

## ANEXO I

### PEIXES MANTIDOS EM INSTALAÇÕES DE INSTITUIÇÕES DE ENSINO OU PESQUISA CIENTÍFICA PARA FINS DE ESTUDO BIOLÓGICO OU BIOMÉDICO I – Lambari (*Astyanax*), Tilápia (*Tilapia*, *Sarotherodon* e *Oreochromis*) e Zebrafish (*Danio rerio*).

#### I - INTRODUÇÃO

1.1. Os peixes habitam uma grande variedade de ambientes aquáticos e, além disso, apresentam características como estratégias reprodutivas diversas, comportamento, dietas, tolerância a fatores abióticos e habilidades sensoriais (como emissão de som, produção e detecção de eletricidade, dentre outras). Essas características, somadas a fatores extrínsecos, como a facilidade e o custo de manutenção, estrutura compacta, dentre outras, os tornam bons modelos biológicos em estudos e abordagens experimentais em laboratório. De fato, esses animais vêm sendo considerados como modelo para estudos biomédicos desde a década de 1970 (Klontz, 1971; Umminger e Pang 1979).

1.2. Considerando essa variedade biológica, um ponto importante para iniciar as pesquisas, utilizando-se peixes como modelo biológico, é a escolha da espécie a ser estudada.

Ciência de qualidade e o bem-estar animal são conceitos interligados. Por este motivo, garantir condições adequadas da manutenção, cuidado e uso dos peixes em ensino e pesquisa é essencial para gerar resultados confiáveis. Os princípios que regulam o uso de animais em pesquisa são conhecidos como os 3R das suas siglas em inglês (Replace *Substituição*, Reduce *Redução* e Refine *Refinamento*).

Qualquer planejamento que utilize peixes em pesquisa deve justificar que não existem alternativas, o cálculo estadístico dos animais a serem usados e quais serão os métodos para evitar sofrimento.

Assim, em primeiro lugar, é fundamental ter em mente que, dentro dos referenciais da ética do bem-estar animal, o peixe, como qualquer outro animal não-humano, não pode ser visto como um simples modelo. Ainda, utilizando-se o princípio soberano da precaução, cada exemplar deve tratado como um indivíduo sensiente, com capacidade de sofrimento, o qual deve ser evitado de acordo com as bases da ética utilitarista. A ética utilitarista vem, desde J. Bentham e H. Salt, na

segunda metade do século 19, fornecendo as bases para propostas em defesa dos interesses dos animais não-humanos, popularizadas por P. Singer. Dentro desta vertente filosófica, o objetivo é sempre propor ações e buscar soluções que resultem na menor quantidade possível de sofrimento geral. Desde a decisão de se realizar o experimento, a definição de seus objetivos, a seleção do material e decisão quanto ao seu tamanho, o desenho experimental, incluindo tipo de instalações e condições durante manutenção e testes, e método experimental, assim como o destino posterior dos exemplares (mortos ou vivos), devem ser pautados primeiramente pelos princípios acima.

Um fator central para o estabelecimento de protocolos de manutenção e experimentação que atendam requisitos mínimos de bem-estar é o conhecimento da biologia da espécie em questão, que pode ter especificidades, muitas vezes só reveladas durante o estudo, exigindo ajustes progressivos. Isto requer, por parte do experimentador, não só domínio da área do tema investigado, como também familiaridade com seu objeto de estudo e com técnicas de observação comportamental, assim como atualização permanente sobre a literatura referente à sistemática, biologia, ecologia e comportamento desses animais, já que novos estudos podem trazer contribuições relevantes para a implementação das condições de bem estar dos indivíduos. Dada a grande diversidade acima descrita, a proposição de protocolos-padrão baseados em um número ínfimo de espécies é totalmente desaconselhada no contexto da ética utilitarista, na medida em que sua aplicação generalizada inevitavelmente levará ao sofrimento de um número imenso de animais, para os quais esses protocolos são inapropriados, ou mesmo incorretos.

A escolha é ainda importante para definir as instalações, como, por exemplo, água doce ou marinha. É importante a escolha de uma espécie que já apresente domínio no cultivo, com altas taxas de sobrevivência, para que os parâmetros de qualidade de água, reprodução, nutrição e sanidade sejam conhecidos. É importante também ter o conhecimento de fontes de fornecimento desses animais. Espécies com importância econômica normalmente apresentam maiores facilidades para aquisição em pisciculturas comerciais. No entanto, muitos estudos podem ser realizados com espécies cujo único acesso é o ambiente natural. Nesse caso, deve ser considerada a solicitação das licenças ambientais, para captura e manutenção (<http://www.icmbio.gov.br/sisbio>/<http://www.icmbio.gov.br/sisbio>/<http://www.icmbio.gov.br/sisbio/>), e as recomendações para se trabalhar com esses animais estão

contempladas no Guia CONCEA Capítulo **Animais Silvestres de Vida Livre**. Em caso de experimentos com transgenia, considerar a necessidade de atender à lei de biossegurança.

1.3. Em termos objetivos, neste Capítulo, iremos abordar as espécies que são mais usadas em pesquisa ou ensino nas áreas biológicas ou biomédicas: lambari, tilápia e zebrafish. Não estão sendo considerados neste capítulo procedimentos de manutenção destas espécies em viveiros de cultivo, ou sistemas que visem a produção destas espécies.

## **II - BIOLOGIA**

### **2.1 Lambari**

2.1.1. Os lambaris pertencem à família Characidae, ordem Characiformes. O gênero *Astyanax* é o mais numeroso de toda a ordem (Nelson, 2006). Nos estudos biológicos com esses animais, as espécies mais utilizadas no Brasil são *Astyanax fasciatus* (lambari-do-rabo-vermelho) e *Astyanax altiparanae* (Garutti e Britski 2000) (lambari-do-rabo-amarelo ou tambuí). *A. fasciatus* é uma espécie que apresenta problemas taxonômicos, ainda vem sendo estudada do ponto de vista citogenético, pois representa um grupo de animais com diferentes cariótipos (Pazza, Kavalco et al., 2007), sendo inclusive sugerida a existência de duas diferentes linhagens com aspectos morfológicos similares que estariam vivendo em simpatria (Pansonato-Alves, Hilsdorf et al., 2013). Além das questões taxonômicas e citogenéticas, a manutenção de indivíduos de *A. fasciatus* no laboratório apresenta dificuldades pelo seu comportamento agressivo (Langecker, Neumann et al., 1995) e baixa sobrevivência (Correia, 2008). Portanto, não será abordado neste Capítulo.

2.1.2. *A. altiparanae* é uma espécie que vem sendo utilizada intensamente como modelo experimental em várias áreas. Representantes dessa espécie apresentam a nadadeira caudal amarela, têm pequeno porte (10-15 cm de comprimento), com massa corpórea de até 60g e hábito alimentar onívoro (Porto-Foresti, Castilho-Almeida et al., 2010). Apresenta algumas características importantes para sua manutenção em laboratório, como facilidade de manejo, aceitação de alimentação artificial, alta prolificidade, crescimento rápido, atingindo a maturidade sexual em cerca de 4 meses de idade (Porto-Foresti, Castilho-Almeida et al., 2010; Gonçalves, Parisi et al., 2014). Essas características têm levado recentemente o gênero *Astyanax* a ser considerado como um ótimo modelo experimental, principalmente em estudos que

abordam biologia, ecotoxicologia e fisiologia reprodutiva (Gomes, Costa et al., 2013; Vieira, Correia et al., 2013 ; Chehade, Cassel et al., 2014; Costa, Adolphi et al., 2014; Jesus, Branco et al., 2014; Adolphi, Carreira et al., 2015; Brambila-Souza, 2015; Gomes, 2015; Siqueira-Silva et al., 2015; Yasui, Senhorini et al., 2015; Bettim, Gavan et al., 2016). O dimorfismo sexual em *Astyanax* é apenas observado durante o período reprodutivo, quando os machos apresentam aspereza da nadadeira anal.

## **2.2 Tilápia**

2.2.1. A tilápia pertence à família Cichlidae e é originária de países da África e do Oriente Médio. Existem 77 espécies já descritas, pertencentes aos gêneros *Tilapia*, *Sarotherodon* e *Oreochromis*, estando 22 difundidas em países de clima tropical e/ou subtropical, onde são criadas em escala experimental e/ou em produção comercial. No Brasil, a tilápia do Congo (*Tilapia rendalli*) foi a primeira espécie introduzida, em 1953, seguida pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), em 1971. Tilápias são espécies que apresentam características favoráveis ao cativeiro, como adaptabilidade a condições ambientais variáveis, conversão alimentar e ganho de peso adequados, rusticidade, aclimação ao confinamento e resistência a baixos níveis de oxigênio dissolvido e a doenças.

2.2.2. A tilápia é uma espécie tropical de hábito diurno que habita preferencialmente águas rasas de rios, lagos e canais de irrigação, doce e salobra (FishBase, 2015). É um peixe onívoro forrageiro que se alimenta de fitoplâncton, perifíton, plantas aquáticas, pequenos invertebrados, fauna bêntica, detritos e biofilmes associados a estes, sendo a secreção de muco para captação de plâncton na cavidade bucal uma característica própria da espécie (FAO, 2015). Detalhes morfológicos sobre as tilápias podem ser encontrados em (Ribeiro, 2001).

2.2.3. A tilápia é uma espécie ovípara que atinge a maturidade sexual ao redor dos 5-6 meses, ocorrendo desova quando a temperatura da água está em torno de 24°C. O processo reprodutivo começa quando o macho estabelece seu território, escava um ninho de 20 a 50 cm de diâmetro no substrato e passa a protegê-lo, atraindo uma fêmea e cortejando-a por horas. A fêmea madura então desova no ninho e imediatamente coleta os óvulos na cavidade bucal. O macho ejacula onde os óvulos haviam sido postos e a fêmea coleta o material para que a fertilização ocorra na cavidade bucal e se afasta do local, ficando o ninho disponível para desovas de outras fêmeas. Os ovos são incubados na cavidade bucal e as larvas são cuidadas até que o

saco vitelínico seja absorvido. Dependendo da temperatura, isto ocorre ao longo de 1 a 2 semanas. As larvas são então liberadas na água, mas podem retornar à boca da fêmea na iminência de situações adversas, o que confere um alto índice de sobrevivência da progênie (em torno de 100%) (Ribeiro, 2001; FAO, 2015; FishBase 2015).

2.2.4. Devido ao cuidado parental ocorrer na cavidade bucal, o número de ovos por desova é menor se comparado a outras espécies de água doce, podendo uma fêmea de 600 a 1000 g produzir 1000 a 1500 ovos. Se a temperatura se mantiver na faixa adequada para desova, a fêmea pode realizar nova desova a cada liberação das larvas da cavidade bucal ao fim do período de cuidado parental (pode desovar de 8 a 12 vezes/ano). Enquanto incuba os óvulos, a fêmea não se alimenta por duas ou mais semanas. Quando os jovens são então liberados, a energia da fêmea passa a ser canalizada para o desenvolvimento de novos óvulos, ficando o crescimento e a deposição de gordura estagnados. Após a maturidade, as fêmeas apresentam redução drástica no crescimento, pois direcionam grande parte da energia do alimento para a produção de ovos (para cada grama de peso vivo, um a um e meio óvulos são produzidos). Então, os machos atingem o peso comercial mais cedo. Tilápias podem viver por mais de 10 anos e pesar aproximadamente 5 kg (FishBase, 2015; Ribeiro, 2001; FAO, 2015; MAPA, 2007).

2.2.5. A reprodução da tilápia em cativeiro é feita com uma intervenção no padrão natural descrito acima, a fim de produzir indivíduos que crescem e funcionam reprodutivamente como machos. Utiliza-se a técnica de reversão sexual, para a qual recomenda-se a utilização da proporção 1 macho:7-10 fêmeas em um tanque de 10m<sup>2</sup> para o estabelecimento da territorialidade do macho (iniciando antes do macho atingir a maturidade). Os ovos são coletados da boca da fêmea e incubados artificialmente, evitando problemas como canibalismo e superpovoamento e proporcionando uma nova desova mais rapidamente. As larvas que nasceram no tanque podem ser coletadas com até 8 mm (máx. 1 semana de vida). Os jovens são então estocados a uma densidade de 3500/m<sup>2</sup>, sendo iniciada a alimentação com ração contendo Hormônio  $\alpha$ -metil-testosterona., a qual deve ser oferecida de 2-4 vezes/dia nas horas mais claras do dia, sendo a taxa de alimentação corrigida a cada 2 dias, conforme o tamanho. A uma temperatura de 25 a 28°C, o processo de inversão sexual deve durar de 25 a 30 dias, atingindo um comprimento médio de 24 mm. Devem ser eliminados os animais  $\leq$  14mm (porcentagem de inversão entre 97-100%) (Ribeiro, 2001). A

eliminação dos animais deve seguir as normas para eutanásia de peixes, conforme as Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA e o Guia Brasileiro de Boas Práticas para a Eutanásia em Animais do Conselho Federal de Medicina Veterinária.

2.2.6. As diferenças entre os gêneros residem principalmente no comportamento reprodutivo. *Tilapia* realiza desova em ninhos no substrato no fundo da coluna d'água, onde os ovos se desenvolvem e eclodem. *Sarotherodon* e *Oreochromis* também desovam em ninhos escavados no substrato, mas os ovos são fertilizados e incubados na boca da fêmea. Atualmente, há uma grande variedade de intercrossamentos, dificultando a diferenciação através de hábitos comportamentais (Ribeiro, 2001).

## **2.3 Zebrafish**

2.3.1. *Danio rerio* é um peixe da família Cyprinidae, Ordem Cypriniformes. É conhecido popularmente como paulistinha, peixe zebra ou pela comunidade científica como “zebrafish”. Peixe tropical, originário dos principais rios da Índia, Bangladesh e Nepal, é comumente encontrado em águas rasas, paradas ou de baixa movimentação, com vegetação aquática submersa e lodo. O zebrafish é uma espécie gregária, normalmente encontrada em cardumes de 5 a 20 indivíduos. Normalmente, formam cardumes de sexos misturados, comportamento esse inato e hereditário. Embora sejam animais sociais, podem apresentar comportamento agonista, especialmente quando acasalam e durante o estabelecimento de hierarquias de dominância, que ocorrem dentre e entre os sexos (Lawrence, 2007).

