v. 73, p. 101-110, 1988.
- WALSH, W.A.; SWANSON, C.; LEE, C.S.; BANNO, J.E.; EDA, H. Oxygen consumption by eggs and larvae of striped mullet, *Mugil cephalus* in relation to development, salinity and temperature. *J. Fish . Biol.*, 35: 347-358. 1989.
- WEBB, M.; ERICKSON, D. Reproductive structure of the adult green sturgeon, *Acipenser medirostris*, population in the Rogue River, Oregon. *Environmental Biology of Fishes*, v.79, p.305-314, 2007.
- WEBER, E. S.; WEISSE, C.; SCHWARZ, T.; INNI, C.; KLIDE, A. M. Anesthesia, diagnostic imaging, and surgery of fish. *Compendium: Continuing Education for Veterinarians*, v.31, n.2, E1–9 Online, 2009.
- WEBER, E. S. 3rd. Fish Analgesia: Pain, Stress, Fear Aversion, or Nociception? *Veterinary Clinic of Exotic Animal*, v.14, p.21-32, 2011.
- WELLS, R. M. G.; TETENS, V.; DEVRIES, A. L. Recovery from stress following capture and anaesthesia of Antarctic fish: haematology and blood chemistry. *Journal of Fish Biology*, v.25, p.567-576, 1984.
- WENDELAAR BONGA, S. E. The stress response in fish. *Physiological Reviews*, v.77, p.591-625, 1997.
- WHITEAR, M. The free nerve endings in fish epidermis. *Journal of Zoology (London)*,v.163, p. 231–236, 1971.
- WILDGOOSE, W. H. Fish surgery: an overview. *Fish Veterinary Journal*, n.5, p.22-36, 2000.
- WILKIE, M. P. Mechanisms of ammonia excretion across fish gills *Comparative Biochemistry and Physiology - A Physiology*, 1997.
- WILLIAMS, T. D.; READMAN, G. D.; OWEN, S. F. Key issues concerning environmental enrichment for laboratory-held fish species. *Laboratory Animals*, v. 43, p.107–120, 2009.
- WOLFF, L. L.; DONATTI, L. Estudo do comportamento do peixe de água doce *Phalloceros harpagos* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) submetido à alteração artificial do pH. *Luminária*, v. 18, n. 1, p. 10–21, 2016.
- WOLKERS, C. P. B.; JUNIOR, A. B.; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L.; HOFFMANN, A. Stress-induced antinociception in fish reversed by naloxone. *PLoS One*, v.8, n.7, e71175, 2013.
- WOLKERS, C.P.B., BARBOSA JUNIOR A., MENESCAL-DE-OLIVEIRA L., HOFFMANN A. Acute administration of a cannabinoid CB1 receptor antagonist impairs stress-induced antinociception in fish. *Physiology and Behavior*, v.142, p.37-41, 2015a.

WOLKERS, C.P.B., BARBOSA JUNIOR A., MENESCAL-DE-OLIVEIRA L., HOFFMANN A. GABAA-benzodiazepine receptors in the dorsomedial (Dm) telencephalon modulate restraint-induced antinociception in the fish *Leporinus macrocephalus*. *Physiology and Behavior*, v.147, p.175-182, 2015b.

WOOD, C.M.; PATRICK, M. L. Methods of Assessing Kidney and Urinary Bladder Function in Fish. In: Hochachka, P.W.; Mommsen, T. P. *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. Amsterdam: Elsevier, Cap. 12, p.127-143, 1994.

WOOSTER, G. A; HSU, H-M.; BOWSER, P. R. Nonlethal surgical procedures for obtaining tissue samples for fish health inspections. *Journal of Aquatic Animal Health*, v.5, p.157-164, 1993.

WOOTTON, R.J. *Ecology of teleost fishes*. London-New York, Chapman and Hall. 404p.; 1990.

WOYNAROVICH, E. Tambaqui e Pirapitinga - Propagação artificial e produção de alevinos. CODEVASF, Brasília. 1986.

WOYNAROVICH, E.; HORVÁTH, L. A propagação artificial de peixe de águas tropicais: manual de extensão. FAO/CODEVASF/CNPq, Brasília, DF. 220 p., 1983.

