

# ANEXO DA RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 44 DO CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

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

### I - INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o debate em torno do uso de animais para atender às necessidades da saúde humana e animal se intensificou. A controvérsia maior está no uso de animais nas pesquisas biológicas, no ensino e nos testes de produtos comerciais. Com a criação do Concea (Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal), surgiram uma série de Resoluções Normativas que abrangem os cuidados com animais de laboratório e com suas instalações. Tanto a Lei nº 11.794, que rege a experimentação animal do Brasil, quanto as Normativas do Concea incluem, implícita ou explicitamente, os preceitos dos três R's (do inglês Reduction, Refinement e Replacement): **Redução** no número de animais necessários para pesquisa; **Refinamento** de técnicas que possam causar menos estresse ou sofrimento; **Substituição** de animais vivos por simulações ou culturas de células sempre que possível (RUSSELL & BURCH, 1959).

Segundo Cleveland e colaboradores (2002), o desenvolvimento na biologia celular e molecular contribuiu para diminuir o uso de animais em estudos e testes de produtos químicos.

A pesquisa com animais permitiu o entendimento de doenças como a varíola e a poliomielite e a imunização contra doenças anteriormente comuns e com frequência fatais, incluindo a difteria, a caxumba e a rubéola. Também ajudou a criar tratamentos para o câncer, diabetes, doenças cardíacas e psicoses maníaco-depressivas e, ainda, procedimentos cirúrgicos, incluindo cirurgia cardíaca, transfusões de sangue e remoção de catarata. As pesquisas sobre a AIDS ainda têm uma importante participação de animais (CLEVELAND *et al.*, 2002).

A busca de novos modelos experimentais tem se intensificado nos últimos anos devido à necessidade de atender os 3Rs. Os peixes têm se mostrado um bom modelo biológico, visto que eles exibem enorme diversidade em sua morfologia e em sua biologia. Segundo Nelson (2006), essa diversidade é, em parte, o que torna a compreensão da história evolutiva e o estabelecimento de uma classificação dos peixes tão difícil. Peixes-bruxa e lampreias, tubarões,

peixes ósseos a peixes pulmonados, eles incluem uma vasta gama de vertebrados distantes, mas relacionados. Com base na classificação cladística, os peixes ósseos, o grupo de peixes dominante em número de espécies, estão mais relacionados aos mamíferos do que aos tubarões por exemplo, o que os torna excelentes modelos experimentais. Apesar de sua diversidade, eles são importantes para os pesquisadores por causa da riqueza de informações que não foram ainda totalmente elucidadas (NELSON, 2006).

Outro ponto forte dos peixes como bons modelos biológicos é o fato de serem de imenso valor para os seres humanos. Eles têm sido um item básico na dieta de muitos povos e são importantes na economia de muitas nações, ao mesmo tempo em que apresentam valor recreativo e psicológico incalculável. Aspectos particulares de várias espécies se prestam a estudos de comportamento, ecologia, evolução, genética, fisiologia e toxicologia. São usados como indicadores gerais ou bioindicadores da poluição aquática, em parte pelo benefício direto e importância para os seres humanos (NELSON, 2006). O comportamento dos peixes é tão diverso quanto a sua morfologia. Eles são adaptados a uma grande variedade de dietas e vivem em quase todos os tipos conhecidos de habitat aquático. Podem produzir toxinas, venenos, eletricidade, som ou luz (NELSON, 2006).

Diante do exposto acima, várias espécies de peixes podem ser utilizadas como modelo experimental, sendo importante que o pesquisador escolha a espécie adequada para o seu delineamento experimental. O zebrafish (*Danio rerio*), um teleósteo da família Cyprinidae, conhecido como paulistinha no Brasil, é um bom exemplo. Inicialmente, foi utilizado por George Streisinger como modelo em seus estudos genéticos (STREISINGER *et al.* 1981). A produção científica nacional com uso do zebrafish, que inexistia há pouco mais de uma década, tem crescido de modo acelerado nos últimos anos, num ritmo maior do que no restante do mundo e seu uso foi detalhado na RN 34 do Concea, de 27 de julho de 2017.

Outro exemplo é o peixe teleósteo cavernícola, *Astyanax mexicanus*, pertencente à ordem Characiformes e intimamente relacionado ao zebrafish. Ele apresenta retinas degeneradas (o que o torna cego), acúmulo de gordura no fígado, níveis elevados de açúcar no sangue e de insulina - tudo isso pode significar problemas de saúde para os humanos, mas para eles são uma característica normal de sua biologia. Pesquisadores argumentam que estas adaptações do *A. mexicanus* podem lançar luz sobre doenças que acometem os humanos (PENNISI, 2016). Este peixe apresenta também sono caracterizado por períodos prolongados de quiescência e reduzida capacidade de resposta aos estímulos sensoriais. Coletivamente, os dados mostram que o *A. mexicanus* é um modelo poderoso para elucidar os mecanismos genéticos subjacentes à evolução comportamental (YOSHIZAWA *et al.*, 2015).

Mas não são só estes peixes que são utilizados como modelos experimentais. Aqui no Brasil, a tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus* - peixe introduzido), o tambaqui (*Colossoma macropomum*), o pacu (*Piaractus mesopotamicus*), o *Rhamdia quelen*, e muito outros são utilizados em vários estudos de fisiologia cardiorrespiratória e testes de memória (ARMELIN *et al.*, 2016; ZERAIK *et al.*, 2013; TAYLOR *et al.*, 2009; DELICIO & BARRETO, 2008; FLORINDO *et al.*, 2006, MATHIAS *et al.*, 2018).

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

## **1.1. Bem-estar animal**

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

necessariamente bem-estar assegurado. O cuidado com o bem-estar animal não deve se limitar apenas a identificar e sanar situações de bem-estar comprometido, mas também procurar promover condições para que os animais possam saciar sua motivação para realizar comportamentos recompensadores, melhorando seu bem-estar geral (MELLOR, 2016).

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

## **1.2. Senciência em peixes**

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

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

**a) estados gerais da consciência ou consciência primária:** a consciência primária não apresenta uma ligação clara com um conteúdo mental. Este tipo de consciência é responsável pelo controle da vigilância, da fadiga, do conforto, da percepção da duração temporal e do layout espacial e serve de suporte para tipos mais específicos ou complexos da consciência. Esses diferentes estados gerais da consciência podem ser afetados seletivamente por lesões

específicas do sistema nervoso e essas estruturas foram conservadas ao longo da evolução entre os vertebrados. Uma dessas estruturas é a formação reticular do tronco cerebral, onde se situam alguns agrupamentos celulares que originam vias ascendentes que se projetam difusamente para todas as regiões anteriores do sistema nervoso, inclusive para as regiões neocorticais, diferenciadas mais recentemente (HOFFMANN, 2008).

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

Neste contexto, é possível que os peixes apresentem estados da consciência primária como uma função do sistema nervoso (CHANDROO *et al.*, 2004). Tem sido sugerido que a consciência evoluiu gradativamente e que diferentes espécies de animais podem apresentar diferentes graus de consciência (DUNCAN, 1996). Sendo assim, a existência de uma consciência primária é uma justificativa plausível para se abordar a questão da percepção da dor e bem estar em peixes.

### 1.3. Questão da nocicepção e sensibilidade à dor em peixes

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

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

**a) Nociceptores:** a presença de nociceptores (terminações nervosas livres) em peixes foi descrita pela primeira vez na década de 1970 (WHITEAR, 1971) e, mais recentemente, foi

demonstrado que estes receptores respondem a estímulos nocivos como pressão, calor e químicos irritantes (ácido acético) (SNEDDON, 2002; SNEDDON, 2003a, b).

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

**c) Substâncias opioides endógenas e receptores:** os peixes apresentam um sistema opioide funcional, semelhante ao de outros vertebrados, apresentando todos os principais tipos de receptores opioides (delta, kappa e mu), com estrutura proteica semelhante aos dos receptores de mamíferos (BUATTI & PASTERNAK, 1981; VELASCO *et al.*, 2009; DREBROG *et al.*, 2008) e amplamente distribuídos nas regiões relacionadas ao processamento de informações sensoriais (GONZALEZ-NUNEZ & RODRIGUEZ, 2009).

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

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

**1.3.2.** Sendo assim, embora não seja possível afirmar definitivamente a sensibilidade dos peixes à dor, estes atendem a todos os critérios definidos por Bateson (1991) para se determinar a percepção da dor em animais, sendo, portanto, de extrema importância que a possibilidade de dor e sofrimento seja levada em consideração quando as práticas de manejo são definidas, visando ao bem-estar destes animais.

## **II - OBTENÇÃO DE ANIMAIS**

### **2.1. Captura de animais da natureza**

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

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

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

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

## **2.2. Reprodução em cativeiro**

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

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

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

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

**a) Indução ambiental:** a possibilidade de estimular a reprodução de todos os peixes por meio da indução ambiental é viável, visto que esse é o mecanismo que desencadeia todo o processo reprodutivo em condições naturais. Apesar disso, a complexidade dos mecanismos de controle do desenvolvimento gonadal e do comportamento reprodutivo, em muitos casos, dificulta essa simulação em condições de cativeiro. Dessa forma, essa técnica é normalmente



utilizada para indução à maturação final, espermição/ovulação e desova de peixes não-migradores, tais como cará, traíra, tilápia e diversas espécies de uso ornamental.

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

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

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

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

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

Há inúmeras variações nos métodos para administração de hormônio em peixes. Porém, as fêmeas geralmente requerem doses maiores de hormônio do que os machos, sendo que doses parceladas produzem resultados melhores que uma única dose (WOYNAROVICH & HORVÁTH, 1983). O método típico para indução de peixes utiliza duas aplicações nas fêmeas e uma única aplicação nos machos (WOYNAROVICH & HORVÁTH, 1983). Essa dosagem é calculada em relação ao peso corporal, havendo necessidade de perfeito controle da dosagem aplicada em cada reprodutor. Dessa forma, a identificação dos reprodutores é um cuidado

fundamental para distinguir indivíduos que receberão diferentes quantidades de hormônio. Além disso, a identificação durante a seleção dos peixes possibilita o controle do desempenho reprodutivo de cada exemplar do plantel. Há uma diversidade de marcações internas e externas que podem ser utilizadas, uma análise comparativa da qualidade de cada uma das principais é apresentada por HARVEY & CAROLSFELD (1993).