2.3.2. Vivem em águas que podem sofrer grandes variações de temperatura (16-38°C) e pH (5.9-8.5). Alimentam-se de uma ampla variedade de zooplâncton e insetos e, em menor proporção, de algas, detritos e outros materiais orgânicos. É um peixe de hábito tipicamente diurno, mostrando os maiores níveis de atividade durante as primeiras horas da manhã, a qual tende a apresentar uma significativa redução ao final da tarde. Dormem frequentemente, embora não exclusivamente, durante a noite. Esse padrão circadiano de atividade influi nos processos fisiológicos, bioquímicos e comportamentais no animal, padrão esse que deve ser levado em consideração nos biotérios de criação.

2.3.3. O zebrafish é classificado como um peixe ósseo. Seu esqueleto axial inclui coluna vertebral e nadadeiras ímpares. Possuem corpos esguios e alongados, com uma cabeça curta, narina protuberante e uma boca inclinada e voltada para cima.

A mandíbula superior possui uma saliência (protrusão) que possibilita a abertura da boca e ajuda na sucção de alimentos. A característica mais marcante do peixe zebra é o seu padrão de listras azuis e brancas ao longo do corpo e da nadadeira anal e caudal (Figura 1).



Foto Camila Carvalho

Figura 1 – Zebrafish com seu característico padrão de listras azuis e brancas ao longo do corpo.

2.3.4. Passa pelos estágios larval, juvenil (Figura 2) e adulto. Aspectos importantes destes estágios estão contidos na Tabela I. No estágio larval, já apresenta órgãos importantes e por esta razão muitas pesquisas científicas são realizadas neste estágio de vida do animal. Outra importante característica é a presença da linha lateral que consiste em células ciliadas sensoriais, conhecidas como neuromastos. Estão embutidas na pele em linhas que percorrem o comprimento dos dois lados do corpo. A linha lateral é envolvida em uma variedade de comportamentos, incluindo formação de cardumes, fuga de predadores e reprodução. As principais características dos sistemas do peixe zebra estão mencionadas na Tabela II.



Foto: Mônica Lopes Ferreira

Figura 2 – (A) Estágios embrionários o Zebrafish.

Tabela I – Características dos estágios embrionários do Zebrafish

<b>Estágio (dias)</b>	<b>Comprimento (mm)</b>	<b>Descrição</b>
Larva Jovem (3)	3,5	nada livremente, posicionamento vertical
Larva (14)	6	bexiga natatória cheia, procura de alimento, crescimento
Juvenil (30)	10	nadadeiras e padrão de pigmentação dos adultos
Adulto jovem (90)	20	reprodução
Adulto (100)	40-50	Final da vida

2.3.5. Em condições apropriadas, o zebrafish se reproduz continuamente durante a maturidade sexual. Sua grande fertilidade é uma de suas principais características. A liberação de feromônios pelo macho induz a ovulação da fêmea. A fêmea, por sua vez, induz o comportamento de acasalamento no macho através da liberação feromônios durante a ovulação. Por esta razão, é importante manter machos e fêmeas juntos compartilhando a mesma água antes do acasalamento. Também muito importante é diferenciar machos de fêmeas. Machos são geralmente mais delgados e escuros que as fêmeas. Além disso, estes apresentam tubérculos nos raios da nadadeira peitoral. As fêmeas são muito mais desenvolvidas e atingem a maturidade sexual antes dos machos. Elas tendem a ser maiores e com suas cores um pouco mais suaves. No corpo da fêmea, predomina o branco prateado e, no macho, o amarelo ouro (Spence, Gerlach et al., 2008).

2.3.6. A reprodução é influenciada por fotoperíodo e ocorre normalmente antes do amanhecer, a desova começa nas primeiras horas do dia. Em condições adequadas, o peixe zebra se reproduz continuamente durante a maturidade sexual. As fêmeas podem se reproduzir diariamente, embora seja recomendado um intervalo de descanso. Este intervalo pode variar de dias a semanas, dependendo do protocolo adotado. Outro fator que deve ser levado em consideração é a existência de fêmeas dominantes, o que pode inibir a desova de fêmeas consideradas subordinadas. Uma maneira de contornar este possível problema é evitar manter os mesmos grupos de fêmeas no mesmo aquário por extensos períodos de tempo.



Tabela II – Principais Sistemas do Zebrafish

<b>Sistemas</b>	<b>Características</b>
Tegumentar	Pele coberta por escamas cicloides que funcionam como barreira de proteção física.
Esquelético	Esqueleto complexo compreendendo cartilagem e osso.
Gastrointestinal	Inclui boca, faringe, esôfago, intestinos e abertura anal. Possui um par de dentes e papilas gustativas.
Respiratório	As brânquias são as responsáveis pelas trocas gasosas, balanço osmótico, excreção de compostos nitrogenados e manutenção do balanço ácido-básico.
Urogenital	O rim é o principal órgão responsável pela hematopoiese. O peixe macho possui um par de testículos e a fêmea possui ovários contendo oócitos.
Cardiovascular	O coração é o órgão predominante na fase embrionária do zebrafish. Coração com átrio e ventrículo, seios venoso e bulbo arterial.
Nervoso e Sensorial	Possui órgãos sensoriais especializados: olho, sistema olfativo e ouvido. A linha lateral é um sistema sensorial que permite que o animal detecte e responda a variações de movimento na água.

2.3.7. A eficácia do protocolo de acasalamento irá determinar a quantidade de produção de ovos viáveis. Diferentes protocolos podem ser utilizados para a reprodução do zebrafish em biotérios. Um dos principais e mais utilizados em biotérios por se mostrar bastante prático e eficaz é a realização do acasalamento em locais separados dos aquários onde os animais vivem. Estes sistemas, comercializados por diferentes empresas, possuem fundo gradeado que se encaixa em recipientes maiores preenchidos de água. Quando ocorre o acasalamento, os ovos passam pelo fundo gradeado e se depositam na parte inferior do recipiente, ficando assim protegidos do canibalismo. Estes sistemas também possibilitam que os ovos sejam facilmente retirados. O tamanho do sistema determinará a quantidade de peixes que podem ser colocados para acasalamento e o cuidado com a manipulação dos embriões após a desova determinará o sucesso da criação.

2.3.8. Os animais exibem rituais de acasalamento antes e durante a desova. Os machos competem pelas fêmeas, estabelecendo e defendendo território. Durante a corte, nadam em círculos para que as fêmeas os percebam. No momento da desova, nadam paralelo com as fêmeas, provocando a liberação dos óvulos e simultaneamente liberando o esperma para que ocorra a fecundação. Os embriões devem ser retirados

do sistema de acasalamento o mais rápido possível, evitando possíveis contaminações (Figura 3). Em seguida, devem ser de maneira cuidadosa lavados com água limpa e transferidos para placas de Petri preenchidas com água. Um meio de evitar contaminação é utilizar azul de metileno (0,00003%) dissolvido em água. Após 12 ou 24 horas os embriões não-viáveis são facilmente identificados por sua aparência esbranquiçada e devem ser imediatamente retirados. Os ovos vão permanecer em recipientes de incubação até que as larvas eclodam e inflem a bexiga natatória. Os ovos do zebrafish eclodem de 2-3 dias pós-fertilização (dpf). Após esses procedimentos, os ovos ficam em repouso, em recipientes de incubação, até que as larvas eclodam e inflem as bexigas natatórias (Westerfield, 2007).

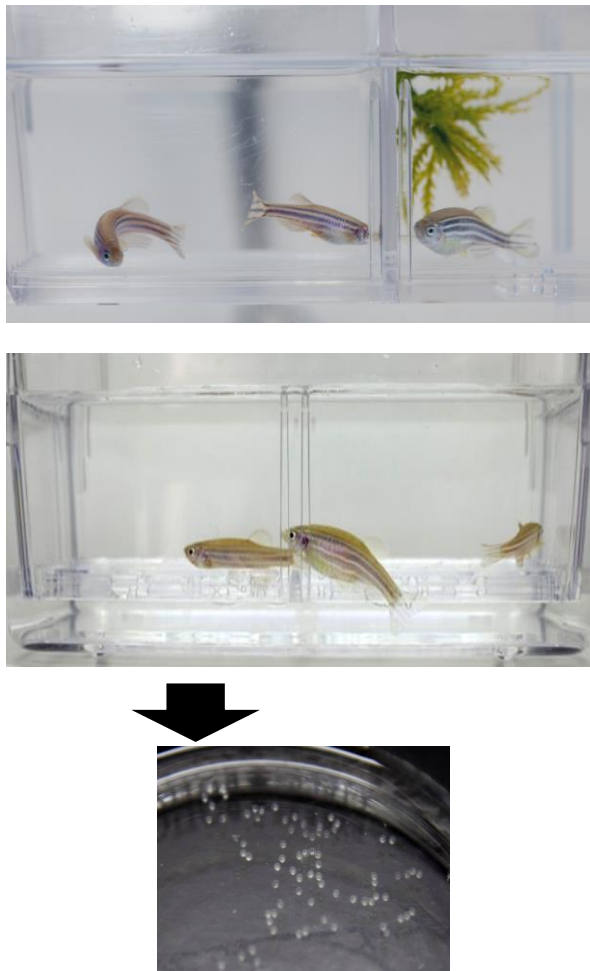


Foto Camila Carvalho

Figura 3 – Ritual de acasalamento e embriões.

### III - INSTALAÇÕES

#### 3.1. Condições ambientais gerais da sala (temperatura, luminosidade, etc)

3.1.1. As condições da sala dependem muito do objetivo do trabalho. No entanto, de uma forma geral, a sala deve ter controle de temperatura de forma a facilitar a manutenção da temperatura da água (com aquecedores ou *chillers*). Considerando-se que o fotoperíodo não seja uma variável a ser analisada, recomenda-se o fotoperíodo natural (12 horas de luz) ou um sistema de iluminação com fotoperíodo ajustado (14h claro: 10h escuro), mas pode-se alterar o fotoperíodo em casos excepcionais quando justificado para os objetivos do experimento.

3.1.2. A sala dos aquários deve apresentar um sistema de abastecimento de água, que pode ser da rede de tratamento; no entanto, deve ser previsto um reservatório de armazenamento de água para que esta possa ser mantida ao menos 12-24 horas antes do abastecimento dos aquários, com a finalidade de volatilizar o cloro da água. É ideal que este reservatório esteja localizado acima do nível dos aquários, de forma que os mesmos possam ser abastecidos por gravidade. Caso contrário, deve ser prevista a instalação de uma bomba, dimensionada de acordo com as necessidades de renovação e abastecimento de água dos aquários. Outra opção que pode ser utilizada é a remoção do cloro livre na água através da adição de produtos químicos comerciais específicos para tal fim ou pela utilização de filtros declorinizadores.

#### 3.2. Aquários, qualidade da água e higienização

3.2.1. A água é o meio ambiente no qual os peixes vivem, sendo cruciais os cuidados com parâmetros que irão determinar o bem-estar do animal. Segundo Kinkelin et al. (Kinkelin, Michel et al., 1991), o meio ambiente contém bactérias e fungos geradores de alterações mórbidas (cuja etiologia é diagnosticada por técnicas laboratoriais) e classificados como bioagressores oportunistas (*Aeromonas*, *Saprolegnia*, etc). Os fungos do gênero *Saprolegnia* oportunizam o surgimento de dinoflagelados secretores de toxinas (Sarig, 1971), principalmente em países quentes e às vezes em países temperados na estação quente. Estes bioagressores, num ambiente em equilíbrio, permanecem inativos para os peixes, porém em qualquer efeito que leve ao desequilíbrio, deixam de ser oportunistas para serem patogênicos. O estado de patogênico é caracterizado nos peixes pelo surgimento de alterações do comportamento (sinais clínicos) e/ou presença de lesões que podem levar a perda no

rendimento ou gerar mortalidade. Essas manifestações podem ser devidas a causas de ordem física, química ou biológica, que atuam isoladamente ou associadas, porém comprometem as funções fisiológicas do animal. As causas físicas estão constituídas pelas propriedades físicas da água, tais como: temperatura, material em suspensão (MES) e oxigênio dissolvido. As causas químicas são principalmente as propriedades da água e a composição desta (pH, alcalinidade, conteúdo em gases dissolvidos, materiais nitrogenados, toxinas segregadas por algas ou por diversos contaminantes tais como cloretos, sulfatos, mercúrio, ácidos, pesticidas, clorofenóis, detergentes, hidrocarbonetos, etc., e ainda podem ser considerado um fator de ordem químico a alimentação, na modalidade qualitativa e quantitativa, que pode prejudicar a qualidade da água). Como causa de ordem biológica destacam-se as bactérias, fungos, vírus e parasitos.

Na zona térmica cada espécie tem um intervalo de temperatura dentro do qual se consegue um ótimo rendimento zootécnico. Zoologicamente se encontram peixes entre 2,5°C e 44°C. Os ciprinídeos das zonas norte americanas sofrem variações que vão desde 2 a 44°C (Lowe e Heath, 1969). Segundo Kinkelin et al., (Kinkelin, Michel et al., 1991), do ponto de vista zootécnico e médico é necessário considerar especialmente 2 funções: crescimento e a imunidade. Portanto para considerar o bem-estar de peixe é importante considerar o fator temperatura, pois a vida nas zonas de temperaturas supra ótimas resulta energeticamente cara e nas zonas infra ótimas para uma espécie, a cinética das respostas imunitárias é mais lenta que o ótimo fisiológico. Segundo este mesmo autor o papel do estresse está bem definido experimentalmente e esta reação se produz em numerosas situações, caracterizadas pela presença de componentes do meio ambiente desfavorável a fisiologia dos peixes acredita-se que toda a patologia decorrente do meio ambiente é sempre consequência desta patogenia: estresse e o efeito direto eventual da causa mórbida.

De uma forma geral, o manejo da água está diretamente relacionado à biomassa do aquário, temperatura da água e qualidade do alimento. As variáveis que devem ser monitoradas nos aquários e seus respectivos parâmetros são indicados na Tabela III, dentro dos limites desejáveis para cada espécie abordada neste capítulo.

Tabela III - Principais parâmetros e variáveis necessários ao bem-estar em aquários, segundo a espécie de peixe.