WURTS, W. A. Why can some fish live in freshwater, some in salt water, and some in both? *World Aquaculture*, 1998.

YANONG, R. P. E. Peixes de Aquário. In: AGUILAR, R.; HERNÁNDEZ-DIVERS, S. M.; HERNÁNDEZ-DIVERS, S. J. *Atlas de Medicina, Terapêutica e Patologia de Animais Exóticos*. São Caetano do Sul: Interbook, Cap. 4, p.81-111, 2006.

YOSHIZAWA, M., ROBINSON, B. G., DUBOUÉ, E. R., MASEK, P., JAGGARD, J. B., O'QUIN, K. O., BOROWSKY, R. L., JEFFERY, W. R. AND KEENE, A. C. Distinct genetic architecture underlies the emergence of sleep loss and prey-seeking behavior in the Mexican cavefish. *BMC Biology*, p. 13:15, 2015.

ZAHL, I. H.; KIESSLING, A.; SAMUELSEN, O. B.; OLSEN, R. E. Anaesthesia induces stress in Atlantic salmon (*Salmo salar*), Atlantic cod (*Gadus morhua*) and Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, v.36, p.719-730, 2010.

ZAHL, I. H.; SAMUELSEN, O. B.; KIESSLING, A. Anaesthesia of farmed fish: implications for welfare. *Fish Physiology and Biochemistry*, v.38, p.201-218, 2012.

ZAIONS, M.I.; BALDISSEROTTO, B. Na⁺ and K⁺ body levels and survival of fingerlings of *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Pimelodidae) exposed to acute changes of water pH. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 30, n. 6, p.1041-1045, 2000.

ZANIBONI-FILHO, E. Incubação, larvicultura e alevinagem do tambaqui (*Colossoma acropomum* CUVIER 1818), 202 p. ;1992.

ZANIBONI-FILHO, E.: BARBOSA, N.D.C. Priming hormone administration to induce spawning of some Brazilian migratory fish. *Revista Brasileira de Biologia* 56 (4): 655-659. 1996.

ZANIBONI-FILHO, E. Larvicultura de peixes de água doce. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, 21(203): 69-77. 2000

ZANIBONI-FILHO, E.; MEURER, S.; GOLOMBIESKI, J. I.; SILVA, L. V. F.; BALDISSEROTTO, B. Survival of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes) fingerlings exposed to acute pH changes. *Acta Scientiarum*, v. 24, n. 4, p. 917-920, 2002.

ZANIBONI-FILHO, E.; NUÑER, A.P.O. Fisiologia da reprodução e propagação artificial dos peixes. In: Cyrino, J.E.P.; Urbinati, E.C.; Fracalossi, D.M.; Castagnolli, N. (Org.). *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva*. São Paulo, SP, p. 45-73, 2004.

ZANUZZO, F. S.; ZAIDEN, S. F.; SENHORINI, J. A.; MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; URBINATI, E. C. Aloe vera bathing improved physical and humoral protection in breeding stock after induced spawning in matrinxã (*Brycon amazonicus*). *Fish e Shellfish Immunology*, v.45, p.132-140, 2015.

- ZERAIK, V. M.; BELÃO, T. C.; FLORINDO, L. H.; KALININ, A. L.; RANTIN, F. T. Branchial O₂ chemoreceptors in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: Control of cardiorespiratory function in response to hypoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, v. 166, p. 17-25, 2013.
- ZHENG, J.-L., YUAN, S.-S., LI, W.-Y., WU, C.-W. Positive and negative innate immune responses in zebrafish under light emitting diodes conditions. *Fish Shellfish Immunol.*
- ZINABU, G. M.; CHAPMAN, L. J.; CHAPMAN, C. A. Conductivity as a predictor of a total cations and salinity in Ethiopian lakes and rivers: Revisiting earlier models. *Limnologia* 32 (21-26), 2002.
- ZIMMERMAM, S. FITZSIMMONS, K. 2004; Tilapicultura intensiva. In: CYRINO, J.E.P. et al. (Ed.). *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática. TecArt, Cap.9, p.239-266, Models. *Limnologia*, 2002.
- ZORZETTO, R., GUIMARÃES, M. Um peixe modelo. *PESQUISA FAPESP*, 209, P. 16-21, 2013.