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

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

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

**2.2.3. Manejo para seleção, aplicação de hormônios e desova:** A reação ao manejo apresentada pelas diferentes espécies de peixes é bastante distinta, além da história de vida do lote a ser manejado. O manejo inadequado dos reprodutores pode estressar os animais e interferir negativamente no resultado final do tratamento, sem mencionar a possibilidade de perda do reprodutor. Existem métodos simples que podem ser adotados para reduzir o estresse durante o manejo, conforme indicação de Harvey e Carolsfeld (1993). São eles: reduzir a superpopulação de peixes apreendidos na rede, durante a captura; devolver os

peixes ao tanque cuidadosamente, sem nunca jogá-los; sempre molhar as mãos e os equipamentos utilizados no manejo, para minimizar a retirada de muco e a perda de escamas; cobrir os olhos dos peixes com um pano úmido, sempre que possível; desenvolver técnicas para segurar os peixes sem maltratá-los; reduzir o ruído sonoro durante o manejo; utilizar, para peixes de água doce, água levemente salinizada durante o transporte dos peixes (1 a 2% de NaCl) e adicionar oxigênio quando o transporte for mais longo ou a densidade for elevada.

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

**2.2.4. Obtenção dos ovos:** as fêmeas de várias espécies de peixes submetidas ao tratamento de indução hormonal iniciam a liberação dos ovócitos na presença de machos,

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

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

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

A fertilização a seco tem a vantagem de ampliar o tempo para o manejo dos gametas, permitindo a separação e a quantificação da desova nas porções a serem estocadas nas distintas incubadoras, além de aumentar a taxa de fertilização (ZANIBONI-FILHO & NUÑER, 2004). Após a mistura dos ovócitos com o sêmen, é adicionada água para ativação dos gametas. A quantidade a ser adicionada, porém, precisa ser dimensionada: a inclusão de água em excesso causa a diluição do sêmen e a diminuição das chances de encontro dos

gametas para a fertilização, da mesma forma que uma quantidade insuficiente pode causar a obstrução da micrópila pelo muco do ovário ou mesmo pelo contato de outro óvulo (WOYNAROVICH & HORVÁTH, 1983).

A quantidade de ovócitos liberado pela fêmea em cada desova, conhecida como fecundidade, é dependente do volume da cavidade celomática disponível para alojar ovários maduros e do volume desses ovócitos (VAZZOLER, 1996). O tamanho dos ovócitos maduros é bastante variável entre as espécies de peixes. Porém, avaliando mais de uma centena de espécies, Wootton (1990) verificou que variam entre 250 e 7000µm. A fecundidade dos peixes tende a aumentar com o crescimento do peixe, sendo mais relacionada ao comprimento do que com a idade (VAZZOLER, 1996). Esse aumento na fecundidade dos peixes com o crescimento é atribuída à existência de uma fonte renovável e contínua de novos ovócitos a partir das células do epitélio folicular (CHAVES, 1991). Dessa forma, a fecundidade de peixes pode ultrapassar facilmente um milhão de ovócitos produzidos em uma única desova. Considerando a fecundidade do dourado (*Salminus brasiliensis*), segundo Morais-Filho e Schubart (1955), cada quilo de fêmea produz em média 141.000 ovócitos. Assim, um dourado fêmea de 20kg produzirá aproximadamente 3.000.000 de ovócitos em uma única desova.

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

A determinação do fluxo de água ideal para cada tipo de incubadora e de ovo é extremamente importante para o sucesso da incubação. A forte correnteza provoca o desnudamento dos ovos, sendo facilmente observada à presença de células soltas no espaço perivitelínico (WOYNAROVICH, 1986). A respiração dos ovos e larvas de peixes é feita

por difusão direta, de modo que exige a presença de elevados teores de oxigênio dissolvido na água para garantir a sobrevivência dos embriões. Adicionalmente, há um aumento da demanda de oxigênio pelo embrião com o seu desenvolvimento. Por exemplo, considerando o consumo de oxigênio pelos ovos de tainha *Mugil cephalus* na fase de fechamento do blastóporo, esse valor é aumentado em sete vezes quando os ovos estão embrionados e passa a ser dez vezes maior no momento da eclosão (WALSH *et al.*, 1989).

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

**a) Larvicultura extensiva:** a dependência da produção do alimento natural, para suprir as necessidades nutricionais dos peixes, exige a responsabilidade do pesquisador responsável, perante a CEUA, para serem mantidos os níveis adequados de nutrientes para sustentar a cadeia trófica. O abastecimento de água dos viveiros está normalmente restrito à reposição de perdas por evaporação e infiltração, sendo evitadas as trocas de água. Essa condição de criação faz com que os tanques e viveiros de piscicultura sejam caracterizados pelas grandes variações nos parâmetros abióticos, principalmente na camada superficial, causada pela atividade fotossintética (HINO, 1985). Apesar disso, essa grande amplitude de variação das condições ambientais parece ser tolerada pelas larvas de peixes, sem causar redução na taxa de sobrevivência (ZAIONS & BALDISSEROTTO, 2000; ZANIBONI-FILHO *et al.*, 2002). Nesses viveiros de piscicultura, existe uma cadeia alimentar baseada nas algas e outra baseada nas bactérias e detritos (PORTER, 1977), sendo que as bactérias são mais bem adaptadas, energeticamente, aos ambientes eutróficos (HINO, 1985), como são os viveiros onde se desenvolve a larvicultura extensiva. Dessa forma, o aumento da produtividade final de alevinos depende do acréscimo da quantidade de adubo utilizado na preparação dos tanques, devendo crescer proporcionalmente até a adição de uma determinada quantidade de adubo, quando a deterioração da qualidade de água passa a reduzir a produtividade (ZANIBONI-FILHO, 1992). Nesse sistema de larvicultura, os melhores resultados de produtividade final de juvenis têm sido obtidos com a estocagem mínima de 200 larvas/m<sup>2</sup> de viveiro (FONTES *et al.*, 1990; ZANIBONI-FILHO, 1992).

**b) Larvicultura intensiva:** nesse sistema de criação, a produção do alimento natural é desconsiderada e o fluxo de água é mantido elevado, mantendo um pequeno tempo de residência da água no ambiente de criação. Há possibilidade de maior controle das condições ambientais, apesar da completa dependência qualitativa e quantitativa do alimento artificial. Esse sistema de larvicultura é mais caro, necessita de maior qualificação e demanda da mão-de-obra envolvida. Apesar disso, tem uma produção final mais garantida do que aquela feita no sistema extensivo, onde há uma enorme dependência das condições ambientais e menor controle da condição de criação. A produtividade esperada, considerando o exemplo obtido com o tambaqui (*Colossoma macropomum*), pode ultrapassar a 2000 juvenis/m<sup>2</sup> (PÉREZ *et al.*, 1986).

### 2.3. Transporte de Peixes

O transporte de peixes muitas vezes é necessário, tanto para obtenção dos animais quanto no traslado entre diferentes laboratórios. Este processo pode ser estressante para os peixes, especialmente se não for feito adequadamente. O transporte em si já pode ser estressante, como veremos a seguir, mas a preparação, por si só, pode configurar estresse para os peixes, uma vez que é necessário os capturar e os transferir para o meio de transporte. É necessário muito cuidado durante a captura e acondicionamento pré-transporte para evitar perda de muco e escamas e a ocorrência de injúrias, que resultam em uma janela para troca osmótica e para ação de patógenos, bem como reduzir ao mínimo necessário o tempo de exposição aérea dos peixes. Os animais devem possuir a documentação ambiental e sanitária segundo a legislação vigente. Caso não provenham de vida livre, o estabelecimento deve possuir cadastro no órgão de Defesa Sanitária. Caso provenham de vida livre, o ato deve atender normatização vigente do órgão ambiental. O transporte pode ser feito em sistema fechado ou aberto (BERKA, 1986). O sistema fechado mais amplamente utilizado consiste no transporte em sacos plásticos selados, contendo uma parte de água, onde são acondicionados os peixes, e a injeção de duas ou mais partes de oxigênio puro antes de selar o saco plástico.

A proporção de oxigênio/água depende da duração do transporte, sendo necessária maior quantidade do gás em transportes mais longos. Pode-se utilizar ensacamento duplo, ou seja, com um saco dentro do outro, para reduzir o risco de vazamentos e perda de oxigênio e água, ocorrência esta que pode levar os peixes à morte. Esse tipo de sistema é mais indicado para peixes menores (larvas e juvenis) e espécies que não possuem acúleos (também chamados de “espinhos”). Acúleos são raios enrijecidos presentes nas nadadeiras de algumas espécies de

peixe e podem perfurar o saco de transporte resultando em vazamentos. Já o sistema aberto consiste em caixas de transporte, variáveis em formato e tamanho. As caixas são cheias de água e devem ser dotadas de bombas portáteis para aeração constante durante o transporte (BERKA, 1986). É a forma de transporte mais indicada para espécimes de maior tamanho e para espécies que possuem acúleos perfurantes.

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

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

A respiração dos peixes resulta na excreção de CO<sub>2</sub> e o aumento da concentração desse gás na água circundante reduz a capacidade dos peixes de excretá-lo. Se o CO<sub>2</sub> se acumula no sangue dos peixes, ocorre acidificação sanguínea, o que resulta em redução do transporte de oxigênio pelo efeito Root (a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio é menor em meios de pH mais baixos) (RANDALL & LIN, 1993). Ainda, a concentração elevada de CO<sub>2</sub> na água de transporte pode levar à acidificação da água (MACINTYRE *et al.*, 2008). Um indicativo de que os níveis de CO<sub>2</sub> na água de transporte estão elevados é a redução de atividade e até perda de equilíbrio dos peixes, uma vez que esse gás possui um efeito anestésico (MORAN *et al.*, 2008). O principal composto nitrogenado liberado pelos peixes é a amônia, que é excretada por meio das brânquias. A amônia em altas concentrações é tóxica. O aumento da temperatura e do pH aumentam a concentração de NH<sub>3</sub> na fração de amônia total, dificultando a excreção de amônia



pelo peixe. Portanto, o cuidado para que a temperatura da água não aumente durante o transporte também ajuda a evitar o aumento da toxicidade da amônia. Uma boa estratégia para a redução da liberação de excretas, especialmente fezes e amônia, durante o transporte, é o jejum de ao menos 24 horas antes desse procedimento, o que pode ajudar a garantir a qualidade da água.