	Lambari	Tilápia	Zebrafish
Oxigênio Dissolvido	> 4 mg/L	> 4 mg/L	≈7,8 mg/L
Amônia	< 0,1 mg/L	< 0,20 mg/L	<0,002 mg/L
pH	6,5-8,0	6,0 - 8,5	7,0 - 8,0
Temperatura	24-28°C	24-32°C	24 – 28°C

Em relação ao nível de nitrito, na manutenção de Zebrafish, a concentração não pode exceder 0,5 partes por milhão, portanto deve-se prover meios que garantam a concentração menor que 0,5 partes por milhão.

### **3.3 Exigências e particularidades na manutenção de Lambaris e Zebrafish**

3.3.1. Não existe um tamanho ou volume padrão de aquários para a manutenção de indivíduos de *A. altiparanae*. Deve-se levar em conta a densidade de manutenção destes animais que não pode passar de 0,5-2g/L. Nas densidades mais elevadas, é recomendada a troca de água a cada 24 ou no máximo 48 horas de experimento, sendo que esta troca pode ser total ou parcial. Na troca parcial, pode-se chegar até 70% de renovação da água do aquário e, na necessidade de troca total, os animais são geralmente mudados de aquários. A manipulação do ambiente e dos indivíduos deve ser realizada com base na avaliação contínua da qualidade da água conforme a tabela III. Esta prática visa redução do estresse osmótico e térmico entre outros. Podem ser estabelecidos ainda sistemas de recirculação de água.

3.3.2. A reprodução do lambari deve ser estimulada artificialmente com hormônios ou preparações hormonais. Os reprodutores devem ser selecionados com base em características de maturidade e em seguida preparações hormonais como extrato hipofisário (método mais utilizado) devem ser administradas em duas doses. Uma primeira dose de 0,5mg/kg pode ser administrada em animais dos dois sexos. Após 12 horas da primeira dose, as fêmeas recebem uma segunda aplicação de extrato hipofisário na dose de 2,5mg/kg. A extrusão dos gametas ocorre com cerca de 160 horas-grau.

3.3.3. Ainda em relação à manutenção, o zebrafish é um peixe gregário que pode ser alocado em densidade de 5 peixes adultos/L em aquários que tenham aeração, biofiltro, renovação de 70%/dia, boa qualidade da água e bom regime de alimentação. Em aquários sem biofiltro uma boa relação de densidade para esta espécie é 1-2 animal/L (Reed e Jennings, 2011).

### **3.4 Enriquecimento ambiental**

A simples presença de substrato mantém a hierarquia social e estimula o comportamento sexual em machos territorialistas de tilápia de Moçambique, já que estes constroem ninhos com o material disponível para atrair as fêmeas. A possibilidade de manter este hábito natural auxilia na promoção do bem-estar da espécie mantida em aquários e instalações de piscicultura, aumentando a diversidade comportamental e a exploração ambiental, diminuindo, assim, a inatividade (Galhardo, Almeida et al., 2009; Galhardo, Correia et al., 2008).

Dessa forma, enriquecimento ambiental deve ser obrigatório, a não ser em casos excepcionais que comprometam de forma evidente os resultados da pesquisa experimental.

3.4.1. Peixes utilizados em laboratórios de pesquisa geralmente são mantidos em locais que comprometem seu bem-estar e, por consequência, o resultado dos testes aos quais são submetidos. Contudo, o enriquecimento ambiental pode tornar a manutenção destes animais cativos mais confortável, sendo o ambiente modificado em prol da melhor qualidade de vida e da maior satisfação das suas necessidades fisiológicas, incluindo aspectos comportamentais, reprodutivos, etc (Batista, 2010); (Delicio, Barreto et al., 2006; Brydges e Braithwaite, 2009; Piato e Rosemberg, 2014).

3.4.2. Um estudo evidenciou que tilápias apresentam preferência por ambientes enriquecidos com abrigo e cascalho em detrimento de ambientes vazios (Delicio, Barreto et al., 2006). O efeito estimulatório do enriquecimento ambiental no aprendizado e na memória da tilápia, com relação ao local e período em que o alimento estaria disponível, foi avaliado (Batista, 2010). A investigação utilizou cascalho, vegetação, abrigos de PVC e pedaços de tijolos e madeira como itens de enriquecimento ambiental e constatou a existência de interação entre este e a melhora na memória e aprendizado, embora os peixes não tenham atingido a meta específica proposta pelo estudo. Em contrapartida, um estudo similar observou o comportamento de associação entre local e período de alimentação em tilápias (Delicio e Barreto, 2008). Em peixes zebra, a utilização de plantas artificiais como enriquecimento ambiental aumentou a proliferação celular no telencéfalo (von Krogh, Sorensen et al., 2010) e diminuiu comportamentos tipo-ansiedade em testes padronizados (Collymore, Tolwani et al., 2015).

3.4.3. Apesar dos benefícios, ambientes enriquecidos nem sempre aumentam o bem-estar de peixes territoriais, visto que machos de tilápia do Nilo apresentaram maior agressividade em territórios enriquecidos pela maior quantidade de material a ser defendido (Barreto, Carvalho et al., 2011), e zebrafish criados em ambiente enriquecido apresentam níveis maiores de cortisol corporal (von Krogh, Sorensen et al., 2010). Contudo, esta pode ser uma resposta espécie-específica. Em ambiente enriquecido, a tilápia do Congo apresentou uma diminuição na latência para iniciar a luta, mas a frequência de ataques foi menor e a hierarquia de dominância menos explícita em comparação aos animais mantidos em ambiente não-enriquecido (Torrezani, 2012). Isto pode ser explicado pela hipótese da barreira visual; um ambiente mais enriquecido impede a visualização entre os indivíduos, diminuindo a sinalização (alteração da pigmentação corporal) entre os mesmos e o número de interações agressivas (Imre, Grant et al., 2002).

3.4.4. Diferentes cores podem influenciar no comportamento social e fisiologia da tilápia. Quando cinco tratamentos de cores (preto, branco, verde, azul e marrom) foram testados na espécie, constatou-se que o preto e o verde diminuem os confrontos agonísticos e os níveis de cortisol, enquanto o azul e o marrom estimulam as interações agonísticas e a resposta ao estresse e aumentam a atividade locomotora. Houve alta frequência de confrontos agonísticos nos animais mantidos no ambiente branco, porém, com redução do padrão de ameaça e manutenção da locomoção normal (Merighe, Pereira-da-Silva et al., 2004). No entanto, um estudo anterior verificou que a cor azul previne o estresse em tilápias (Volpato e Barreto 2001). A cor azul também desempenhou um papel positivo na reprodução da espécie (Volpato, Duarte et al., 2004). Houve maior frequência e intensidade reprodutiva nos peixes expostos à luz de cor azul do que à de cor branca, além de que os machos expostos a primeira removeram mais substrato e construíram ninhos maiores. Com relação à intensidade luminosa, esta possui um efeito cumulativo ao longo do tempo sobre a agressividade da tilápias. Além disso, um maior número de interações agonísticas ocorre na luz de maior intensidade, mas a hierarquia dos peixes (alfa, beta e gama) não é desestabilizada (Carvalho, Mendonça et al., 2013).

### **3.5 Exigências no cativeiro por grupo**

3.5.1. A tilápia demonstra alta resistência a baixos níveis de oxigênio dissolvido, podendo viver sob anóxia por algumas horas, uma vez que regula o

consumo de O<sub>2</sub> à medida que os níveis na água vão baixando. Contudo, sua manutenção em ambientes com escassez de oxigênio dissolvido a torna mais susceptível a doenças e reduz seu desempenho. Na faixa de temperatura de 26-35°C, o nível crítico de O<sub>2</sub> é de 20-10% da saturação (Kubitza, 2000a). Segundo Macêdo (2004), a tilápia vive em 1,2mg/L O<sub>2</sub>.

3.5.2. Em zebrafish, a temperatura relativamente alta de manutenção, a densidade de animais nos aquários e a alta frequência de alimentação típica de instalações de alta atividade criam a necessidade de níveis de oxigênio dissolvido próximos da saturação (~7,8 mg/L em 28°C) (Lawrence, 2007).

3.5.3. O pH adequado para a manutenção da tilápia em aquários está entre 6 e 8,5, ocorrendo alta mortalidade abaixo de 4,5 e acima de 10,5.

3.5.4. O pH do habitat natural do zebrafish varia entre 7,9 e 8,2, semelhante ao ideal para a promoção da saúde do biofilme e da estabilidade da qualidade da água (Lawrence, 2007).

3.5.5. A LC<sub>50</sub> de amônia depende da espécie de tilápia, do tamanho, do tempo de exposição e da pré-exposição ou adaptação a níveis sub-letais de amônia. Níveis de amônia não-ionizada acima de 0,20 mg/L geralmente comprometem o crescimento e a conversão alimentar da tilápia, além de baixar a resistência a doenças e a tolerância ao manejo (Kubitza, 2000a).

3.5.6. Os extremos inferior e superior de temperatura para a tilápia são 12 e 42°C, sendo a faixa de preferência para um melhor crescimento de 24 a 32°C. A tilápia apresenta conforto térmico na faixa de 27 a 32°C. Em baixas temperaturas, há redução no consumo de alimento, crescimento mais lento, menor resistência a doenças e maior predisposição à mortalidade durante o manejo (Kubitza, 2000a).

3.5.7. A tolerância das tilápias à salinidade é determinada por fatores como a estratégia de adaptação, a idade, a prévia exposição de ovos e pós-larvas e principalmente o tamanho. Salinidades ao redor de 10-12 g/kg são consideradas isoosmóticas para as tilápias, sendo a faixa onde há o menor gasto de energia com a osmorregulação e assim o crescimento é favorecido (Kubitza, 2000a).

3.5.8. Zebrafish é relativamente resistente a variações em salinidade, ainda que alterações súbitas podem levar a estresse osmótico. Embriões na fase pós-gastrulação são mais tolerantes a aumentos na salinidade do que animais mais jovens. Na ausência de estudos experimentais sobre o tema, a manutenção destes animais em



condições de salinidade recomendadas para outras espécies de peixes de água doce (i.e., 0,25-0,75 ppt) é recomendada (Lawrence, 2007).

3.5.9. Em relação à dureza da água, há considerável variação entre instalações laboratoriais devido a características próprias, incluindo origem da água (rede de tratamento, destilador ou osmose reversa), adição de sais de cálcio e magnésio, tamponamento com bicarbonato, etc. Via de regra, valores de dureza entre 75-200 mg/L CaCO<sub>3</sub> são considerados adequados para peixes de água doce (Wurts, 2002).

### **3.6 Transporte**

3.6.1. Para o transporte de animais, inicialmente sugere-se um período de jejum de 24 horas para que o trato digestório seja esvaziado. O transporte pode ser realizado em caixas especializadas para transporte de peixes, com suprimento de oxigênio. Recomenda-se acrescentar NaCl (0,1 a 0,3%) na água de forma a reduzir o estresse no transporte. Fármacos sedativos ou anestésicos, tais como benzocaína, metanosulfonato de triclaína (MS-222) podem ser usados. Pode-se também utilizar o óleo de cravo. Deve haver monitoramento constante do bem-estar dos animais durante o transporte, desde os primeiros preparativos. No caso de transporte em saco plástico, apenas 2/3 do volume deve estar preenchido com água e 1/3 deve ser preenchido com oxigênio. A temperatura deve também estar dentro dos limites acima colocados, caso contrário, deve haver renovação parcial ou total da água. Recomenda-se que o transporte dos animais seja realizado nos momentos de menor temperatura do dia (início da manhã ou final da tarde) e, de preferência, em veículos com ar condicionado. Além disso, antes de iniciar os experimentos, é recomendado que os animais passem por um período de quarentena.

## **IV - ALIMENTAÇÃO**

4.1. Os requerimentos nutricionais das espécies devem ser estabelecidos e essa informação deve ser aplicada de maneira adequada para que se promova máximo crescimento, sobrevivência, reprodução e atividade imune dos animais. Em caráter de recomendação, mas não de obrigatoriedade, são sugeridos os protocolos abaixo.

4.2. *A. altiparanae* tem hábito alimentar onívoro e aceita rações comerciais. A ração fornecida vai depender da fase do ciclo de vida que estes animais se encontram. Para as larvas devem ser fornecidas rações em pó ou trituradas, com teor

de proteína de 30-36% de proteína bruta, com frequência de alimentação que pode variar de 4-6 vezes ao dia, sempre no período diurno. Na fase de juvenil, a frequência alimentar pode ser reduzida para 2 vezes ao dia, assim como o teor de proteína da ração que pode ser de 28-32%. Animais adultos podem ser mantidos com rações de 25-30% de proteína bruta, com frequência alimentar de apenas 1 vez ao dia.

4.3. A quantidade de alimento ofertado vai depender dos objetivos do experimento, assim como da possibilidade/necessidade de renovação de água. A definição da quantidade e frequência de alimento varia com os parâmetros de qualidade de água abaixo descritos.

4.4. A tilápia aceita alimentação artificial facilmente, seja farelada, peletizada ou extrusada. Por ocupar um baixo nível trófico na cadeia alimentar do ambiente aquático, possui grande capacidade de produzir proteína de alta qualidade através de fontes alternativas de proteína. O manejo alimentar e nutricional da tilápia depende de variáveis inerentes à dieta, como a frequência, a apresentação, a quantidade e a qualidade da mesma, em função da biomassa do tanque, da idade e do estado fisiológico e sanitário dos peixes, do sistema de cultivo, dos parâmetros de qualidade da água e da presença de plâncton. De forma geral, em aquários, deve ser oferecida duas vezes ao dia de forma manual, especialmente se for extrusada (flutuante) (Ribeiro, 2001).