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

Por fim, ao término do transporte, a soltura deve ser feita com cuidado. Água dos tanques de destino deve ser adicionada, lentamente, à água do transporte, para aclimatar os peixes a parâmetros como temperatura e dureza da água antes da transferência. Os peixes devem ser inicialmente transferidos para tanques de quarentena e observados antes da soltura nos tanques definitivos de forma a evitar possível contaminação do biotério.

### **III - INSTALAÇÕES ANIMAIS**

#### **3.1. Tanques de manutenção**

A manutenção de peixes para experimentação pode ser feita de diferentes formas e irá depender da capacidade instalada, da unidade de pesquisa e dos objetivos da pesquisa. Abaixo, são listados os principais tanques que podem ser utilizados para manutenção e experimentação dos peixes. A escolha da modalidade depende diretamente do nível de controle de variáveis limnológicas e de acesso ao alimento natural, assim como do delineamento experimental e da forma e frequência de manipulação dos indivíduos ao longo do período experimental. Além disso, há necessidade de se atentar para a geração efluentes, que dependendo do tipo de experimento, pode liberar cargas de material orgânico, bem como de outros contaminantes

como antimicrobianos, hormônios, necessitando assim, de um tratamento eficiente a fim de reduzir os impactos negativos ao meio ambiente.

**3.1.1. Tanques escavados ou viveiros:** Tanques escavados ou viveiros são estruturas escavadas no solo e podem ser de médias a grandes dimensões. Para que tenham assegurada sua estrutura física, devem ser construídos por profissionais capacitados, pois necessitam de dimensões e inclinações de taludes que se adequem às características na área onde serão construídos. Sua estrutura necessita de manutenção frequentemente (PEREIRA, 2006) e, muitas vezes, de intensa adequação do espaço físico para sua instalação. Por manterem os animais em contato direto com o sedimento, são os que melhor simulam o habitat natural e permitem ainda a manutenção da alimentação natural dos peixes (ZIMMERMANN & FITZSIMMONS, 2004), o que deve ser considerado na condução dos experimentos. Há ainda a variação dos tanques escavados que podem ter suas paredes revestidas por cimento ou lonas, o que pode aumentar a vida útil do sistema com menor manutenção, mas exigindo maior investimento. Em sua maioria, os tanques escavados dependem de sistema natural para o enchimento e reabastecimento da água, o que permite o controle do volume de entrada e da qualidade da água. A vazão da água é normalmente regulada por um monge de alvenaria ou um cotovelo articulado, por meio do qual ocorre também o escoamento da sujeira acumulada no fundo. Os sistemas de entrada e saída permitem então a simulação de circulação de água nos tanques escavados, aumentando ou diminuindo o tempo de residência nestes sistemas e permitindo controle de qualidade de água de entrada e saída durante a condução de experimentos. Por possuir entrada e saída de água, e por permitir o escoamento do fundo, o controle das variáveis limnológicas dos tanques escavados é maior, permitindo um maior controle das condições experimentais. Atendendo o conceito sanitário e às normas da Organização Mundial da Saúde Animal (OIE), todo ambiente, antes de iniciar a manutenção ou entre os ciclos de manutenção de animais, deverá passar por um vazio sanitário, momento em que o tanque não abrigará animais ou água por período necessário à perda de infectividade de patógenos. Segundo Queiroz (2012), a manutenção dos viveiros deve ser feita adequadamente adotando-se boas práticas aquícolas (BPA). As BPA, como calagem, secagem, aração, fertilização, revolvimento de fundo e fertilização, devem ser adotadas para que a boa qualidade do solo seja mantida e minimize fatores que ocasionam o estresse nos peixes e o surgimento de doenças. A periodicidade de adoção destes procedimentos irá depender diretamente do estudo das condições dos viveiros. Para uso de tanques escavados em experimentos os peixes podem ser distribuídos livremente nos tanques e cada tanque ser considerado uma unidade experimental. Em alternativa, gaiolas ou tanques-rede podem ser

instalados nos tanques escavados (MAINARDES-PINTO et al., 2003), permitindo, assim, que um único viveiro comporte mais de uma unidade experimental. Em tanques escavados o manejo dos animais em experimentação é mais difícil, pois, para retirar os indivíduos há que se promover a despesca com passagem de redes, o que pode estressar os animais e alterar suas respostas fisiológicas. Também há maior competição por alimento, se o processo de arraçoamento não for feito de forma adequada, o que pode desuniformizar os lotes experimentais. Em unidades de ensino e pesquisa são mais comumente usados para manutenção de animais ou para experimentos de desempenho e reprodução.

**3.1.2. Tanques de lona:** São estruturas modulares, normalmente menores que as dimensões dos tanques escavados. Sua mobilidade permite o deslocamento da estrutura e manuseio. Também requerem manutenção. Porém, a adequação da área para instalação pode ser menor do que a dos tanques escavados. Podem ser utilizados para produção, manejo, quarentena, manutenção e pesquisas de várias naturezas, além de serem os mais recomendados para criação/manejo de larvas de peixes ou alevinos. Os tamanhos dos tanques de lona irão variar de acordo com a capacidade instalada do laboratório e o objetivo das pesquisas a serem realizadas. Assim como as demais estruturas descritas, os peixes podem ser distribuídos livremente nos tanques ou serem separados em gaiolas para maior controle. Por não ter contato com o ambiente natural, nestes sistemas os peixes dependem diretamente da alimentação externa. Por serem sistemas mais controlados, devem ter maior atenção no processo de renovação e manutenção da qualidade da água. Desta forma, normalmente devem ser instalados filtros para remoção dos resíduos físicos e biológicos. Por esta característica, estes sistemas são relativamente mais caros que os anteriores, porém, suportam maior capacidade animal. Estes sistemas dependem totalmente dos filtros para que suas condições ideais de manutenção dos peixes sejam mantidas. Os filtros devem ter funcionalidade biológica (permite o crescimento de microorganismos favoráveis ao ambiente); química (carvão ativado, que elimina impurezas tóxicas) e mecânica (remove fezes e ração não consumida). Os filtros devem ser periodicamente verificados, de modo a não comprometer a qualidade da água e garantir o bem-estar dos animais (SCHNEIDER *et al.*, 2009). Os tanques de lona, quando de maior dimensão, também permitem o uso de gaiolas para dividir os grupos experimentais e facilitar o manejo dos animais.

**3.1.3. Aquários ou caixas:** Sistemas experimentais que utilizem caixas plásticas ou aquários de vidro são uma opção prática e de menor custo, além de permitirem deslocamento das estruturas e alterações nas configurações. Podem ser utilizadas caixas ou aquários

individualizados, sendo cada um uma unidade experimental fechada ou em unidades interligadas entre si, formando sistemas fechados de recirculação de água. Ambos devem ser dotados de sistemas de filtro físico e biológico, caso o experimento seja conduzido por um período maior. Caso não haja sistema de filtro, é necessário fazer renovação de água e remoção dos resíduos. O sistema de filtros é necessário para limpeza e remoção de resíduos e demais impurezas presentes no ambiente. A filtração biológica permite reduzir compostos orgânicos nitrogenados pela ação de bactérias aeróbias; a filtração química elimina as pequenas partículas e odores; a filtração mecânica retira partículas maiores, que geralmente se depositam no fundo dos aquários. Os filtros podem ser externos ou internos. A vantagem deste tipo de sistema é a reutilização da água, passando por etapas de filtração até ficarem adequadas novamente a todas as condições de qualidade de água exigidas. Recomenda-se fazer a troca parcial da água e limpeza dos filtros frequentemente, desde que essa prática não comprometa as pesquisas em andamento. Em experimentos de Toxicologia com exposição hídrica, não devem ser utilizados filtros, pois o contaminante ficará retido. Nestes casos, deve-se apenas trocar a água e sifonar o fundo para remover os resíduos. Assim como nos tanques de lona, o controle das condições ambientais nos aquários e caixas é maior. Além das questões já descritas sobre o uso de filtros e remoção de resíduos nos aquários, o controle de variáveis como temperatura da água, pH, oxigênio dissolvido, amônia, nitrito e nitrato também é possível. Estes sistemas também permitem a instalação de controle de temperatura, utilizando resistências ou termostatos, o que permite o ajuste preciso da temperatura adequada à espécie utilizada. A limpeza do aquário ou caixas deve ser realizada com água limpa e uma esponja ou pano limpo. A cada despesca, realizar a limpeza e a desinfecção de toda a estrutura física, equipamentos e utensílios utilizados no manejo dos animais. Para higienização e desinfecção podem ser utilizados métodos físicos e químicos. Caso seja utilizado cascalho, canos de policloreto de vinila (PVC) para abrigos dos animais, ou qualquer objeto de enriquecimento ambiental, estes deverão ser bem lavados com água corrente previamente ou utilizar métodos físicos e químicos. Peixes mantidos em aquários nos laboratórios de pesquisa podem estar alocado em ambiente que comprometem seu bem-estar, contudo, o enriquecimento ambiental torna a manutenção destes animais mais confortável, sendo o ambiente modificado em prol do bem-estar, incluindo aspectos comportamentais, reprodutivos, etc. (DELICIO *et al.*, 2006; BRYDGES E BRAITHWAITE, 2009). Os aquários geralmente são de vidro, mas podem ser de polietileno ou acrílico, opacos ou transparentes, formas diferenciadas e tamanhos variados, obedecendo as propostas do estudo em questão. São indicados para experimentos de toxicidade de compostos, comportamento animal, reprodução, criação, entre outros objetivos. Admitem-se pequenas inclinações,

normalmente da ordem de 2%, para facilitação dos processos de escoamento de dejetos. Esta característica poderá variar em função dos projetos e sistemas de filtragem propostos. Já o interior dos tanques ou aquários deve ser, preferencialmente, liso, isento de porosidades ou deformações que facilitem a formação de biofilmes microbianos, que dificultam a sua higienização. Deve-se atentar ainda para que o local possibilite fácil acesso ao aquário e segurança para o condutor do experimento, facilitando o processo de coleta dos animais para manuseio ao longo do período experimental. O local de instalação do aquário deve ser escolhido cuidadosamente, evitando locais com excesso de iluminação natural, barulhos e ruídos, trânsito de pessoas ou veículos e demais agentes estressores para os peixes. Cuidados com o macroambiente para a instalação de aquários ou caixas (biotério ou sala de manutenção de peixes) devem ser considerados, o piso deve ser de material impermeável e resistente, as paredes e teto pintados com tinta resistente e lavável, ausência de janelas, portas de material resistente e impermeável, não utilizar mobiliário de madeira e similares, controlar a temperatura e umidade do macroambiente com uso de termohigrômetro, ralo sifonado e com fechamento, etc. É recomendado a instalação de salas anexas, como por exemplo, sala de procedimentos (cirurgia, coleta de amostras, eutanásia), depósito de insumos e de resíduos. Nos sistemas de aquário ou caixas é mais comum o uso de aeração para manter os níveis adequados de oxigênio dissolvido na água, elemento indispensável para a manutenção da vida dos peixes. Porém, os sistemas de tanques escavados de lona e tanques-rede também podem utilizar a oxigenação para simulações experimentais. Sugere-se utilizar compressores de ar ligados a tubos ou mangueiras, em substituição a equipamentos de pequeno porte, quando o estudo for de longa duração ou a estrutura for de grande porte (GOUVEIA *et al.*, 2006). A iluminação dos ambientes de experimentação, quando realizado em ambientes controlados, deverá ser adequada à espécie e ao experimento em questão, considerando que ambientes demasiadamente iluminados podem contribuir para o desenvolvimento de algas verdes e ambientes com pouca iluminação favorecem a formação de algas marrons. Diariamente, deve-se verificar o funcionamento dos equipamentos como aeradores ou bombas de aeração, aquecedores, além de monitorar a temperatura, visando não comprometer o bem-estar dos peixes. Antes de receber os animais, recomenda-se que o ambiente passe por um período mínimo de maturação superior a três dias.

**3.1.4. Tanques-Rede:** Tanques-rede são gaiolas, quadradas ou cilíndricas, constituídas de material resistente e seguro, para resistir ao manuseio (geralmente metal). Devem ser completamente fechadas por tela, inclusive a parte superior, para prevenir o ataque de predadores e fornecer sombreamento. As telas variam o tamanho de sua malha em função da

fase de desenvolvimento e tamanho dos peixes. Os tanques-rede podem variar de tamanho, dependendo do número e do tamanho dos animais confinados e são medidos em m<sup>3</sup>. Deve ter acoplado à gaiola um sistema que permita sua flutuação na água. Nas gaiolas, geralmente existe um comedouro ou pode-se adaptar a forma de alimentação de acordo com os objetivos dos experimentos em questão (PEREIRA, 2006). Os tanques-rede não obstruem a passagem de água, promovendo fácil circulação, sendo possível utilizar recursos hídricos já existentes como rios e reservatórios. Esta característica é contrária aos demais sistemas, pois dificulta a manutenção de condições controladas do ambiente. Por isso, muitas vezes este sistema experimental é escolhido para experimentos de desempenho animal e simulação de condições reais de produção. A escolha deste sistema deve ter em mente a dificuldade de controle de vazão e de variáveis físico química na área interna dos tanques rede. Como dito anteriormente, podem ser instalados em tanques escavados ou de lona, pois permitem melhorar o manejo dos animais em experimento.

**3.1.5. Quarentenário:** Estabelecimento que garante condições de biossegurança destinadas à recepção de animais aquáticos após o processo de importação, exportação e trânsito nacional de animais aquáticos; uma estrutura que possibilita manter em quarentena desde larvas até reprodutores. O espaço tem por objetivo oferecer o serviço de controle sanitário e de saúde dos animais trazidos de outros países ou de diferentes bacias hidrográficas, reduzindo o risco de introdução e de disseminação de doenças. Para obtenção do credenciamento, os estabelecimentos quarentenários deverão cumprir com as exigências e normas previstas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), mais precisamente pela sua Coordenação de Animais Aquáticos, do Departamento de Saúde Animal, normativa MAPA N° 04, de 04 de fevereiro de 2015. A infraestrutura deve ser isolada de modo impedir a entrada de contaminantes e dividido em ambiente interno (sala de quarentena) e externo (vestiário, sala administrativa, sala para lavagem de equipamentos e depósito de resíduos sólidos) identificados quanto a sua finalidade. A sala de quarentena deverá dispor de manilúvio adequado à lavagem de equipamentos de uso diário e das mãos, deverá dispor de produto antisséptico para as mãos, papel-toalha e recipientes coletores (lixeira). O piso das instalações, os reservatórios, os equipamentos e os utensílios utilizados no manejo dos animais, bem como os recipientes para descarte de resíduos sólidos

## **3.2. Qualidade da água**

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

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

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

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

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

**3.2.3. Filtragem de água:** a água ainda pode sofrer filtragem por sistemas diversos, a fim de garantir melhor controle de seus parâmetros. Um sistema de osmose reversa pode ser usado para garantir controle, mas é importante garantir o reequilíbrio das condições iônicas adequadas

para a espécie em questão, uma vez que este tipo de filtração diminui drasticamente os íons na água (BU-ALI *et al.*, 2007).

Existem diversos tipos de filtros e a escolha depende do tipo de tanque, preferência dos experimentadores, potencial sensibilidade dos animais à presença do filtro, entre outros fatores. A escolha dos filtros também impacta a rotina dos biotérios e criadouros uma vez que requerem manutenção para a garantia da qualidade de água. Os filtros comumente incluem elementos de filtragem mecânica para remoção de partículas (peneiras, fibras ou polímeros com diferentes porosidades), filtragem química ou de absorção de partículas (comumente carvão ativado). Além disso, comumente os elementos filtrantes de aquários com baixa taxa de renovação de água incluem peças de cerâmica ou polímeros sintéticos que abrigam bactérias nitrificantes que fazem a conversão de amônia, nitrato e nitritos, a fim de reduzir sua concentração, ou, no caso de tanques escavados e viveiros, pode-se utilizar ainda plantas aquáticas do gênero *Eichhornia*, mais conhecidas como aguapé, reconhecidamente agente filtrante natural, (JAFARI *et al.*, 2006; TODD & JOSEPHSON, 1996). No entanto, alguns fatores devem ser observados previamente, uma vez que alterar a composição, densidade e distribuição de espécies vegetais flutuantes, podem afetar significativamente populações cultivadas (WANG *et al.*, 2018).

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

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



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

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

A aferição da temperatura da água deve ser realizada diretamente no tanque onde os animais são mantidos, lembrando que, em casos de tanques com lâmina d'água superior a 0,90m, deve-se mensurar a temperatura na superfície e na parte mais profunda do tanque, uma vez que podem apresentar diferentes temperaturas. Para mensurar a temperatura, pode-se usar termômetro de mercúrio, termômetros digitais com sonda permanentemente mergulhada no tanque ou ainda termômetros digitais de bolso.

**3.2.6. pH:** Um dos parâmetros que podem sofrer variação com maior frequência em um sistema de criação de peixes é o pH, isso devido a uma série de fatores inerentes ao micro ecossistema, onde a interação entre os fatores bióticos e abióticos é intenso. Entre os fatores que podem contribuir para variação no pH da água no sistema de criação estão: Carbonatos provenientes de pedras, corais, fotossíntese realizada por algas ou outras plantas liberando CO<sub>2</sub>, nitrificação por bactérias, decomposição de alimentos, excretas, entre outros.

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

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

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

Mudanças comportamentais como atividade locomotora e agressividade podem ser um dos indicativos de alteração no pH (WOLFF & DONATTI, 2016). Peixes, quando expostos a baixos valores de pH, apresentam comportamento letárgico e um posicionamento corporal angular em relação a superfície da água.

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

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

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

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

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

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

O monitoramento dos níveis de oxigênio deve ser diário, por meio de medidores colorimétricos, ou oxímetros, medidores eletrônicos portáteis ou de sondas permanentes. Em caso de diminuição do aporte de oxigênio dissolvido, algumas medidas emergenciais devem ser tomadas, como utilização de aeradores adicionais e aumento da taxa de renovação.

Utilização de aeradores pode ser permanente, no caso de tanques de pouca ou nenhuma circulação de água ou emergencial, sendo ativados apenas quando os níveis do oxigênio na água estão baixos.

O tipo e a potência do aerador a ser utilizado dependem do volume do tanque e a quantidade de biomassa que se pretende manter nesse espaço. Diversos tipos de sistema de aeração podem ser empregados na criação de peixes. Aeradores de pá (funcionam causando circulação da água, recomendado para viveiros de alta produção e grandes dimensões), ainda podem ser utilizados propulsores de ar, bombas verticais, bombas espessoras e difusores de ar. Embora possa ser calculado o consumo de oxigênio por biomassa no tanque, a forma mais eficiente ainda é o monitoramento diário, sendo necessárias duas checagens diárias em casos de grandes proporções, uma vez que diversos fatores podem alterar as quantidades de oxigênio dissolvido na água.