4.5. De maneira geral os peixes zebra podem se alimentar de alimentos vivos que incluem várias espécies de zooplâncton, como Artêmias, rotíferos e Paramecium spp e alimentos processados. Todas compartilham características favoráveis, como facilidade de cultivo, perfil nutricional balanceado, alta digestibilidade, atratividade e aceitabilidade. É importante ressaltar que dietas com alimentos processados podem ser utilizadas para substituir as dietas com alimentos vivos. Isto ocorre na maioria das vezes, uma vez que representam uma diminuição de custos e permitem um maior controle sobre o estado nutricional dos animais e reduz o risco de introdução de patógenos ou toxinas via dieta. Estes podem ser usados como fonte exclusiva após a fase larval, se for nutricionalmente balanceado, palatável, estável e de boa digestibilidade. É essencial que dietas processadas sejam estocadas e administradas corretamente, lembrando que a vida útil de um alimento processado não passa de três meses, quando mantido em local seco e ventilado. Importante lembrar que alimentos processados devem ser ofertados secos e não hidratados previamente (Markovich, Rizzuto et al., 2007; Westerfield, 2007; Lawrence 2007).

## V - DOENÇAS MAIS COMUNS E CUIDADOS

5.1. A manutenção da qualidade da água, manejo alimentar e experimental dos lambaris são os principais pontos a serem considerados para que não se instalem doenças nos indivíduos. As doenças ocorrem principalmente em situações nas quais a concentração de oxigênio dissolvido é mantida abaixo do limite mínimo desejável, a concentração de amônia mantida acima do limite máximo, sobras de alimentos são mantidas nos aquários, além de biomassas excessivas. Recomenda-se ainda que os utensílios utilizados nos aquários (como redes, puçás, termostatos, aeradores, dentre outros) sejam limitados a cada aquário, para que as doenças não sejam transmitidas entre animais de diferentes aquários (Porto-Foresti, Castilho-Almeida et al., 2010).

5.2. Variações na temperatura da água são as principais causas do surgimento de fungos, como a *Saprolegna*, e protozoários, como *Ichthyophthirius multifiliis*, que surgem quando a temperatura na água está abaixo de 20°C. Um ectoparasita muito comum em lambaris é a *Lernaea* sp. De uma forma geral, medidas profiláticas como abastecimento com água não contaminada, desinfecção dos peixes transferidos para nova localidade e sua quarentena na chegada são sugeridas. Muitos tratamentos com medicamentos já foram desenvolvidos e estes só podem ser utilizados com registro no MAPA com a orientação de um médico veterinário. Em caso de alteração de comportamento dos animais deve-se ajustar a temperatura na zona de conforto térmico dependendo de cada espécie, diminuir o arraçoamento assim como o manuseio dos animais (Porto-Foresti, Castilho-Almeida et al., 2010).

5.3. A globalização da tilapiacultura promoveu a disseminação de agentes patogênicos, sendo hoje diagnosticadas no Brasil doenças que há pouco tempo não representavam entraves à produção de tilápias. Como para os demais peixes, as doenças que acometem as tilápias podem ser prevenidas com a manutenção de um ambiente dentro dos parâmetros de qualidade exigidos para a espécie e a realização de boas práticas de manejo. O fato dos peixes compartilharem a mesma água, principalmente os que são criados em sistemas, onde a água recircula, possibilita que patógenos possam ser facilmente introduzidos através da chegada de novos peixes, que podem apresentar estado de saúde indefinido, atingindo assim todos os demais animais. Por este motivo é de extrema importância o período de quarentena. Neste período, animais recém-adquiridos permanecem em observação antes de serem introduzidos ao sistema.

5.4. Alterações em fatores ambientais, nutricionais, genéticos e sanitários podem causar alterações no ambiente de cultivo que tornam as tilápias menos resistentes a certos patógenos comumente encontrados na água, porém, sem determinar doença nos peixes (Pavanelli, Eiras et al., 2002; Kubitza, 2008; Roberts, 2012). Portanto, o método profilático é o mais indicado, a fim de se evitar a ocorrência de surtos no ambiente de cultivo, devendo-se: manter a qualidade da água, observando variáveis como temperatura, oxigênio dissolvido, pH e teor de amônia; evitar o acúmulo de matéria orgânica; oferecer dieta na qualidade e quantidade adequadas às exigências nutricionais da fase de desenvolvimento; evitar manuseio grosseiro, prevenindo a perda de escamas e o aparecimento de lesões; minimizar estressores físicos e fisiológicos (transporte, biometria, etc.); utilizar a densidade de estocagem condizente; realizar quarentena antes da introdução de animais no plantel e adquiri-los de fornecedores idôneos (i.e., portadores de licença ambiental, de acordo com a Resolução CONAMA vigente. Separar unidades de produção (berçário, crescimento, etc.); realizar inspeção sanitária de rotina por pessoal técnico especializado (inspeção externa e interna e exames laboratoriais sob a responsabilidade de um médico veterinário); atentar para alterações comportamentais; retirar peixes mortos ou moribundos dos tanques, pois podem servir como reservatório de agentes infecciosos; dar o correto descarte às carcaças; desinfetar o material de uso rotineiro (redes, puçás, etc.); restringir o uso de antibióticos apenas à ocorrência de surtos, para evitar o desenvolvimento de resistência; controlar infestações por parasitas, que podem ser vetores de doenças; e controlar a população de outros animais nas proximidades dos tanques, uma vez que podem servir como vetores de doenças ou hospedeiros intermediários de parasitas (Pavanelli, Eiras et al., 2002; Kubitza, 2008; Figueiredo, Castro et al., 2009; Pádua, Filho et al., 2012; Roberts, 2012; Kubitza, Campos et al., 2013).

### **5.5. As principais doenças que acometem as tilápias e os zebrafish são:**

5.5.1. Septicemia móvel por *Aeromonas* (SMA). É a doença bacteriana mais comum em peixes de água doce e pode ser causada por diversas espécies, sendo *A. hydrophilla*, *A. caviae* e *A. sobria* as mais patogênicas. Em tilápias, ocorre com maior frequência em temperaturas baixas ou amenas devido à resposta imune diminuída, mas a elevação da temperatura acima de 30°C também predispõe à ocorrência de surtos. A enfermidade provoca septicemia, podendo também ocorrer na forma de

doença ulcerativa. Os sinais clínicos mais frequentes são anorexia, anemia (palidez das brânquias e mucosas), letargia, perda de equilíbrio, queda de escamas, úlceras disseminadas pelo corpo, erosão e hemorragia nas nadadeiras, ascite e exoftalmia (Kubitza, 2000b; Pavanelli, Eiras et al., 2002; Costa, 2003; Figueiredo, Castro et al., 2008; Roberts, 2012). Em zebrafish, os principais sinais clínicos são eritema na base das nadadeiras ventrais e na nadadeira dorsal, associadas a infecções bacterianas da bexiga natatória. No entanto, septicemias Gram-negativas também podem produzir esses sinais clínicos e o diagnóstico final só pode ser determinado a partir do exame histopatológico da bexiga natatória (Kent, Spitsbergen et al., 2015). Marcadores genéticos específicos também podem ser amplificados por PCR, podendo, por vezes, ser detectados na água (Singh, Chaudhary et al., 2013).

5.5.2. *Vibriose*. Causada por bactérias do gênero *Vibrio*, em especial *V. anguillarum*. Os sinais clínicos são semelhantes à da SMA, por isso, se faz necessário o diagnóstico diferencial por meio de isolamento em amostras de órgãos ou sangue e técnicas bioquímicas e moleculares (Kubitza, 2000b; Figueiredo, Castro et al., 2008).

5.5.3. *Columnariose* (Deterioração das nadadeiras; Deterioração das brânquias). Doença bacteriana causada por *Flavobacterium columnare*. Os sinais clínicos incluem nadadeiras e brânquias irregulares ou corroídas, lesões esbranquiçadas ou cinzas no corpo e boca e lesões profundas na cabeça, podendo haver exposição da musculatura e ossos do crânio (Kubitza, 2000b; Figueiredo, 2007; Roberts, 2012). As bactérias podem ser cultivadas, a partir de homogenatos do tecido afetado, em meio de cultura para *Cytophaga* (Kent, Spitsbergen et al., 2015).

5.5.4. *Edwardsiellose*. Doença bacteriana causada pelas espécies *Edwardsiella tarda* e *Edwardsiella ictaluri*, que possuem caráter zoonótico. Ocorrem lesões cutâneas na cabeça, musculatura e cauda, podendo haver exposição da musculatura com presença de abscessos com tecido necrótico, bolhas gasosas e mau odor (Baraúna, 2008; Roberts, 2012). Como manifestação típica das septicemias Gram-negativas em peixes, causa alta mortalidade e eritema difuso nos animais sobreviventes. Em zebrafish, o diagnóstico pode ser obtido através de secções coradas com hematoxilina e eosina, revelando alterações necróticas no prosencéfalo, nervos e narinas (Kent, Spitsbergen et al., 2015). O diagnóstico confirmatório pode ser obtido por cultura em ágar sangue ou ágar infusão de cérebro e coração (BHI) e identificação bioquímica da bactéria. A amplificação de uma sequência específica de rDNA (AF310622) pode auxiliar no diagnóstico molecular (Kent, Spitsbergen et al., 2015).

5.5.5. Estreptococose (Doença da natação espiralada). Doença bacteriana causada por *Streptococcus iniae*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. ictaluri* e *Enterococcus* sp que provoca alta mortalidade. Os peixes apresentam natação em forma de espiral (rodopios), perda de equilíbrio, letargia, hiperpigmentação do corpo, aspecto corporal curvado em forma de ‘S’, exoftalmia, opacidade e hemorragia ocular, ascite e hemorragia opercular difusa. Pode causar septicemia, sendo o cérebro o principal órgão afetado determinando encefalite (Kubitza, 2000b; Figueiredo, Mian et al., 2007; Mian, Godoy et al., 2009).

5.5.6. Microesporidiose neural. Doença fúngica causada por parasitos intracelulares (*Pseudoloma neurophilia*) de ciclo de vida complexo, transmitido por canibalismo ou por transmissão vertical. Associada à emaciação severa e curvatura espinhal, mas esses sinais não são específicos para a doença. O sítio primário da infecção é o sistema nervoso central e raízes nervosas; os esporos podem ser visualizados em cortes histológicos de rotina, mas sua detecção é facilitada por coloração de Gram (Kent, Spitsbergen et al., 2015). O parasito pode se alojar em estruturas importantes no controle do comportamento defensivo, sendo altamente relevante para pesquisadores que estudam variáveis comportamentais em zebrafish (Spagnoli, Xue et al., 2015). Testes moleculares para *P. neurophilia* por PCR são altamente específicos e sensíveis (Kent, Spitsbergen et al., 2015). Em sistemas de recirculação, a utilização de esterilizadores ultravioleta (30.000-50.000  $\mu\text{Wsec/cm}^2$ ) é necessária para eliminar o parasito (Kent, Spitsbergen et al., 2015).

5.5.7. Granuloma visceral das tilápias. Doença bacteriana causada por *Francisella* sp. Os sinais clínicos não específicos incluem anorexia, letargia, natação errática e exoftalmia. As brânquias apresentam granulomas brancos, sendo o mesmo aspecto visto internamente no baço, rins, gônadas e coração (Kubitza, 2008; Colquhoun e Duodu 2011).

5.5.8. Saprolegiose. Infecção causada por fungos da família Saprolegniaceae, com destaque para os gêneros *Saprolegnia*, *Achlya* e *Dictyuchus*. A espécie *S. parasitica* é um dos fungos parasitos mais frequentes em peixes. Áreas despigmentadas, necrosadas e cobertas por material que lembram tufo de algodão ao longo do corpo são os sinais mais específicos da doença, além de lesões musculares, infecção branquial que pode levar à asfixia, letargia. Casos crônicos, desencadeados por estresse ambiental, não apresentam gravidade em si, mas sim por infecções bacterianas secundárias que podem se desenvolver (Kubitza, 2000b).

5.5.9. Doença epiteliocística. Cistos na pele e no epitélio branquial causados por organismos dos grupos *Rickettsia* e *Chlamydia*. Pode ocorrer de forma assintomática, sendo o número de cistos insuficiente para determinar a patologia (Lima, Machado et al., 2001).

5.5.10. Ictiofitiríase (Doença dos pontos brancos). Doença causada pelo protozoário ciliado *Ichthyophthirius multifiliis*. Pontos brancos visíveis a olho nu aparecem nas brânquias, nadadeiras e pele, juntamente com excessiva produção de muco. As lesões podem favorecer o estabelecimento de infecção bacteriana ou fúngica secundária e, se ocorrerem de forma severa nas brânquias, podem dificultar a ventilação (Kubitza, 2000b).

5.5.11. Outros protozoários ectoparasitas. Pequenas quantidades são geralmente encontradas em tilápias aparentemente saudáveis, determinando grandes infestações quando há variação brusca nas condições de cultivo que determinam desequilíbrio na relação peixe-parasito-ambiente (manejo excessivo, desbalanço nutricional, alta densidade de estocagem, alta carga orgânica, etc). Ocorrem na superfície do corpo, nadadeiras, cavidade bucal, olhos, tecido subcutâneo e brânquias. Os peixes apresentam prurido, aumento na produção de muco, letargia e boquejamento na superfície d'água devido à ventilação dificultada por grande infestação no epitélio branquial. Exemplos: *Trichodina compacta*, *Trichodina magna*, *Piscinoodinium pillulare*, *Epistylis* sp., *Cichlidogyrus halli*, *Cichlidogyrus thurstonae*, *Cichlidogyrus* sp., *Scutogyrus longicornis*, *Chilodonella* sp., *Piscinoodinium* sp., *Ichthyobodo* e *Amyloodinium* sp. (Kubitza 2000b; Zago, Franceschini et al., 2014).

5.5.12. Monogeneas. *Dactylogyrus* sp. e *Gyrodactylus* sp apresentam o mesmo quadro de protozoários ectoparasitas.

5.5.13. Crustáceos parasitas. Os microcrustáceos *Lernaea cyprinacea*, *Ergasilus* sp. (“larvas das brânquias”), *Argulus* sp. (“piolho dos peixes”) e *Dolops* sp. já foram observados parasitando tilápias. Infestações por estes organismos levam a depreciação do valor comercial e propensão a doenças fúngicas e bacterianas secundárias. Fixam-se à pele e brânquias, comprometendo a ventilação. O *Argulus* se alimenta dos fluídos dos peixes, causando anemia e redução no crescimento, além de servir como vetor de vírus e bactérias (Kubitza, 2000b).