**3.2.8. Salinidade:** a salinidade consiste basicamente da concentração total de todos os sais dissolvidos na água. Uma vez que essas partículas dissolvidas na água carregam cargas positivas ou negativas, contribuem diretamente na condutividade da água (ZINABU *et al.*, 2002). A maioria dos peixes tolera apenas uma faixa específica de salinidade, ou seja, são ditos estenoalinos. Esses animais habitam exclusivamente ambientes de água doce ou exclusivamente ambientes de água salgada (WURTS, 1998). No entanto, existem alguns organismos que podem se adaptar a uma série de salinidades, conhecidos como eurialinos. Estes organismos podem ser eurialinos anádromos, catádromos ou verdadeiros. Organismos anádromos vivem em água salgada, mas desovam em água doce. Nas espécies catádromas ocorre o oposto, ou seja, vivem em água doce e migram para a água salgada para desovar. As espécies

eurialinas verdadeiras podem ser encontradas em ambientes de água salgada, doce ou salobra em qualquer ponto de seu ciclo de vida.

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

O aumento da salinidade diminui drasticamente os níveis de oxigênio dissolvido na água, sendo assim, um importante fator na criação de peixes, além do fato de que um aumento ou diminuição da salinidade pode ter impacto direto na condutividade da água, afetando assim uma série de atividades metabólicas dependentes da concentração iônica; porém, alterações controladas da salinidade do meio de criação podem ser interessantes, pois são capazes de melhorar a sobrevivência, a fecundidade e o bem-estar de algumas espécies modelo, como, por exemplo o zebrafish e os peixes-rei *Odontesthes bonariensis* e *O. humensis*. Mesmo sendo considerado um peixe de água doce, cuja salinidade nos ambientes naturais de ocorrência varia entre 0 e 0,6‰ (LAWRENCE, 2007), a manutenção de zebrafish a uma salinidade de 0,35‰ tem impactos negativos sobre a produção de ovos e sobre a sobrevivência (BOISEN et al., 2003). Por isso, o incremento do nível de salinidade a valores de até 1‰ é interessante para a manutenção desses animais em laboratório (LAWRENCE, 2007; AVDESH et al., 2012). Considerando as condições de manutenção de peixes-rei *O. bonariensis*, a utilização de meios salobros tem potencial para diminuição de perdas econômicas por mortalidade seguida de estresse por manipulação, transporte, altas densidades e baixa qualidade da água (STRÜSSMANN et al., 1996; TSUZUKI et al., 2000, 2001), além do aumento na taxa de sobrevivência de embriões (PIEDRAS et al., 2009). No mesmo sentido, a transferência de peixes-rei *O. humensis* aclimatados a água salobra para água doce é mais estressante para os animais (SILVEIRA et al., 2018), ainda que na natureza esses animais habitem ambientes hiposmóticos. Em vista disso, a salinidade do meio tem um importante papel na garantia do bem-estar dos modelos mantidos em estações experimentais.

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

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

O pH exerce grande influência quanto à forma que a amônia está presente na água, sendo que em condições neutras ou ácidas inferiores a 8, a forma  $\text{NH}_4^+$  predomina, isso devido ao fato de que, em meio aquoso ácido, a amônia formada é menos estável, sofrendo processo de hidratação, enquanto que, em meio alcalino, esse processo ocorre em menor escala, predominando a forma não ionizada  $\text{NH}_3$  (KÖRNER *et al.*, 2001; LI *et al.*, 2012). O cálculo dos níveis de  $\text{NH}_3$  na água é importante, não porque  $\text{NH}_3$  seja a forma mais tóxica, mas sim porque o aumento da proporção de  $\text{NH}_3$  na água leva a uma redução da excreção de amônia pelo peixe, com conseqüente acúmulo desse metabólito nos tecidos (BALDISSEROTTO, 2013).

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

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

A tolerância dos peixes às diferentes concentrações de amônia na água varia conforme a espécie e o estágio de desenvolvimento, além do fato dos valores totais de amônia toleráveis

sofrerem variação em função da temperatura, pH e salinidade. Valores médios seguem conforme tabelas 1, 2 e 3.

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

Cloreto (mg/L)	Nitrito médio (mg.L <sup>-1</sup> ) (N)
<2	0,02
2 - 4	0,04
4 -6	0,06
6 -8	0,08
8 - 10	0,10
> 10	0,20

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

pH	15°C	16°C	17°C	18°C	19°C	20°C	30°C
6,5	1,77	1,64	1,52	1,41	1,31	1,22	1,1
6,6	1,77	1,64	1,52	1,41	1,31	1,22	1,1
6,7	1,77	1,64	1,52	1,41	1,31	1,22	1,1
6,8	1,77	1,64	1,52	1,42	1,32	1,22	1,1
6,9	1,77	1,64	1,53	1,42	1,32	1,22	1,0
7,0	1,77	1,64	1,53	1,42	1,32	1,23	0,99
7,1	1,77	1,65	1,53	1,42	1,32	1,23	0,95
7,2	1,78	1,65	1,53	1,42	1,32	1,23	0,90
7,3	1,78	1,65	1,53	1,42	1,32	1,23	0,85
7,4	1,78	1,65	1,53	1,42	1,32	1,23	0,79
7,5	1,78	1,66	1,54	1,43	1,33	1,23	0,73
7,6	1,79	1,66	1,54	1,43	1,33	1,24	0,67
7,7	1,79	1,66	1,54	1,43	1,34	1,24	0,60
7,8	1,54	1,53	1,42	1,32	1,23	1,14	0,53
7,9	1,30	1,21	1,12	1,04	0,970	0,904	0,47
8,0	1,09	1,02	0,944	0,878	0,818	0,762	0,41
8,1	0,874	0,812	0,756	0,704	0,655	0,611	0,35
8,2	0,700	0,651	0,606	0,565	0,527	0,491	0,30
8,3	0,562	0,523	0,487	0,455	0,424	0,396	0,26
8,4	0,452	0,421	0,393	0,367	0,343	0,321	0,22
8,5	0,365	0,341	0,318	0,298	0,278	0,261	0,18
8,6	0,296	0,277	0,259	0,242	0,227	0,213	0,15
8,7	0,241	0,226	0,212	0,198	0,186	0,175	0,13
8,8	0,198	0,185	0,174	0,164	0,154	0,145	0,11
8,9	0,163	0,153	0,144	0,136	0,128	0,121	0,09
9,0	0,135	0,128	0,121	0,114	0,108	0,102	0,06

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

pH	10°C	15°C	20°C	25°C
7,0	20	14	9,4	6,6
7,2	12	8,7	5,9	4,1

7,4	7,8	5,3	3,7	2,6
7,6	5,0	3,4	2,4	1,7
7,8	3,1	2,2	1,5	1,1
8,0	2,0	1,4	0,97	0,69
8,2	1,3	0,87	0,62	0,44
8,4	0,81	0,56	0,41	0,29
8,6	0,53	0,37	0,27	0,20
8,8	0,34	0,25	0,18	0,14
9,0	0,23	0,17	0,13	0,10

(U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1999)

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

A aferição das concentrações de amônia pode ser baseada nas quantidades de amônia na forma  $\text{NH}_3$  ou  $\text{NH}_4^+$ , além da concentração total de nitrogênio na forma de amônia. No entanto, deve-se levar em consideração fatores como temperatura, pH e salinidade. A periodicidade de aferição, principalmente em sistemas de cultivo fechado, deve ocorrer diariamente, até que se tenha um perfil das alterações ao longo do tempo, em função da biomassa e regime de alimentação empregado no criadouro.

A transformação da amônia, até sua forma menos tóxica por meio da nitrificação, envolve dois grupos de bactérias: *Nitrosomonas* spp., que oxidam a amônia até nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e *Nitrobacter* spp., que oxidam o nitrito a nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) Figura 1.

Algumas medidas podem ser tomadas quando o sistema de criação se encontra com concentrações de amônia ou nitrito acima do desejado. A primeira medida é a troca parcial da água, de maneira gradual, até que os níveis dos compostos nitrogenados na água alcancem os valores aceitáveis. No caso do cativeiro se tratar de um tanque de grandes dimensões em que a troca da água seja uma medida inviável, é importante que se controle o pH e a temperatura, lembrando que esses fatores podem influenciar no nível de toxicidade da amônia. Outra medida

a ser tomada é reduzir a quantidade de fitoplâncton existente no sistema de criação, a fim de controlar o pH e o aporte de oxigênio no sistema. O regime de alimentação também deve ser reduzido, de forma a diminuir a quantidade de sedimentos e controlar a quantidade de excretas.

### **3.3. Densidade de estocagem**

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

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

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

Densidades inadequadas de peixes podem gerar diversas complicações. Uma baixa densidade pode influenciar no aparecimento de classes hierárquicas, dominantes e subordinadas, em que os animais dominantes monopolizam as zonas de alimentação e o alimento, diferenciando o crescimento nessas duas classes. A hierarquização também pode trazer prejuízos como brigas excessivas, acarretando em lesões e mortalidade; assim como densidades excessivas também podem acarretar variação no crescimento dos peixes, onde o grande adensamento dificulta o acesso ao alimento e gera competição nas zonas de



alimentação, afetando a homogeneidade dos lotes a serem estudados (SCHIMITTOU, 1993; HUNTINGFORD & LEANIZ, 1997; MACLEAN & METCALFE, 2001).

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

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

### **3.4. Alimentação**

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

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

**3.4.1.** De acordo com Rodrigues e colaboradores (2013), as formas físicas de fornecimento da ração são:

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

qualidade da água não seja afetada em função de sobras. Esse tipo de ração pode resultar dos processos de peletização ou extrusão (preferível), seguidos de moagem fina. Tal prática confere homogeneidade ao alimento em relação aos nutrientes inseridos na dieta. Pode, ainda, resultar de processo mais simples que contempla somente a mistura dos ingredientes, o que não é recomendável, pois, neste caso, haverá segregação dos ingredientes com diferentes densidades e consequente lixiviação dos nutrientes além de permitir a seletividade na ingestão pelos peixes.

b) Ração peletizada: alimento usado nas formas juvenis e em adultos de peixes. Neste tipo de ração a mistura de ingredientes é comprimida utilizando umidade, calor e pressão, produzindo péletes densos, que afundam rapidamente. Desta forma, este tipo de ração é indicado por reduzir as perdas de nutrientes na água e para manter uma boa qualidade do ambiente aquático. Este tipo de ração é mais utilizada nas formas juvenis de peixes em cativeiro;

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

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

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

Todos os cuidados acima descritos devem ser tomados para que a quantidade de ração ofertada aos peixes seja consumida em pequeno intervalo de tempo. Desta forma, a qualidade

da água se mantêm viável por mais tempo e os peixes estarão expostos a menor quantidade de resíduos.

### **3.5. Enriquecimento ambiental e social**

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

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

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

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

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

fases do desenvolvimento, enquanto vivem isolados em outras (WILLIAMS *et al.*, 2009). É preciso tomar cuidado, entretanto, ao estabelecer a densidade, especialmente quanto ao monitoramento da qualidade da água e de interações agressivas. Ainda, há espécies cuja agressividade acaba exigindo o isolamento, como é o caso de machos de betas *Betta splendens*, mas deve-se sempre ter o cuidado de enriquecer o ambiente de peixes isolados (com elementos espaciais ou alimentação viva) para minimizar o efeito da redução de estímulos.

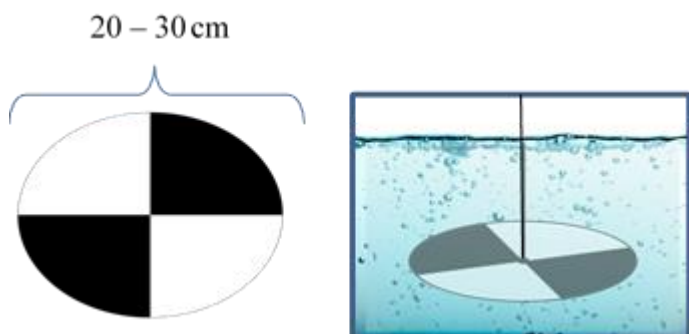
### **3.6. Regime de iluminação**

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

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

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

determinar o nível de transparência da água e o grau de penetrância da radiação solar (IDSO & GILBERT, 1974; PREISENDORFER, 1986).



A intensidade de luz em tanques externos é dependente do clima. Por isso, está sujeita a variações. No entanto, no caso de biotérios ou tanques em lugares cobertos, a intensidade depende da potência da luz artificial, da distância entre a fonte de luz e a superfície da água e da distribuição das fontes de luz. A luminosidade no tanque pode variar entre uma distribuição homogênea, ou optar pela criação de pontos de sombra, onde o peixe possa se ocultar, essa escolha deve levar em consideração os hábitos da espécie escolhida, uma vez que esse fator pode influenciar no comportamento de predação, além de poder ser um fator de estresse (CERRI, 1983; MAXIMINO *et al.*, 2010).

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

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

Em termos fisiológicos, sabe-se que a iluminação pode afetar a regulação da pigmentação corporal de várias espécies. As variações na coloração podem ser indicativas de estresse e

influenciar uma série de outros fatores como apetite, reprodução e resposta imune (ALY *et al.*, 2017; HÄRŞAN *et al.*, 2014; LOGAN *et al.*, 2006; SUGIMOTO, 2002).

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

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

Portanto, dependendo da espécie, região e da rotina do biotério, pode-se optar por um ciclo de luz fixo, utilizando como parâmetro a temporada de maior produtividade da espécie, normalmente vinculada aos períodos mais quentes, quando há menor gasto de energia e maior atividade, ou usar um ciclo flexível que mimetize a sazonalidade encontrada na natureza. No caso de espécies tropicais, usa-se um ciclo 12/12 e, para espécies de zona temperada, pode ser adotado um ciclo de até 16/8 (claro/escuro) (TAYLOR & MIGAUD, 2009). No entanto, qualquer mudança no fotoperíodo deve ocorrer de forma lenta e gradual, uma vez que já foi observado que mudanças repentinas no ciclo de luz podem acarretar em estresse, levando a prejuízos reprodutivos devido à involução gônadal (NAVARRO *et al.*, 2014; SHIMIZU *et al.*, 1994).

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

#### **IV - SANIDADE DE PEIXES**

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

#### **4.1. Métodos de tratamento das principais doenças**

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

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

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

Existem estudos avaliando a atividade *in vitro* de fármacos antivirais contra vírus de peixes e camarões, mas ainda não foi encontrado uso comercial na aquicultura. Devido à estreita interação entre o vírus e o hospedeiro, a maioria dos agentes antivirais é tóxica (BALDISSEROTTO *et al.*, 2017).

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



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

### **4.3. Estresse em peixes mantidos em cativeiro**

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

armazenado, sua liberação depende de síntese imediata, demorando alguns minutos para seu aumento ser detectável, mas pode se manter por horas ou até mesmo dias. As alterações fisiológicas provocadas pelas catecolaminas e pelo cortisol são chamadas de respostas secundárias e envolvem adaptações metabólicas (aumento de energia disponível via glicogenólise, lipólise, proteólise e gliconeogênese), cardiorrespiratórias (aumento das frequências cardíaca e respiratória), iônicas (pode ocorrer desbalanço osmótico devido ao aumento da permeabilidade da membrana branquial), sanguíneas e imunes (aumento do número das células vermelhas, ativação ou inibição das funções imunes dependendo da duração da resposta) (URBINATI *et al.*, 2015). Se o agente estressor for crônico e a resposta de estresse se sustentar por longos períodos, as alterações fisiológicas primárias e secundárias começam a se tornar deletérias, afetando o crescimento, imunidade e capacidade reprodutiva dos peixes, podendo levar a doenças ou até mesmo à morte dos indivíduos.

Além de importantes para assegurar um alto bem-estar para os peixes mantidos em laboratório, as diretrizes compiladas neste fascículo também são cruciais para evitar a ocorrência de estresse agudo e crônico nos peixes que serão utilizados em pesquisa e práticas didáticas, uma vez que as alterações comportamentais e fisiológicas da resposta de estresse afetam os resultados obtidos. O responsável pelo cuidado dos peixes deve não apenas se certificar de que as instalações, as condições de manutenção e o manejo dos animais estão de acordo com o recomendado para a espécie, como também estar atento para sinais indicativos de estresse nos peixes. As alterações comportamentais decorrentes do estresse são uma boa ferramenta de detecção, pois são uma das primeiras linhas de defesa dos animais contra estímulos adversos (BEITINGER, 1990), ocorrem no início da resposta e sua observação é não invasiva (HUNTINGFORD *et al.*, 2006). Algumas espécies podem apresentar escurecimento da coloração quando estressadas, mas vale ressaltar que alterações na coloração também ocorrem devido a interações sociais, por adaptação à cor do ambiente (coloração críptica) ou como sinalização sexual. Então, o tratador deve estar atento a todos os fatores que podem estar influenciando a coloração dos peixes. Peixes estressados também podem exibir alteração no apetite e até mesmo anorexia, bem como padrões alterados de locomoção (espécies de fundo permanecendo na superfície e vice-versa; espécies mais sedentárias apresentando aumento acentuado na locomoção, ou espécies mais ativas apresentando redução na movimentação). Um estressor agudo frequentemente resulta em aumento da frequência respiratória devido à ação das catecolaminas, observada pela alta frequência do batimento opercular (WENDELAAR BONGA, 1997), o que pode ser um indício de estresse, desde que descartada uma queda nos níveis de oxigênio na água. Qualquer alteração do comportamento dos peixes

deve ser investigada, pois pode indicar a presença de um estressor não percebido pelo tratador. Além das alterações externas, a avaliação do estado de estresse pode recorrer a análises fisiológicas se houver a suspeita de perturbação dos peixes. A medição das catecolaminas é pouco usada como indicador de estresse em peixes, pois seu aumento rápido e transiente, no início da resposta de estresse, pode ser perdido ou mesmo o aumento detectado ser referente ao manejo da coleta de sangue para análise *in situ*. O indicador mais utilizado é o cortisol. Seus níveis podem ser detectados no sangue (plasma ou soro), ou mesmo após a extração em amostras de tecido. Entretanto, os níveis de cortisol variam ao longo do dia nos peixes e deve-se tomar o cuidado de sempre coletar o sangue no mesmo horário para evitar inferências erradas devido a essas flutuações. Indicadores relativos às respostas secundárias de estresse também podem ser utilizados, embora sejam bastante variáveis, como a glicemia, que aumenta durante a resposta de estresse (WENDELAAR BONGA, 1997), mas também após a alimentação. As proteínas de choque térmico (Heat Shock Proteins - HSPs), proteínas constitutivas e que desempenham um papel no metabolismo proteico (MORIMOTO *et al.*, 1990), também aumentam em diversos tecidos nos peixes em situações de estresse (IWAMA *et al.*, 1999). As HSPs podem mediar reparo, degradação ou agir como chaperonas moleculares em proteínas desnaturadas (KIANG & TSOKOS, 1998) e seu aumento vem sendo utilizado como indicador de estresse, embora ainda sejam escassos na literatura os valores de referência para que se utilize apropriadamente esse parâmetro para todas as espécies. Vale ressaltar, entretanto, que a coleta de material fisiológico *in situ* já é um estressor. Portanto, deve ser feita para a avaliação do estresse apenas quando for estritamente necessário.

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

## **V - Manejo de animais em laboratório**

## **5.1. Captura**

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

## **5.2. Administração de fármacos**

A forma menos invasiva de se administrar substâncias a peixes é por meio de banhos de imersão, sendo esta a via de eleição principalmente quando se trata de lotes de animais. A substância é dissolvida na água (na concentração adequada ao volume da mesma) e absorvida por meio 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 filtrada e devidamente aerada. Os antiparasitários são exemplos de fármacos geralmente administrados em banho de imersão (CARPENTER, 2005; SUTILI *et al.*, 2013).

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

## **5.3. Anestesia**

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

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

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

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

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

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

Tabela 4. Estágios de indução à anestesia em peixes.

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

Fonte: SCHOETTGER & JULIN (1967).

#### 5.4. Analgesia

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

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

## 5.5. Cirurgia

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

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

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

Um dos aspectos mais importantes no que se refere à cirurgia de peixes é a necessidade de conhecimento da anatomia normal da espécie. Este, aliado a um protocolo anestésico adequado, pode garantir o sucesso do procedimento (MURRAY, 2002; WEBER *et al.*, 2009).