## 5.6. Indicadores mais frequentes de estresse em zebrafish são:

a) mudança de coloração - a mudança ocorre em função de estresse fisiológico, subordinação social e muito comumente estímulos ambientais;

b) anormalidades morfológicas – os indicadores mais comuns de estresse são anormalidades nas brânquias, olhos e nadadeiras. Observa-se opacidade nas nadadeiras e a descoloração nas brânquias, alterações que ocorrem como consequência de múltiplos fatores e que podem indicar a presença de um problema crônico subjacente, associado à má qualidade da água;

c) taxas de crescimento - podem variar de acordo com a genética, parâmetros ambientais, densidade e nutrição. Uma taxa de crescimento reduzida, especialmente nos primeiros estágios de vida, pode ser um indicativo de estresse crônico, de que o sistema de criação não está adequado; e

d) desempenho reprodutivo – muitos são os fatores que podem provocar alteração no desempenho reprodutivo, e, dentre os principais, podemos citar: desequilíbrio nutricional, desequilíbrio na química da água, perturbações no ambiente e idade do animal.

e) alterações comportamentais visíveis – o nado errático, letargia, imobilidade e a alteração no padrão do nado podem ser alguns sintomas que indiquem a existência de agentes estressores em peixe zebra (Kalueff, Gebhardt et al., 2013).

## **VI - PROCEDIMENTOS EM ATIVIDADES DE ENSINO OU PESQUISA CIENTÍFICA**

Procedimentos que envolvam exames clínicos, cirurgia, anestesia e diagnóstico devem ser realizados por médicos veterinários, ou por pessoal treinado, na presença de um médico veterinário.

6.1. O manejo dos peixes deve ser realizado em ambiente calmo, pois os animais podem se estressar facilmente. Os animais devem ser retirados dos aquários com puçá e imediatamente colocados em água com anestésico. A anestesia é uma importante ferramenta na tentativa de manter a homeostasia dos peixes e minimizar as consequências deletérias de diversas operações, mas que pode promover efeitos indesejáveis *per se*, uma vez que são muitas as variáveis envolvidas (Maricchiolo e Genovese 2011). Ver adiante os procedimentos para a anestesia.

6.2. É importante que todo o manejo dos animais seja realizado utilizando-se um pano ou toalha molhada para que a região das brânquias e opérculo seja mantida úmida. Deve-se evitar qualquer contato das mãos com o corpo dos animais, evitando



assim a retirada de muco e/ou escamas, o que pode ocasionar lesões. Após imersão dos animais no anestésico, as seguintes características comportamentais devem ser observadas:

a) movimentos operculares sem ritmo;

b) o equilíbrio começa a ficar prejudicado e o animal apresenta dificuldades para manter o equilíbrio, mesmo parado;

c) ocorre perda total do equilíbrio e os animais não conseguem permanecer na posição vertical. Em alguns casos, podem até mesmo ficar com a região ventral voltada para cima; e

d) incapacidade de reagir a qualquer estímulo. Nesta etapa, o animal pode ser capturado com o puçá para os procedimentos experimentais. Para reverter os efeitos da anestesia, deve-se colocar o animal em água sem a adição de nenhum produto químico, bem oxigenada, e se possível, colocá-lo em água corrente. Em poucos minutos, o animal retorna ao seu comportamento inicial.

#### **6.4. Administração de substâncias**

6.4.1. A forma menos invasiva de se administrar substâncias a peixes é em 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 via banho de imersão (Carpenter, 2005; Sutili, Gressler et al., 2013). No caso de administração de anestésicos, no entanto, peixes grandes e/ou com respiração aérea obrigatória requerem o uso de aspersão do fármaco diretamente nas brânquias. Este procedimento garante que o anestésico chegue à corrente sanguínea nestes espécimes, como por exemplo o pirarucu, que apresentam baixa frequência de batimento opercular e que não sobreviveriam a banhos de imersão (Honczaryk e Inoue 2009).

6.4.2. Em se tratando de terapia parenteral, as vias subcutânea, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal e intracelomática podem ser utilizadas. A musculatura dorsal, ventrolateralmente à nadadeira dorsal, é o local de eleição 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, Uczay et al., 2013). Na aplicação de hormônios exógenos para estimular a liberação de gametas, estes normalmente são aplicados na base da nadadeira peitoral ou dorsal.

6.4.3 Injeções intraperitoneais são procedimentos muito utilizados em experimentação animal pois a cavidade peritoneal oferece grande superfície de absorção a partir da qual as substâncias entram rapidamente na circulação (Valle et al 1991).

### **6.5. Colheita de tecidos, fluidos, secreções, excreções e ectoparasitos.**

6.5.1. Biópsias externas (pele, escamas, nadadeiras e brânquias) podem auxiliar no diagnóstico de enfermidades bacterianas, virais, fúngicas e parasitárias e ainda identificação de nódulos tumorais. O peixe pode ser contido manualmente ou ainda ser submetido à anestesia. No entanto, o uso desta pode causar grande perda de ectoparasitas ou deixá-los imóveis, o que dificulta a visualização (Eiras, Takemoto et al., 2000; Callahan e Noga, 2002).

6.5.2. 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). Os instrumentos cirúrgicos devem ser esterilizados.

6.5.3. 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. As fezes também podem ser obtidas via sonda cloacal.

6.5.4. Quanto à coleta 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 delicadamente 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, Takemoto et al., 2000; Yanong, 2006).

6.5.5. 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, Takemoto et al., 2000).

6.5.6. No caso de suspeita de enfermidade bacteriana em uma grande população de peixes, 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 de suspeita de infecção sistêmica. A região a ser amostrada deve ser externamente desinfetada 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).

6.5.7. 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, localizados ventrolateralmente à medula espinhal. 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, Wlasow et al., 2007; Zahl, Kiessling et al.,

2010; Gholipourkanani e Ahadizadeh, 2013; Gomulka, Wlasow et al., 2014; Gressler, Sutili et al., 2015). A punção intracardiaca é menos utilizada, sendo a anestesia indispensável neste caso. Anticoagulantes (por ex., heparina, EDTA) são utilizados em quantidade mínima apenas para umedecer internamente a agulha e a seringa (Ranzani-Paiva, de Páuda et al., 2013). A padronização hematológica deve levar em conta os parâmetros ambientais

## **6.6. Estudos embrionários e larvais**

6.6.1. Os ovos e embriões devem ser mantidos em incubadoras, preferencialmente cônicas, com fluxo constante de água. Nestas condições, a primeira clivagem do embrião do lambari ocorre entre 20 e 30 minutos a partir da fertilização. O período de incubação médio dos embriões até a eclosão das larvas é de cerca de 11 horas. Não são utilizados rotineiramente tratamentos com medicamentos na incubação de ovos e larvas de lambari.

## **6.7. Modificação de ingestão de alimento**

6.7.1. Pode ser feita através de alteração na composição das rações a serem oferecidas. Evitar, sempre que possível, a intubação esofágica.

## **6.8. Cirurgia experimental**

6.8.1. 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 gastrintestinal, minimizando inconvenientes como a regurgitação (Glover e Hogstrand, 2002). A canulação da aorta dorsal permite o monitoramento de parâmetros sanguíneos e/ou plasmáticos através de coletas repetidas (Gingerich e Drottter 1989; Belanger, Son et al., 2001; Lo, Chang et al., 2003; Kiessling, Johansson et al., 2009; Djordjevic, Kristensen 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, Tetens et al., 1984; McLean e Ash, 1989; Belanger, Son et al., 2001; Karlsson, Rosseland et al., 2012). O cateterismo urinário tem sido realizado para estudar as funções renais e da bexiga urinária (Wood e 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, Refstie et al., 2000; Deng, Refstie et al., 2001; Fan, Teh 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, Smith et al., 2000; Cooke e Wagner 2004; Erickson e Webb, 2007; Harms e Lewbart 2011); biópsias teciduais (Gilliland, 1994; Grant, 1996; Murray, 2010); e cirurgias reprodutivas, com ou sem o uso de técnicas endoscópicas (Hernandez-Divers, Bakal et al., 2004; Paragamian, Beamesderfer et al., 2005; Webb e Erickson, 2007; Divers, Boone et al., 2009; Matsche, Bakal et al., 2011). Em zebrafish, o uso do protocolo de lesão mecânica direta da região medial telencefálica demonstrou resultados eficientes para estudos relacionados à regeneração celular em sistema nervoso central sem causar mortalidade significativa dos animais (März, Schmidt et al., 2011; Baumgart, Barbosa et al., 2012)). Todos esses procedimentos devem ser feitos em peixes sob anestesia profunda.

## **VII - CUIDADOS NO MANEJO**

### **7.1. Cuidados pré e pós-operatórios**

7.1.1. 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).

7.1.2. O jejum de no mínimo 24 horas é necessário para evitar regurgitação e bloqueio dos ramos branquiais durante a anestesia profunda (Lewbart e 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).

7.1.3. 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, Kishimori et al., 2005)). No caso de peixes com respiração aérea obrigatória, a recuperação da anestesia é feita por meio de lavagem das brânquias por aspensão de água limpa, observando-se a tomada de ar voluntária ((Honzaryk e Inoue, 2009)).

## **7.2. Analgesia**

7.2.1. 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, Braithwaite et al., 2003; Dunlop e Laming, 2005; Ashley, Sneddon et al., 2007; Roques, Abbink et al., 2010; Wolkers, Barbosa Junior 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 ventilação rápida, 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).

7.2.2. A maioria dos relatos do uso de analgésicos em peixes refere-se aos opióides butorfanol e morfina (Lewbart, Spodnick et al., 1998; Sneddon, Braithwaite et al., 2003; Harms e Lewbart, 2000; Harms, Kishimori et al., 2005; Nordgreen, Garner et al., 2009; Weber, Weisse et al., 2009). O sistema nervoso central (SNC) de peixes apresenta receptores opióides  $\mu$  e  $\kappa$ . Então, parece razoável que opiáceos sejam capazes de produzir analgesia nestes animais (Chervova e Lapshin 2000; Harms, Kishimori et al., 2005; Velasco, Law et al., 2009; Wolkers, Barbosa Junior et al., 2013)).

7.2.3. As propriedades analgésicas de anti-inflamatórios 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, Weisse et al., 2009; Roberts, 2010; Sneddon, 2012). Fármacos com ação analgésica podem ser administrados

nestes animais pelas vias intramuscular, subcutânea e intracelomática (Carpenter 2005).

### **7.3. Anestesia**

7.3.1. 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, Hammell et al., 1997; King, Hooper et al., 2005; Sneddon, 2012; Zahl, Samuelsen et al., 2012). Os anestésicos recomendados pelo CFMV para peixes são: barbitúricos ou outros anestésicos gerais injetáveis, halotano, isoflurano, sevoflurano, MS-222 e hidrocloreto de benzocaina

7.3.2. 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, Heard et al., 2003).

7.3.3. Em diversos países, os anestésicos sintéticos mais comumente utilizados para anestésiar peixes em banho de imersão são o MS-222, a benzocaína, o etomidato, o metomidato, o fenoxietanol e a quinaldina (Ross e 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, Parodi et al., 2012a) e subsequentes estudos testaram seu uso em variadas espécies de peixe, empregando diferentes protocolos experimentais (Gholipourkanani e Ahadizadeh, 2013; Gomulka, Wlasow et al., 2014; Gressler, Sutili et al., 2015).

7.3.4. Estudos avaliando protocolos anestésicos variados para objetivos distintos (ex: transporte, biometria, coleta de amostra biológica) em tilápias, principalmente *O. niloticus*, são frequentes. Quando testado em baixas concentrações diluídas na água, o propofol (0,15, 0,30 e 0,60 mL/L) promoveu anestesia eficiente e não causou efeitos genotóxicos e mutagênicos (Valença-Silva, Braz et al., 2014). De

forma semelhante, o eugenol promoveu anestesia mesmo nas mais baixas concentrações testadas (50, 75, 100, 150, 200 e 250 mg/L) (Vidal, Albinati et al., 2008) e a benzocaína produziu sedação adequada na concentração de 190 mg/L (Okamura, Araújo et al., 2010). Já a associação de tiletamina e zolazepam administrada via intramuscular (5, 10, 20, 30, 40 e 60 mg/kg) não induziu a níveis anestésicos (Borin, Crivelenti et al., 2010).

7.3.5. 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, Nekoubin et al., 2012; Sutuli, Gressler 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, Barros et al., 2010; Azambuja, Matiazzi et al., 2011; Becker, Parodi et al., 2012; Benovit, Gressler et al., 2012; Gressler, Riffel et al., 2012b; Toni, Becker et al., 2014). Além desses, ainda o mentol pode ser utilizado (Simões e Gomes, 2009).

7.3.6. A anestesia em peixes é um tema relativamente recente e o conhecimento sobre o uso ou não uso de determinados anestésicos provem do objetivo real do estudo bem como da base empírica existente da literatura de outros modelos animais (Cressey, 2014). Estudos atuais têm demonstrado que apesar do amplo uso do banho de imersão do metanossulfonato de MS-222 como um anestésico eficiente para o peixe zebra, a espécie tende a evitar o contato com o composto em um modelo de estudo utilizando tanque de preferência (Wong, von Keyserlingk et al., 2014). Tais achados tem indicado a real necessidade de um estudo mais aprofundado sobre procedimentos de anestesia e bem-estar de peixes. Em contrapartida, foi demonstrado que, para peixes de pequeno porte (até aproximadamente 3 a 4 cm), como o peixe zebra, a diminuição gradativa da temperatura da água ( $28^{\circ}\text{C} \rightarrow 17^{\circ}\text{C} \rightarrow \approx 10^{\circ}\text{C}$ ) apresenta resultados significativos para a anestesia prévia a procedimentos de curta duração (por exemplo, em protocolos que necessitem da realização de injeção intraperitoneal) bem como anterior à eutanásia sem causar lesão na pele dos peixes (Kinkel, Eames et al., 2010; Collymore, Tolwani et al., 2014)). Basicamente, tal procedimento pode ser empregado para peixes adultos e caracteriza-se por não apresentar riscos de alteração de parâmetros metabólicos significativos em



comparação ao procedimento que utiliza agentes químicos anestésicos, podendo ser empregada de modo repetitivo para um mesmo animal. A recuperação dos peixes pode ocorrer rapidamente após a imersão em água de clorada com níveis saturados de O<sub>2</sub> dissolvido ( $\approx 7,8$  mg/L) a uma temperatura de 28°C.

7.3.7. Inicialmente, em peixes de respiração aquática, os anestésicos induzem um efeito sedativo. Em seguida, há perda de equilíbrio, mobilidade, consciência e, por fim, de ação reflexa ((Ross e Ross, 2008)). Tais mudanças correspondem a estágios de indução à anestesia (Tabela IV), sendo o nível de depressão anestésica monitorado de acordo com o objetivo do procedimento.

**Tabela IV - Estágios de indução à anestesia de peixes de respiração aquática (modificado de Schoettger e Julin, 1967).**

<b>Estágio</b>	<b>Descritor</b>	<b>Comportamento do peixe</b>
0	Normal	Nado ativo; reativo a estímulos externos; equilíbrio normal; tônus muscular normal
I.1	Sedação leve	Nado voluntário continua; leve perda de reatividade a estímulos visuais e táteis; frequência respiratória normal; equilíbrio normal; tônus muscular normal
I.2	Sedação profunda	Desaceleração e cessação do nado voluntário; movimentos não-coordenados; perda total de reatividade a estímulos visuais e táteis; leve diminuição na frequência respiratória; equilíbrio normal; tônus muscular levemente diminuído; ainda responde a mudanças de posição
II.1	Narcolese leve	Fase de excitação pode preceder um aumento na frequência respiratória; perda do tônus; ainda responde fracamente a mudanças de posição
II.2	Narcolese profunda Estágio de tolerância	Deixa de responder a mudanças de posição; diminuição na frequência respiratória para aproximadamente normal; perda total do equilíbrio; ausência de esforços para corrigir a postura; tônus muscular diminuído; alguma reatividade a estímulos táteis e vibracionais fortes  <b>Permite retirada de amostras externas, biópsia das guelras, e biópsia das nadadeiras</b>
III.1	Anestesia leve	Perda total do tônus muscular; responde à pressão profunda; diminuição na frequência respiratória  <b>Permite procedimentos cirúrgicos menores</b>
III.2	Anestesia cirúrgica	Perda completa de nocicepção e reatividade, relaxamento muscular completo; respiração lenta e bradicardia; perda total de resposta a estímulos  <b>Permite qualquer procedimento cirúrgico</b>
IV	Colapso medular	Estágio irreversível; colapso medular leva à morte <b>Permite eutanásia</b>

A recuperação pode ser classificada nos seguintes estágios:

1. Estágio I: Corpo imobilizado, mas movimentos operculares se iniciando.
2. Estágio II: Movimentos operculares regulares e movimentos corporais grosseiros se iniciando.
3. Estágio III: Equilíbrio recuperado, aparência similar à anterior à aplicação do anestésico.

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.

## **7.4 Cirurgia**

7.4.1. 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, podem 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, Weisse et al., 2009).

7.4.2. 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, Hsu et al., 1993; Wildgoose, 2000).

7.4.3. A constatação de desordens internas requer diagnóstico via equipamentos de imagem ou laparotomia exploratória (Harms, Bakal et al., 1995; Lewbart, Spodnick et al., 1998).

7.4.4. 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 e Harms, 1999; Brattelid e 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.

## **7.5 Eutanásia**

7.5.1. A eutanásia é utilizada com o intuito de causar a morte rápida de animais com o mínimo de dor e sofrimento possíveis. 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). Devem ser seguidas as recomendações publicadas na Diretriz da Prática de Eutanásia do CONCEA.

## **7.6 Necropsia**

7.6.1. Em estudos biomédicos com uso de peixes como modelo animal 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).

7.6.2. 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).

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

7.6.4. 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.

## **7.7 Descarte de carcaças**

7.7.1. Como todo resíduo sólido, as carcaças de peixes são consideradas um risco à saúde pública e ao meio ambiente, sendo as secreções e os fluídos provenientes destes excelentes meios de cultura e de disseminação de patógenas e contaminantes. As carcaças de peixes, bem como os restos de tecidos de animais necropsiados, devem ser acondicionados em sacos plásticos específicos para descarte de material biológico devidamente selados e identificados de acordo com a simbologia adotada internacionalmente, isto é, Material Infeccioso (Risco Biológico). Após embalado, o material pode ser mantido em câmaras frias (ou freezers a -18 °C) por um período de até 24 horas, devendo então ser recolhido por empresas especializadas e transferido ao seu destino final. Alguns destinos possíveis são aterros sanitários, autoclavação e incineração (Cardoso, 2002). Alternativamente, pode-se fazer uso de compostagem, que representa uma maneira econômica e ambientalmente correta de destino de carcaças, mas que requer adequações a critérios rígidos para sua utilização (Genova, Campus et al., 2014).

7.7.2. Com exceção de linhagens domesticadas muito bem domesticadas e caracterizadas, como é o caso do zebrafish e das tilápias-do-Nilo de laboratório, com procedência oficial registrada na publicação, para cada estudo amostra(s) de exemplares-testemunho ("voucher") deve(m) ser depositada(s) em coleção(ões) oficial(is) de museu(s) ou outr(a)s instituição(ões) de pesquisa com serviço de curadoria prevista no organograma (o que garante a preservação permanente da coleção). Para peixes, em geral a técnica de fixação após a eutanásia é a fixação em formalina (se o exemplar for de porte médio a grande, é aconselhável injetar a solução fixadora na musculatura e cavidade visceral); após 5-7 dias, o exemplar é lavado e preservado em álcool 70-75%. Esta providência é de grande importância, em primeiro lugar porque permite que a identificação seja checada por outros pesquisadores, um dos pressupostos do método científico, garantindo a confiabilidade desse aspecto do estudo. Além disso, em caso de alterações na sistemática do grupo a que pertence a espécie estudada, a existência de "vouchers" permite efetuar a correspondência no novo arranjo taxonômico. Por outro lado, não havendo espécimes testemunho, todo o estudo pode ser perdido pela impossibilidade de se fazer tal correspondência.

7.7.3. No caso de excedentes, se os exemplares estiverem muito mutilados ou se o experimento envolver o uso de substâncias tóxicas e/ou que interfiram ou impossibilitem a preservação em coleções taxonômicas, as carcaças devem ser descartadas, seguindo-se protocolos específicos. Os indivíduos, bem como restos de

órgãos e tecidos, devem ser acondicionados em recipientes próprios para descarte de material biológico, devidamente selados e identificados. O material deve ser mantido resfriado até o recolhimento por empresas especializadas em destinação deste tipo de resíduo.

7.7.4. Finalmente, se a decisão for não eutanasiar os peixes após o estudo, estes, em hipótese alguma, devem ser devolvidos ao habitat natural, mesmo que se trate exatamente do mesmo local de sua coleta, o que seria o mais próximo de uma situação teoricamente ideal de soltura, em vista do risco de introdução de patógenos e parasitas adquiridos no laboratório. Esses exemplares vivos devem continuar a ser mantidos em cativeiro, podendo, dentro do princípio dos três Rs, ser utilizados em estudos sobre bem-estar em peixes ou mesmo para fins didáticos e paradidáticos.

### **Referências bibliográficas**

Adolfi, M. C., A. C. Carreira, L. W. Jesus, J. Bogerd, R. M. Funes, M. Schartl, M. C. Sogayar e M. I. Borella (2015). "Molecular cloning and expression analysis of *dmrt1* and *sox9* during gonad development and male reproductive cycle in the lambari fish, *Astyanax altiparanae*." Reprod Biol Endocrinol **13**: 2.

Ashley, P. J., L. U. Sneddon e C. R. McCrohan (2007). "Nociception in fish: stimulus-response properties of receptors on the head of trout *Oncorhynchus mykiss*." Brain Res **1166**: 47-54.

Azambuja, C. R. M., J. Matiazzi, A. P. Riffel, I. A. Finamor, L. O. Garcia, C. G. Heldwein, B. M. Heinzmann, B. Baldisserotto, M. A. Pavanato e S. F. Llesuy (2011). "Effect of the essential oil of *Lippia alba* on oxidative stress parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) subjected to transport." Aquaculture International **319**: 156-161.

Baraúna, L. C. R. I. (2008). Utilização de megadoses de vitamina C na ração de alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidos à infecção experimental por *Edwardsiella tarda*. Mestrado, Universidade Federal da Bahia.

Barreto, R. E., G. G. Carvalho e G. L. Volpato (2011). "The aggressive behavior of Nile tilapia introduced into novel environments with variation in enrichment." Zoology (Jena) **114**(1): 53-57.

Batista, L. (2010). Papel do Enriquecimento Ambiental na cognição de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). Monografia, Universidade Federal do Paraná.

Baumgart, E. V., J. S. Barbosa, L. Bally-Cuif, M. Gotz e J. Ninkovic (2012). "Stab wound injury of the zebrafish telencephalon: a model for comparative analysis of reactive gliosis." Glia **60**(3): 343-357.

Becker, A. G., T. V. Parodi, C. G. Heldwein, C. C. Zeppenfeld, B. M. Heinzmann e B. Baldisserotto (2012). "Transportation of silver catfish, *Rhamdia quelen*, in water with eugenol and the essential oil of *Lippia alba*." Fish Physiol Biochem **38**(3): 789-796.

Belanger, J. M., J. H. Son, K. D. Laugero, G. P. Moberg, S. I. Doroshov, S. E. Lankford e J. J. Cech (2001). "Effects of short-term management stress e ACTH injections on plasma cortisol levels in cultured white sturgeon, *Acipenser transmontanus*." Aquaculture **203**: 165-176.

Benovit, S. C., L. T. Gressler, L. L. Silva, L. O. Garcia, M. H. Okamoto, J. S. Pedron, L. A. Sampaio, R. V. Rodrigues, B. M. Heinzmann e B. Baldisserotto (2012). "Anesthesia and transport of Brazilian Flounder, *Paralichthys orbignyanus*, with essential oils of *Aloysia gratissima* and *Ocimum gratissimum*." Journal of the World Aquaculture Society **43**(6): .896–900.

Bettim, F.L., G.L. Galvan, M.M. Cestari, C.I. Yamamoto, H.C. Silva de Assis. (2016). "Biochemical responses in freshwater fish after exposure to water-soluble fraction of gasoline." Chemosphere, **144**:1467-1474.

Borin, S., L. Z. Crivelenti e C. A. P. Lima (2010). "Uso intramuscular da associação de tiletamina e zolazepam na anestesia de tilápias-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). ." Ciência Animal Brasileira **11**: 429-435.

Brambila-Souza, G. (2015). Biologia reprodutiva de fêmeas de *Astyanax fasciatus* com números de cromossomos diferentes vivendo em ambiente natural e no cativeiro. Master, Universidade de São Paulo.

Brattelid, T. e A. J. Smith (2000). "Methods of positioning fish for surgery or other procedures out of water." Lab Anim **34**(4): 430-433.

Brydges, N. M. e V. A. Braithwaite (2009). "Does environmental enrichment affect the behaviour of fish commonly used in laboratory work? " Applied Animal Behaviour Science **118**: 137-143.

Burka, J. F., K. L. Hammell, T. E. Horsberg, G. R. Johnson, D. J. Rainnie e D. J. Speare (1997). "Drugs in salmonid aquaculture--a review." J Vet Pharmacol Ther **20**(5): 333-349.

Callahan, H. A. e E. J. Noga (2002). "Tricaine dramatically reduces the ability to diagnose protozoan ectoparasite (*Ichthyobodo necator*) infections." Journal of Fish Diseases **25**: 433-437.

Cardoso, C. V. P. (2002). Descarte de carcaças. Rio de Janeiro, Editora FIOCRUZ.

Carpenter, J. W. (2005). Exotic Animal Formulary. St. Louis, MO, Elsevier Saunders.

Carvalho, T. B., F. Z. Mendonça, R. S. Costa-Ferreira e E. Gonçalves-de-Freitas (2013). "Exotic Animal Formulary." Zoologia **30**: 125-129.

Chehade, C., M. Cassel, M. I. Borella e F. G. Costa (2014). "Morphologic study of the liver of lambari (*Astyanax altiparanae*) with emphasis on the distribution of cytokeratin." Fish Physiol Biochem **40**(2): 571-576.

Chervova, L. S. e D. N. Lapshin (2000). "Opioid modulation of pain threshold in fish." Dokl Biol Sci **375**: 590-591.

Collins, M., T. Smith, W. Post e O. Pashuk (2000). "Habitat utilization and biological characteristics of adult Atlantic sturgeon in two South Carolina rivers." Transactions of American Fisheries Society **129**: 982-988.

Collymore, C., A. Tolwani, C. Lieggi e S. Rasmussen (2014). "Efficacy and safety of 5 anesthetics in adult zebrafish (*Danio rerio*)." J Am Assoc Lab Anim Sci **53**(2): 198-203.

Collymore, C., R. J. Tolwani e S. Rasmussen (2015). "The Behavioral Effects of Single Housing and Environmental Enrichment on Adult Zebrafish (*Danio rerio*)." J Am Assoc Lab Anim Sci **54**(3): 280-285.

Colquhoun, D. J. e S. Duodu (2011). "*Francisella* infections in farmed and wild aquatic organisms." Vet Res **42**: 47.

Cooke, S. J. e G. N. Wagner (2004). "Training, experience and opinions of researchers who use surgical techniques to implant telemetry devices into fish." Fisheries **29**: 10-18.

Correia, T. G. (2008). Influência do alumínio e do pH ácido sobre a fisiologia reprodutiva de peixes teleósteos continentais. Mestrado, Universidade de São Paulo.

Costa, A. B. (2003). Caracterização de bactérias do complexo *Aeromonas* isoladas de peixes de água doce e sua atividade patogênica. Mestrado, Universidade de São Paulo.



Costa, F. G., M. C. Adolphi, C. C. Gomes, L. W. Jesus, S. R. Batlouni e M. I. Borella (2014). "Testes of *Astyanax altiparanae*: the Sertoli cell functions in a semicyclic spermatogenesis." Micron **61**: 20-27.

Cressey, D. (2014). "Fish-kill method questioned." Nature **506**(7489): 419-420.

Cunha, M. A., F. M. C. Barros, L. O. Garcia, A. P. L. Veeck, B. M. Heinzmann, V. L. Loro, T. Emanuelli e B. Baldisserotto (2010). "Essential oil of *Lippia alba*: a new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*." Aquaculture **306**: 403-406.

Delicio, H. C. e R. E. Barreto (2008). "Time-place learning in food-restricted Nile tilapia." Behav Processes **77**(1): 126-130.

Delicio, H. C., R. E. Barreto, E. B. Normandes, A. C. Luchiari e A. L. Marcondes (2006). "A place preference test in the fish Nile tilapia." Journal of Experimental Animal Science **43**: 141-148.

Deng, D. F., S. Refstie, G.-I. Hemre, C. E. Crocker, H. Y. Chen, J. J. Cech e S. S. O. Hung (2000). "A new technique of feeding, repeated sampling of blood and continuous collection of urine in white sturgeon." Fish Physiology and Biochemistry **22**: 191-197.

Deng, D. F., S. Refstie e S. S. O. Hung (2001). "Glycemic and glycosuric responses in white sturgeon after oral administration of simple and complex carbohydrates." Aquaculture **199**: 107-117.

Divers, S., S. Boone, J. Hoover, K. Boysen, K. Killgore, C. Murray, S. George e A. Camus (2009). "Field endoscopy for identifying gender, reproductive stage and gonadal anomalies in free-ranging sturgeon (*Scaphirhynchus*) from the lower Mississippi River." Journal of Applied Ichthyology **25**: 68-74.

Djordjevic, B., T. Kristensen, O. Overli, B. O. Rosseland e A. Kiessling (2012). "Effect of nutritional status and sampling intensity on recovery after dorsal aorta cannulation in free-swimming Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)." Fish Physiol Biochem **38**(1): 259-272.

Dunlop, R. e P. Laming (2005). "Mechanoreceptive and nociceptive responses in the central nervous system of goldfish (*Carassius auratus*) and trout (*Oncorhynchus mykiss*)." J Pain **6**(9): 561-568.

Eiras, J. C., R. M. Takemoto e G. C. Pavanelli (2000). Métodos de Estudo e Técnicas Laboratoriais em Parasitologia de Peixes. Maringá, Eduem.

Erickson, D. e M. Webb (2007). "Spawning periodicity, spawning migration, and size at maturity of green sturgeon, *Acipenser medirostris*, in the Rogue River, Oregon." Environmental Biology of Fishes **79**: 255-268.

Fan, T. W., S. J. Teh, D. E. Hinton e R. M. Higashi (2002). "Selenium biotransformations into proteinaceous forms by foodweb organisms of selenium-laden drainage waters in California." Aquat Toxicol **57**(1-2): 65-84.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations (2015). "Cultured aquatic species information Programme - *Oreochromis niloticus* (Linnaeus,1758)." Fisheries and Aquaculture Department. Retrieved 05 de novembro de 2015.

Figueiredo, H. C. P. (2007). "Columnariose: Doença da piscicultura moderna. ." Panorama da aquicultura **17**: 32-37.

Figueiredo, H. C. P., G. A. C. Castro, C. A. G. Leal e C. O. Lopes (2008). "Quem tem medo de *Aeromonas*?" Panorama da Aquicultura **17**: 26-31.

Figueiredo, H. C. P., G. A. C. Castro, C. A. G. Leal e L. N. Netto (2009). "Quem tem medo de *Aeromonas*?" Panorama da Aquicultura **19**: 22-31.

Figueiredo, H. C. P., G. F. Mian e D. T. Godoy (2007). "Estreptococose em tilápia do Nilo - parte 1." Panorama da Aquicultura **19**: 36-38.

FishBase. (2015). "*Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) Nile Tilapia." Retrieved 5 de novembro de 2015.

Fleming, G. J., D. J. Heard, R. Francis Floyd e A. Riggs (2003). "Evaluation of propofol and medetomidine-ketamine for short-term immobilization of Gulf of Mexico sturgeon (*Acipenser oxyrinchus desotoi*)." J Zoo Wildl Med **34**(2): 153-158.

Galhardo, L., O. Almeida e R. F. Oliveira (2009). "Preference for the presence of substrate in male cichlid fish: Effects of social dominance and context." Applied Animal Behaviour Science **120**: 224-230.

Galhardo, L., J. Correia e R. F. Oliveira (2008). "The effect of substrate availability on behavioral and physiological indicators of welfare in the African cichlid (*Oreochromis mossambicus*)." Animal Welfare **17**(239-254).

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

Genova, G. J., W. C. Campus, D. A. M. Ferro e C. C. Martins (2014). "Compostagem de peixe tipo tilápia." Anais do Fórum de Iniciação Científica da FUNEC **5**(5).

Gholipourkanani, H. e S. Ahadizadeh (2013). "Use of propofol as an anesthetic and its efficacy on some hematological values of ornamental fish *Carassius auratus*." Springerplus **2**(1): 76.

Gilliland, E. R. (1994). "Comparison of absorbable sutures used in Largemouth Bass liver biopsy surgery." Progressive Fish-Culturist **56**: 60-61.

Gingerich, W. H. e K. R. Drottar (1989). "Plasma catecholamine concentrations in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) at rest and after anesthesia and surgery." General and Comparative Endocrinology **73**: 390-397.

Glover, C. N. e C. Hogstrand (2002). "In vivo characterisation of intestinal zinc uptake in freshwater rainbow trout." J Exp Biol **205**(Pt 1): 141-150.

Gomes, C. C. (2015). Expressão das diferentes formas de GnRH no encéfalo de lambari (*Astyanax altiparanae*). Doctorate, Universidade de São Paulo.

Gomes, C. C., F. G. Costa e M. I. Borella (2013). "Distribution of GnRH in the brain of the freshwater teleost *Astyanax altiparanae*." Micron **52-53**: 33-38.

Gomulka, P., T. Wlasow, M. Szczepkowski, L. Misiewicz e E. Ziomek (2014). "The effect of propofol anaesthesia on haematological and biochemical blood profile of European whitefish." Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **14**: 331-337.

Gonçalves, L. U., G. Parisi, A. Bonelli, F. R. Sussel e E. M. M. Viegas (2014). "The fatty acid compositions of total, neutral and polar lipids in wild and farmed lambari (*Astyanax altiparanae*) (Garutti & Britski, 2000) broodstock." Aquaculture Research **45**(2): 195-203.

Grant, G. C. (1996). "RNA-DNA ratios in white muscle tissue biopsies reflect recent growth rates of adult Brown Trout." Journal of Fish Biology **48**: 1223-1230.

Gressler, L. T., T. V. Parodi, A. P. Riffel, S. T. DaCosta e B. Baldisserotto (2012a). "Immersion anaesthesia with tricaine methanesulphonate or propofol on different sizes and strains of silver catfish *Rhamdia quelen*." J Fish Biol **81**(4): 1436-1445.

Gressler, L. T., A. P. K. Riffel, T. V. Parodi, E. E. H. Saccol, G. Koakoski, S. T. da Costa, M. A. Pavanato, B. M. Heinzmann, B. O. Caron, D. Schmidt, S. F. Llesuy, L. J. Barcellos e B. Baldisserotto (2012b). "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 **45**: 1061-1072.

Gressler, L. T., F. J. Sutili, S. T. da Costa, T. V. Parodi, S. Pes Tda, G. Koakoski, L. J. Barcellos e B. Baldisserotto (2015). "Hematological, morphological, biochemical and hydromineral responses in *Rhamdia quelen* sedated with propofol." Fish Physiol Biochem **41**(2): 463-472.

Harms, C. A., R. S. Bakal, L. H. Khoo, K. A. Spaulding e G. A. Lewbart (1995). "Microsurgical excision of an abdominal mass in a gourami." Journal of the American Veterinary Medical Association **207**(9): 1215-1217.

Harms, C. A., J. Kishimori, S. Boylan, G. A. Lewbart e C. Swanson (2005). "Behavioral and clinical pathology changes in koi carp (*Cyprinus carpio*) subjected to anesthesia and surgery with and without peri-operative analgesics." Comparative Medicine **55**(3): 221-226.

Harms, C. A. e G. A. Lewbart (2000). "Surgery in fish." Vet Clin North Am Exot Anim Pract **3**(3): 759-774.

Harms, C. A. e G. A. Lewbart (2011). "The veterinarian's role in surgical implantation of electronic tags in fish." The veterinarian's role in surgical implantation of electronic tags in fish. **21**: 25-33.

Hernandez-Divers, S. T., R. S. Bakal, B. H. Hickson, C. A. Rawlings, H. G. Wilson, M. Radlinsky, S. M. Hernandez-Divers e S. R. Dover (2004). "Endoscopic sex determination and gonadal manipulation in Gulf of Mexico sturgeon (*Acipenser oxyrinchus desotoi*)." Journal of Zoo and Wildlife Medicine **35**(4): 459-470.

Honzaryk, A. e L. A. K. A. Inoue (2009). "Anestesia do pirarucu por aspersão direta nas brânquias do eugenol em solução aquosa." Ciência Rural **39**: 577-579.

Imre, I., J. W. A. Grant e E. R. Keeley (2002). "The effect of visual isolation on territory size and population density of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)."  
Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **59**: 303-309.

Javahery, S., H. Nekoubin e A. H. Moradlu (2012). "Effect of anaesthesia with clove oil in fish (review)."  
Fish Physiol Biochem **38**(6): 1545-1552.

Jesus, L. W. O., G. S. Branco, M. P. Camargo, G. C. Melo, J. Bogerd e M. I. Borella (2014). Expression of gpha, fshb and lhb gonadotropin subunits during the annual reproductive cycle of female *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characiformes) in captivity. 27th Conference of European Comparative Endocrinologists, Rennes France.

Kalueff, A. V., M. Gebhardt, A. M. Stewart, J. M. Cachat, M. Brimmer, J. S. Chawla, C. Craddock, E. J. Kyzar, A. Roth, S. Landsman, S. Gaikwad, K. Robinson, E. Baatrup, K. Tierney, A. Shamchuk, W. Norton, N. Miller, T. Nicolson, O. Braubach, C. P. Gilman, J. Pittman, D. B. Rosemberg, R. Gerlai, D. Echevarria, E. Lamb, S. C. Neuhauss, W. Weng, L. Bally-Cuif, H. Schneider e C. Zebrafish Neuroscience Research (2013). "Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond."  
Zebrafish **10**(1): 70-86.

Karlsson, A., B. O. Rosseland, J.-C. Massabuau e A. LKiessling (2012). "Pre-anaesthetic metomidate sedation delays the stress response after caudal artery cannulation in Atlantic cod (*Gadus morhua*)."  
Fish Physiology and Biochemistry **38**: 401-411.

Kelley, K. M. (1993). "Experimental diabetes mellitus in a teleost fish. I. Effect of complete isletectomy and subsequent hormonal treatment on metabolism in the goby, *Gillichthys mirabilis*."  
Endocrinology **132**(6): 2689-2695.

Kent, M. K., J. M. Spitsbergen, J. M. Matthews, J. W. Fournie e M. Westerfield. (2015). "Diseases of zebrafish in research facility."

Kiessling, A., D. Johansson, I. H. Zahl e O. B. Samuelsen (2009). "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 **286**: 301-308.

King, W. V., B. Hooper, S. Hillsgrove, C. Benton e D. Berlinsky (2005). "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 **36**: 1442-1449.

Kinkel, M. D., S. C. Eames, L. H. Philipson e V. E. Prince (2010). "Intraperitoneal injection into adult zebrafish." J Vis Exp(42).

Kinkelin, P., C. H. Michel e P. Ghittino (1991). Tratado de las enfermedades de los peces. Espanha, Editora Acribia.

Klontz, G. W. (1971). In Animal Models for Biomedical Research, Symposium. Washington DC.

Kubitza, F. (2000a). "Qualidade da água, sistemas de cultivo, planejamento da produção, manejo nutricional e alimentar e sanidade. Parte I." Panorama da Aquicultura **10**: 44-53.

Kubitza, F. (2000b). "Principais parasitoses e doenças em tilápias." Panorama da Aquicultura **10**: 39-53.

Kubitza, F. (2008). "Tilápias na mira dos patógenos." Panorama da Aquicultura **18**: 28-37.

Kubitza, F., J. L. Campos, Ono, E.A. e P. I. Istchuk (2013). "Panorama da piscicultura no Brasil Parte IV: A sanidade na piscicultura, do ponto de vista dos produtores e técnicos." Panorama da Aquicultura **33**: 16-26.

Langecker, T. G., B. Neumann, C. Hausberg e J. Parzefall (1995). "Evolution of the optical releasers for aggressive behavior in cave-dwelling *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae)." Behavioural Processes **34**(2): 161-167.

Lawrence, C. (2007). "The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review." Aquaculture **269**: 1-20.

Lewbart, G. A. e C. Harms (1999). "Building a fish anesthesia delivery system." Exotic DVM **1**: 25-28.

Lewbart, G. A., G. Spodnick, N. Barlow, N. E. Love, F. Geoly e R. S. Bakal (1998). "Surgical removal of an undifferentiated abdominal sarcoma from a koi carp (*Cyprinus carpio*)." Vet Rec **143**(20): 556-558.

Lima, F. C., A. O. G. Machado, A. P. Borges, C. H. A. Lima, C. M. Andrade e E. F. M. Mesquita (2001). "Doença epiteliocística em *Tilapia nilotica* (Linnaeus, 1758) no estado do Rio de Janeiro, Brasil." Ciência Rural, Santa Maria **31**: 519-520.

Lo, W. Y., C. F. Chang e Y. L. Song (2003). "Evaluation of dorsal aorta cannulation for immunological studies of grouper (*Epinephelus malabaricus*)." Fish Shellfish Immunol **14**(4): 289-303.

Lowe, C. H. e W. G. Heath (1969). "Behavioural and physiological responses to temperature in the Desert pupfish, *Cyprinodon macularia*." Physiological Zoology **42**: 53-59.

Macêdo, J. A. B. (2004). Águas e águas. Belo Horizonte, CRQ-MG.

MAPA - Ministério da Agricultura, P. e. A. (2007). "Produção de tilápia: Mercado, espécie, biologia e recria." Circular Técnica **45**: 12.



Maricchiolo, G. e L. Genovese (2011). "Some contributions to knowledge of stress response in innovative species with particular focus on the use of the anaesthetics. ." The Open Marine Biology Journal **5**: 24-33.

Markovich, M. L., N. V. Rizzuto e P. B. Brown (2007). "Diet affects spawning in zebrafish." Zebrafish **4**(1): 69-74.

März, M., R. Schmidt, S. Rastegar e U. Strahle (2011). "Regenerative response following stab injury in the adult zebrafish telencephalon." Dev Dyn **240**(9): 2221-2231.

Matsche, M. A., R. S. Bakal e K. M. Rosemary (2011). "Use of laparoscopy to determine sex and reproductive status of shortnose sturgeon (*Acipenser brevirostrum*) and Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus oxyrinchus*)." Journal of Applied Ichthyology **27**: 627-636.

Matushima, E. R. (2006). Técnicas Necroscópicas. Tratado de Animais Selvagens. Z. S. S. Cubas, J. C. R.; Catão-Dias, J. L. . São Paulo, Roca. **Cap 61**: 980-990.

McLean, E. e R. Ash (1989). "Chronic cannulation of the hepatic portal vein in rainbow trout, salmo gairdneri: a prerequisite to net absorption studies." Aquaculture **78**: 195-205.

Merighe, G. K. F., E. M. Pereira-da-Silva, J. A. Negrão e S. Ribeiro (2004). "Efeito da cor do ambiente sobre o estresse social em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)." Revista Brasileira de Zootecnia **33**: 828-837.

Mian, G. F., D. T. Godoy, C. A. Leal, T. Y. Yuhara, G. M. Costa e H. C. Figueiredo (2009). "Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia." Vet Microbiol **136**(1-2): 180-183.

Murray, M. J. (2002). "Fish Surgery." Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine **11**(4): 246-257.

Murray, M. J. (2010). "Endoscopy in sharks." Vet Clin North Am Exot Anim Pract **13**(2): 301-313.

Nelson, J. C. (2006). Fishes of the World. Hoboken, New Jersey, John Wiley & Sons, Inc.

Nordgreen, J., J. P. Garner, A. M. Janczak, B. Ranheim, W. M. Muir e T. E. Horsberg (2009). "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 **119**: 101-107.

Okamura, D., F. G. Araújo, P. V. Rosa, R. T. F. Freitas, L. D. S. Murgas and M. P. Cesar (2010). "Influência da concentração de benzocaína e do comprimento dos peixes na anestesia e na recuperação de tilápias-do-Nilo." Revista Brasileira de Zootecnia **39**: 971-976.

Pádua, S. B., R. N. M. Filho e C. Cruz (2012). "Alevinos saudáveis: o ponto de partida para uma produção estável." Panorama da Aquicultura **22**: 30-37.

Pansonato-Alves, J. C., A. W. Hilsdorf, R. Utsunomia, D. M. Silva, C. Oliveira e F. Foresti (2013). "Chromosomal mapping of repetitive DNA and cytochrome C oxidase I sequence analysis reveal differentiation among sympatric samples of *Astyanax fasciatus* (Characiformes, Characidae)." Cytogenet Genome Res **141**(2-3): 133-142.

Paragamian, V., R. Beamesderfer e S. Ireland (2005). "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 **134**: 518-532.

Pavanelli, G. C., J. C. Eiras e R. M. Takemoto (2002). Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento. Maringá, Eudem.

Pazza, R., K. F. Kavalco, S. M. A. P. Prioli, A. J. Prioli e L. A. C. Bertollo (2007). "Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae), part 3: analysis of the RAPD and ISSR molecular markers." Biochemical Systematics and Ecology **35**: 843-851.

Piato, A. L. e D. B. Rosemberg (2014). Princípios éticos no uso do peixe-zebra como organismo-modelo na pesquisa científica. Ética em pesquisa com animais e humanos: Bem-estar e dignidade. N. A. G. PICHLER, A. C. V. V. . Passo Fundo, Editora Universidade de Passo Fundo.

Porto-Foresti, F., R. B. Castilho-Almeida, J. A. Senhorini e F. Foresti (2010). Biologia e criação do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). Espécies Nativas Para Piscicultura No Brasil. B. G. Baldisserotto, L.C. Santa Maria RS Brasil, Editora UFSM. **1**: 101-115.

Ranzani-Paiva, M. J. T., S. B. de Páuda, M. Tavares-Dias e A. I. Egami (2013). Métodos para análise hematológica em peixes. Maringá, Eduem.

Reed, B. e M. Jennings. (2011). "Guidance on the housing and care of Zebrafish *Danio rerio*." Retrieved <https://www.scilifelab.se/wp-content/uploads/2013/10/Guidance-zebrafish.pdf>.

Ribeiro, R. P. (2001). Espécies Exóticas. Fundamentos da Moderna Aquicultura. H. L. M. V. Moreira, L.; Ribeiro, R.P.; Zimmermann, S. . Canoas, Editora da ULBRA: 91-100.

Roberts, H. E. (2010). Anesthesia, analgesia, and euthanasia. Fundamentals of ornamental fish health. R. H.E. Ames (IA, Blackwell Publishing).

Roberts, R. J. (2012). Fish Pathology. The Bacteriology of Teleosts. R. J. Roberts. Edinburgh, W.B.Saunders: 339-382.

Roques, J. A., W. Abbink, F. Geurds, H. van de Vis e G. Flik (2010). "Tailfin clipping, a painful procedure: Studies on Nile tilapia and common carp." Physiol Behav **101**(4): 533-540.

Ross, L. G. e B. Ross (2008). Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals. Oxford, Blackwell Publishing.

Saccol, E. M. H., J. Uczay, T. Pês, I. A. Finamor, G. M. Ourique, A. P. K. Riffel, D. Schmidt, B. O. Caron, B. M. Heinzmann, S. F. Llesuy, R. Lazzari, B. Baldisserotto e M. A. Pavanato (2013). "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 **416-417**: 244-254.

Sarig, S. (1971). The prevention and treatment of diseases of warmwater fish under subtropical conditions, with special emphasis on intensive fish farming. Jersey City NJ THF Publications INC.

Schoettger, R. A. e A. M. Julin (1967). "Efficacy of MS-222 as an anaesthetic on four salmonids." Investigation of Fisheries Contribution, U.S. Department of Interior **13**: 1-15.

Simões, L. N. e L. C. Gomes (2009). "Eficácia do mentol como anestésico para juvenis de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*)." Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia **61**(3): 613-620.

Singh, V., D. K. Chaudhary, I. Mani, R. Jain e B. N. Mishra (2013). "Development of diagnostic and vaccine markers through cloning, expression, and regulation of putative virulence-protein-encoding genes of *Aeromonas hydrophila*." J Microbiol **51**(3): 275-282.

Siqueira-Silva, D. H., S. A.P.S, A. Ninhaus-Silveira e R. Veríssimo-Silveira (2015). "Morphology of the urogenital papill and its component ducts in *Astyanax altiparanae* Garutti & Briski, 200 (Characiformes: Characidae)." Neotropical Ichthyology **13**(2): 309-316.

Sneddon, L. U. (2012). "Clinical anesthesia e analgesia in fish." Journal of Exotic Pet Medicine. **21**: 32-43.

Sneddon, L. U., V. A. Braithwaite e M. J. Gentle (2003). "Do fishes have nociceptors? Evidence for the evolution of a vertebrate sensory system." Proc Biol Sci **270**(1520): 1115-1121.

Spagnoli, S., L. Xue e M. L. Kent (2015). "The common neural parasite *Pseudoloma neurophilia* is associated with altered startle response habituation in adult zebrafish (*Danio rerio*): Implications for the zebrafish as a model organism." Behav Brain Res **291**: 351-360.

Spence, R., G. Gerlach, C. Lawrence e C. Smith (2008). "The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*." Biol Rev Camb Philos Soc **83**(1): 13-34.

Sutili, F. J., L. T. Gressler e B. Baldisserotto (2014). "Clove Oil, eugenol effective anesthetics for silver catfish, other Brazilian species." The Global Aquacultur Advocate **May/June**.

Sutili, F. J., L. T. Gressler, A. C. Vargas, C. C. Zeppenfeld, B. Baldisserotto e M. A. Cunha (2013). "The use of nitazoxanide against the pathogens *Ichthyophthirius multifiliis* and *Aeromonas hydrophila* in silver catfish (*Rhamdia quelen*)." Vet Parasitol **197**(3-4): 522-526.

Toni, C., A. G. Becker, L. N. Simoes, C. G. Pinheiro, L. de Lima Silva, B. M. Heinzmann, B. O. Caron e B. Baldisserotto (2014). "Fish anesthesia: effects of the essential oils of *Hesperozygis ringens* and *Lippia alba* on the biochemistry and

physiology of silver catfish (*Rhamdia quelen*)." Fish Physiol Biochem **40**(3): 701-714.

Torrezani, C. S. (2012). A influência do enriquecimento ambiental no comportamento agressivo da tilápia do Congo *Tilapia rendalli*. Monografia, Universidade Estadual Paulista.

Umminger, B. L. e P. K. T. Pang (1979). ILAR News **22**: 12-18.

Valença-Silva, G., M. G. Braz, R. E. Barreto, D. M. F. Salvador e G. L. Volpato (2014). "Low dose of the anesthetic propofol does not induce genotoxic or mutagenic effects in Nile tilapia." Transactions of American Fisheries Society **143**: 414-419.

Valle, L. B. S. e e. al (1991). Farmacologia Integrada: fundamentos farmacológicos da terapêutica. Rio de Janeiro, Atheneu.

Velasco, E. M., P. Y. Law e R. E. Rodriguez (2009). "Mu opioid receptor from the zebrafish exhibits functional characteristics as those of mammalian Mu opioid receptor." Zebrafish **6**: 259-268.

Velisek, J., T. Wlasow, P. Gomulka, Z. Svobodova e L. Novotny (2007). "Effects of 2-phenoxyethanol anaesthesia on sheatfish (*Silurus glanis* L.)." Veterinari Medicina **52**: 103-110.

Vidal, L. V. O., A. C. L. Albinati, A. D. Lira, T. R. Almeida e G. B. Santos (2008). "Eugenol como anestésico para a tilápia-do-nilo." Pesquisa Agropecuária Brasileira **43**: 1069-1074.

Vieira, V. A., T. G. Correia e R. G. Moreira (2013). "Effects of aluminum on the energetic substrates in neotropical freshwater *Astyanax bimaculatus* (Teleostei: Characidae) females." Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol **157**(1): 1-8.

Volpato, G. L. and R. E. Barreto (2001). "Environmental blue light prevents stress in the fish Nile tilapia." Braz J Med Biol Res **34**(8): 1041-1045.

Volpato, G. L., C. R. Duarte e A. C. Luchiari (2004). "Environmental color affects Nile tilapia reproduction." Braz J Med Biol Res **37**(4): 479-483.

von Krogh, K., C. Sorensen, G. E. Nilsson e O. Overli (2010). "Forebrain cell proliferation, behavior, and physiology of zebrafish, *Danio rerio*, kept in enriched or barren environments/." Physiol Behav **101**(1): 32-39.

Webb, M. e D. Erickson (2007). "Reproductive structure of the adult green sturgeon, *Acipenser medirostris*, population in the Rogue River, Oregon." Environmental Biology of Fishes **79**: 305-314.

Weber, E. P., 3rd, C. Weisse, T. Schwarz, C. Innis e A. M. Klide (2009). "Anesthesia, diagnostic imaging, and surgery of fish." Compend Contin Educ Vet **31**(2): E11.

Weber, E. S., 3rd (2011). "Fish analgesia: pain, stress, fear aversion, or nociception?" Vet Clin North Am Exot Anim Pract **14**(1): 21-32.

Wells, R. M. G., V. Tetens e A. L. Devries (1984). "Recovery from stress following capture and anaesthesia of Antarctic fish: haematology and blood chemistry." Journal of Fish Biology **25**: 567-576.

Westerfield, M. (2007). The zebrafish book: a guide for the laboratory use of the zebrafish (*Danio rerio*). Oregon, University of Oregon Press.

Wildgoose, W. H. (2000). "Fiss surgery: an overview." Fish Veterinary Journal **5**: 22-36.

Wolkers, C. P., A. Barbosa Junior, L. Menescal-de-Oliveira e A. Hoffmann (2013). "Stress-induced antinociception in fish reversed by naloxone." PLoS One **8**(7): e71175.

Wong, D., M. A. G. von Keyserlingk, J. G. Richards e D. M. Weary (2014). "Conditioned Place Avoidance of Zebrafish (*Danio rerio*) to Three Chemicals Used for Euthanasia and Anaesthesia." PLoS ONE **9**(2): e88030.

Wood, C. M. e M. L. Patrick (1994). Methods of Assessing Kidney and Urinary Bladder Function in Fish. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes. P. W. M. Hochachka, T. P. Amsterdam, Elsevier: 127-142.

Wooster, G. A., H.-M. Hsu e P. R. Bowser (1993). "Nonlethal surgical procedures for obtaining tissue samples for fish health inspections." Journal of Aquatic Animal Health **5**: 157-164.

Wurts, W. A. (2002). "Alkalinity and hardness in production ponds." World Aquaculture **33**(2): 16-17.

Yanong, R. P. E. (2006). Peixes de Aquário. Atlas de Medicina, Terapêutica e Patologia de Animais Exóticos. R. H.-D. Aguilar, S. M.; Hernández-Divers, S. J. São Caetano do Sul SP, Interbook: 81-111.

Yasui, G. S., J. A. Senhorini, E. Shimoda, M. Pereira-Santos, L. S. Nakaghi, T. Fujimoto, L. Arias-Rodriguez e L. A. Silva (2015). "Improvement of gamete quality and its short-term storage: an approach for biotechnology in laboratory fish." Animal **9**(3): 464-470.

Zago, A. C., L. Franceschini, F. Garcia, S. H. Schalch, K. S. Gozi e R. J. Silva (2014). "Ectoparasites of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in cage farming in a hydroelectric reservoir in Brazil." Rev Bras Parasitol Vet **23**(2): 171-178.



Zahl, I. H., A. Kiessling, O. B. Samuelsen e R. E. Olsen (2010). "Anesthesia induces stress in Atlantic salmon (*Salmo salar*), Atlantic cod (*Gadus morhua*) and Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*)." Fish Physiol Biochem **36**(3): 719-730.

Zahl, I. H., O. Samuelsen e A. Kiessling (2012). "Anaesthesia of farmed fish: implications for welfare." Fish Physiol Biochem **38**(1): 201-218.