Neoplasias, distúrbios do globo ocular (por ex., catarata), biópsias de fígado, rins e baço, distúrbios da bexiga natatória, problemas reprodutivos e ingestão de corpo estranho constituem as principais causas que geram a necessidade de procedimentos cirúrgicos em peixes (WOOSTER *et al.*, 1993; WILDGOOSE, 2000).

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

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

Estudos biológicos em peixes têm utilizado técnicas cirúrgicas minimamente invasivas como a intubação esofágica, a canulação da aorta dorsal e o cateterismo urinário, a fim de reduzir o estresse relacionado à manipulação e amostragem. No caso da intubação esofágica, o objetivo é a administração de compostos diretamente no trato gastrointestinal, minimizando inconvenientes como a regurgitação (GLOVER & HOGSTRAND, 2002). A canulação da aorta dorsal permite o monitoramento de parâmetros sanguíneos e/ou plasmáticos por meio de coletas repetidas (GINGERICH & DROTTAR, 1989; BELANGER *et al.*, 2001; KIESSLING *et al.*, 2009; DJORDJEVIC *et al.*, 2012). Outros alvos para técnicas de canulação vascular incluem a veia e a artéria caudal, vasos dos arcos branqueais e a veia porta hepática (WELLS *et al.*, 1984; MCLEAN & ASH, 1989; BELANGER *et al.*, 2001; KARLSSON *et al.*, 2012). O cateterismo urinário tem sido realizado para estudar as funções renais e da bexiga urinária (WOOD & PATRICK, 1994). Algumas destas técnicas são utilizadas em combinação durante protocolos experimentais, permitindo a avaliação da cinética de absorção, distribuição, metabolismo e excreção de certos compostos (DENG *et al.*; 2000, 2001; FAN *et al.*, 2002).



Outras técnicas cirúrgicas já descritas em peixes são: remoção do órgão endócrino pancreático, possibilitando o estudo de Diabetes mellitus insulino-dependente (KELLEY, 1993); celiotomia, para implantação de marcadores eletrônicos (COLLINS *et al.*, 2000; COOKE & WAGNER, 2004; ERICKSON & WEBB, 2007; HARMS & LEWBART, 2011); biópsias teciduais (GILLILAND, 1994; GRANT, 1996; MURRAY, 2010); e cirurgias reprodutivas com ou sem o uso de técnicas endoscópicas (HERNANDEZ-DIVERS *et al.*, 2004; PARAGAMIAN *et al.*, 2005; WEBB & ERICKSON, 2007; DIVERS *et al.*, 2009; MATSCHE *et al.*, 2011). Todos esses procedimentos devem ser feitos em peixes sob anestesia profunda.

## **5.6. Coleta de material biológico**

De acordo com o Manual de Coleta e Remessa de Amostras para Diagnóstico de Enfermidades de Animais Aquáticos na Rede Nacional de Laboratórios do Ministério da Pesca e Aquicultura - RENAQUA (2013), amostras obtidas de animais aquáticos devem ser coletadas, acondicionadas e preservadas de maneira a possibilitar o diagnóstico das doenças e assim aumentar a eficiência do sistema de defesa sanitária destes animais. Ainda, o indivíduo que tenha conhecimento de suspeita da ocorrência de doença alvo (aquela de notificação para a Organização Mundial de Saúde Animal ou de interesse para o país - endêmica, emergente ou exótica) deve comunicar imediatamente à unidade local do serviço veterinário oficial, a fim de possibilitar a investigação da suspeita. O manual descreve os procedimentos de biossegurança indispensáveis para a coleta de amostra, a maneira adequada de identificar a amostra por meio de formulários epidemiológicos e também as particularidades sobre a coleta e remessa de material para diagnóstico de doenças infecciosas e parasitárias.

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

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

com uma gota de água (doce ou salgada, dependendo da espécie ictífica em questão) e cobertas com uma lamínula para subsequente avaliação (YANONG, 2006).

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

Quanto à obtenção de sêmen, deve-se eliminar a urina e as fezes antes da extração do gameta. Se isto não for possível, descarta-se a amostra. Se o macho estiver pronto para a ejaculação, a liberação de sêmen ocorrerá quando a região abdominal for pressionada da frente para trás até as proximidades do poro urogenital. O sêmen é então utilizado para avaliar as condições de saúde espermática, como motilidade, viabilidade e concentração de espermatozoides, podendo ser usado para criopreservação (EIRAS *et al.*, 2000; YANONG, 2006). Entretanto, é necessário muito cuidado na extração desse material, pois a pressão da extrusão mecânica pode levar à perda de escamas, escoriações na pele e severa perda epitelial (ZANUZZO *et al.*, 2015).

Quando da observação de endoparasitas durante a necropsia, coletar amostra do tecido infectado, xenoma ou o próprio parasita, acondicionar em cassete histológico e armazenar em tubo de coleta com solução de fixação (formol 10% tamponado) na proporção volume: volume 1:10 para envio à avaliação histopatológica (Manual de Coleta e Remessa de Amostras para Diagnóstico de Enfermidades de Animais Aquáticos na Rede Nacional de Laboratórios do Ministério da Pesca e Aquicultura - RENAQUA, 2013). Preparados úmidos de órgãos internos são igualmente utilizados para avaliação microscópica, como no caso de infestações por parasitos protozoários no aparelho gastrintestinal (EIRAS *et al.*, 2000).

No caso de suspeita de enfermidade bacteriana em uma grande população ictífica, recomenda-se a eutanásia de exemplares moribundos para amostragem microbiológica usando técnicas estéreis apropriadas. Podem ser realizadas culturas de encéfalo, rins, fígado e baço em

se tratando se suspeita de infecção sistêmica. A região a ser amostrada deve ser externamente esterilizada com álcool, o qual deve secar antes da realização da incisão com uma lâmina de bisturi. Para a coleta, pode-se utilizar um *swab* estéril ou ainda inserir uma tesoura esterilizada para obtenção de um fragmento do tecido. As culturas de sangue também são úteis no diagnóstico de enfermidade bacteriana sistêmica, com a vantagem de que a amostra é coletada a partir do animal vivo. A agulha deve ser inserida em local previamente limpo com gaze estéril e solução salina (YANONG, 2006).

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

Em todos os métodos de coleta de sangue, é imprescindível tomar o cuidado de selecionar agulhas de tamanho adequado ao tamanho do peixe e à parte do corpo onde a coleta será feita. Embora agulhas de maior calibre resultem em uma coleta mais rápida, por permitirem maior fluxo de sangue, agulhas com um diâmetro inadequadamente grande podem

romper os vasos ou o tecido cardíaco (no caso da punção cardíaca) e levar o peixe a óbito. Em relação à quantidade de sangue a ser amostrada, devemos levar em consideração o tamanho do animal e o ambiente em que vive. A coleta deve sempre considerar a quantidade de sangue no peixe, tomando-se o cuidado de utilizar peixes no tamanho adequado ao volume de sangue que precisa ser obtido. Estima-se em peixes que de 2 a 5% do peso corporal seja composto de sangue (JOHANSEN *et al.*, 2006). Peixes de água doce recuperam a volemia (volume sanguíneo) mais rapidamente, uma vez que seus fluidos corpóreos são mais concentrados em solutos do que a água do ambiente e por isso o animal adquire água facilmente. Já para peixes marinhos, a reposição é mais demorada, pois tendem a desidratar facilmente por viverem em um meio mais concentrado em solutos.

### **5.7. Eutanásia**

A eutanásia é utilizada com o intuito de causar a morte rápida de animais com o mínimo de dor e sofrimento possíveis. Recomenda-se ver definição de eutanásia, critérios a serem adotados para eutanásia e condições necessárias para eutanásia na RN 37 do Concea, Diretriz da Prática de Eutanásia, publicada em 15 de fevereiro de 2018.

### **5.8. Necropsia**

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

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

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

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

## **5.9. Destino de carcaças**

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

## **Referências Bibliográficas**

ALVAREZ-VERDE, C.A., SAMPAIO, L.A., OKAMOTO, M.H. Effects of light intensity on growth of juvenile brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*. Bol. DO Inst. PESCA, 2015.

ALVES, F.L.; BARBOSA JUNIOR, A.; HOFFMANN, A. Antinociception in piauçu fish induced by exposure to the conspecific alarm substance. *Physiology and Behavior*, 110-111: 58-62, 2013.

ALY, H.A., ABDEL RAHIM, M.M., ABDELATY, B.S., LOTFY, A.M. Impact of Different Colors of Artificial Light on Pigmentation and Growth Performance of Hybrid Red Tilapia (*Oreochromis mosambicus* × *O. hornorum*) Reared in Saline Well Water. *J. Mar. Sci. Res. Dev.* 7, 2017

ARLINGHAUS, R.; COOKE, S.J.; SCHWAB, A.; COWX, I.G. Fish welfare: a challenge to

the feelings-based approach, with implications to recreational fisheries. *Fish Fisheries*, 8:57–71, 2007.

ARMELIN, V. A.; BRAGA, V. H. S.; TEIXEIRA, M. T.; RANTIN, F. T.; FLORINDO, L. H.; KALININ, A. L. Gill denervation eliminates the barostatic reflex in a neotropical teleost, the tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 42, p. 1213-1224, 2016.

ASHLEY, P.J.; SNEDDON, L.U.; McCROHAN, C.R. Nociception in fish: stimulus- response properties of receptors on the head of trout *Oncorhynchus mykiss*. *Brain Research*, v.1166, p.47-54, 2007.

AVDESH, A., CHEN, M., MARTIN-IVERSON, M. T., MONDAL, A., ONG, D., RAINEY-SMITH, S., TADDEI, K., LARDELLI, M., GROTH, D. M., VERDILE, G., MARTINS, R. N. Regular Care and Maintenance of a Zebrafish (*Danio rerio*) Laboratory: An Introduction. *Journal of Visualized Experiments*, v.69, e4196, 2012.

AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition. Disponível em: <[http://www.avma.org/issues/animal\\_welfare/euthanasia.pdf](http://www.avma.org/issues/animal_welfare/euthanasia.pdf)>. Acesso em 30 out. 2013.

AZAMBUJA, C. R. M.; MATIAZZI, J.; RIFFEL, A. P. K.; FINAMOR, I. A.; GARCIA, L. O.; HELDWEIN, C. G.; HEINZMANN, B. M.; BALDISSEROTTO, B.; PAVANATO, M. A.; LLESUY, S. F. Effect of the essential oil of *Lippia alba* on oxidative stress parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) subjected to transport. *Aquaculture International*, v.319, p.156-161, 2011.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

BOISEN, A. M. Z., AMSTRUP, J., NOVAK, I., GROSELL, M. Sodium and chloride transport in soft and hard water acclimated zebrafish (*Danio rerio*). *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1618, p.207-218, 2003.

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

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

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

BRATTELID, T.; SMITH, A. J. Methods of positioning fish for surgery or other procedures out of water. *Laboratory Animals*, v.34, p.430-433, 2000.

BROMAGE, N.; M. BRUCE; N. BASAVARAJA; RANA, K. Egg quality determinants in finfish: The role of overripening with special reference to the timing of stripping in the Atlantic Halibut *Hippoglossus hippoglossus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 25 (1): 13-21, 1994.

BROOM, D.M. Animal welfare: concepts and measurement. *Journal of Animal Science* 69 (10): 4167-4175, 1991.

BROOM, D.M. Welfare assessment and relevant ethical decisions: key concepts. *Annual Review of Biomedical Sciences* 10: 79-90, 2008

BRYDGES, N. M.; BRAITHWAITE, V. A. Does environmental enrichment affect the behaviour of fish commonly used in laboratory work? *Applied Animal Behaviour Science* v. 118, p. 137-143, 2009.

BU-ALI, Q.; AL-ASEERI, M.; AL-BASTAKI, N. An experimental study of performance parameters and ion concentration along a reverse osmosis membrane. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 2007.

BUATTI, M.C.; PASTERNAK, G.W. Multiple opiate receptors: phylogenetic differences. *Brain Research*, 218: 400-405, 1981.

BURKA, J. F.; HAMMEL, K. I.; HORSBERG, T. E.; JOHNSON, G. R.; RAINNIE, D. J.; SPEARS, D. J. Drugs in salmonid aquaculture - a review. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v.20, p.333-349, 1997.

CALLAHAN, H. A.; NOGA, E. J. Tricaine dramatically reduces the ability to diagnose protozoan ectoparasite (*Ichthyobodo necator*) infections. *Journal of Fish Diseases*, v.25, p.433-437, 2002.

CARDOSO, C. V. P. Destino de carcaças. In: Andrade, A.; Pinto, S. C.; Oliveira, R. S. *Animais de Laboratório: criação e experimentação*. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, p.280-288, 2002.

CARNEIRO, P. C. F.; URBINATI, E. C. Salt as a stress response mitigator of matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther), during transport. *Aquaculture Research*, v. 32, p. 297–304, 2001.

CAROLSFELD, J. Reproductive physiology e induced breeding of fish as related to culture of Colossomas. Páginas 37-73 in Armando Hernandez, editor. *Cultivo de Colossoma* (SUDEPE-Colciencias-CIID). Canada, 1989.

CARPENTER, J. W. *Exotic Animal Formulary*, 3 ed. St. Louis, MO: Elsevier Saunders, 564 p., 2005.

CERRI, R.D. The effect of light intensity on predator and prey behaviour in cyprinid fish: Factors that influence prey risk. *Anim. Behav.*, 1983.

CHANDROO, K. P., DUNCAN, I. J. H; MOCCIA, R. D. Can fish suffer? Perspectives on sentience, pain, fear and stress. *Applied Animal Behavior Science*, 86 (3-4):225-250, 2004.

CHAVES, P. T. C. Aspectos convergentes da dinâmica ovariana nos peixes, com uma contribuição à biologia reprodutiva de 14 espécies do litoral de São Paulo. Tese de Doutorado. Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo. 123p.; 1991.

CHERVOVA, L. S.; LAPSHIN, D. N. Opioid modulation of pain threshold in fish. *Doklady Biological Science*, v.375, p.590-591, 2000.

CLAIBORNE, J. B.; EDWARDS, S. L.; MORRISON-SHETLAR, A. I. Acid-base regulation in fishes: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of experimental zoology*, 2002.



CLARKE, A.; JOHNSTON, N. M. Scaling of metabolic rate with body mass and temperature in teleost fish. *Journal of Animal Ecology*, 1999.

CLEVELAND P. H. JR., LARRY S. R., ALLAN L. *Animal Diversity*. 3<sup>a</sup> Ed, McGraw-Hill Science, 464 p. 2002.

COLLINS, M.; SMITH, T.; POST, W.; PASHUK, O. Habitat utilization and biological characteristics of adult Atlantic sturgeon in two South Carolina rivers. *Transactions of American Fisheries Society*, v.129, p.982-988, 2000.

COYLE, S. D.; DURBOROW, R. M.; TIDWELL, J. H. *Anaesthetics in aquaculture*. Southern Regional Aquaculture Center Publication, v.3900, 2004.

CONGLETON, J. L.; LAVOIE, W. L. Comparison of Blood Chemistry Values for Samples Collected from Juvenile Chinook Salmon by Three Methods. *Journal of Aquatic Animal Health*, v.13, p.168-172, 2001.

COOKE, S. J.; WAGNER, G. N. Training, experience and opinions of researchers who use surgical techniques to implant telemetry devices into fish. *Fisheries*, v.29, p.10-18, 2004.

CUNHA, M. A.; BARROS, F. M. C.; GARCIA, L. O.; VEECK, A. P. L.; HEINZMANN, B. M.; LORO, V. L.; EMANUELLI, T.; BALDISSEROTTO, B. Essential oil of *Lippia alba*: a new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Aquaculture*, v.306, p.403-406, 2010.

DELICIO, H.C.; BARRETO, R.E. Time-place learning in food-restricted Nile tilapia. *Behavioural Processes*, v. 77, p. 126–130, 2008.

DELICIO, H.C.; BARRETO, R.E.; NORMANDES, E.B.; LUCHIARI, A.C.; MARCONDES, A.L. A place preference test in the fish Nile tilapia. *Journal of Experimental Animal Science* v. 43, p. 141-148, 2006.

DENG, D. F.; REFSTIE, S.; HEMRE, G.-I.; CROCKER, C. E.; CHEN, H. Y.; CECH JR., J. J.; HUNG, S. S. O. A new technique of feeding, repeated sampling of blood and continuous collection of urine in white sturgeon. *Fish Physiology and Biochemistry*, v.22, n.4, p.191-197, 2000.

DENG, D. F.; REFSTIE, S.; HUNG, S. S. O. Glycemic and glycosuric responses in white sturgeon after oral administration of simple and complex carbohydrates. *Aquaculture*, v.199, p.107-117, 2001.

DIVERS, S.; BOONE, S.; HOOVER, J.; BOYSEN, K.; KILLGORE, K.; MURPHY, C.; GEORGE, S.; CAMUS, A. Field endoscopy for identifying gender, reproductive stage and gonadal anomalies in free-ranging sturgeon (*Scaphirhynchus*) from the lower Mississippi River. *Journal of Applied Ichthyology*, v.25, p.68-74, 2009.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

FLORINDO, L. H.; LEITE, C. A. C.; KALININ, A. L.; REID, S. G.; MILSOM, W. K.; RANTIN, F. T. . The Role of Branchial and Orobranchial O<sub>2</sub> Chemoreceptors in The Control Of Aquatic Surface Respiration (ASR) in The Neotropical Fish Tambaqui (*Colossoma macropomum*): Progressive Response to Prolonged Hypoxia. *Journal of Experimental Biology*, Inglaterra, v. 209, n.9, p. 1709-1715, 2006.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

GRESSLER, L. T.; RIFFEL A. P. K., PARODI, T. V.; SACCOL, E. M. H.; KOAKOSKI, G.; DA COSTA, S. T.; PAVANATO, M. A.; HEINZMANN, B. M.; CARON, B.; SCHMIDT, D.; LLESUY, S. F.; BARCELLOS, L. J. G.; BALDISSEROTTO, B. Silver catfish *Rhamdia quelen* immersion anaesthesia with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Hérit) Britton or tricaine methanesulfonate: effect on stress response and antioxidant status. *Aquaculture Research*, v. 45, p. 1061-1072, 2014.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

HUET, M. Tratado de Piscicultura. Mundi-Prensa, Madri, 1978.

HUNTER, J.R. Feeding ecology and predation of marine fish larvae, in: *Marine Fish Larvae: Morphology, Ecology and Relation to Fisheries*; 1981.

HUNTINGFORD, F. A.; LEANIZ, C. G. Social dominance, prior residence and acquisition of profitable feeding sites in juvenile Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology*, London, v. 51, n. 5, p. 1009-1014, 1997.

HUNTINGFORD, F.A.; ADAMS, C.; BRAITHWAITE, V.A.; KADRI, S.; POTTINGER, T.G.; SANDØE, P.; TURNBULL, J.F. Current issues in fish welfare. *Journal of Fish Biology*, v.68, p.332-372, 2006.

IDSO, S.B., GILBERT, R.G. On the Universality of the Poole and Atkins Secchi Disk-Light Extinction Equation. *J. Appl. Ecol.* 11, 399, 1974.

ISRAELI-WEINSTEIN, D.; KIMMEL, E. Behavioral response of carp (*Cyprinus carpio*) to ammonia stress. *Aquaculture*, 1998.

IWAMA, G. K.; VIJAYAN, M. M.; FORSYTH, R. B.; ACKERMAN, P. A. Heat shock proteins and physiological stress in fish. *American Zoologist*, v.39, p.901–909, 1999.

JAFARI, N. G.; TRIVEDI, R. K.; FOROUTAN, A. Possible practical and environmental applications of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *Pollution Research*, 2006.

JAVAHERY, S.; NEKOUBIN, H.; MORADLU, A. H. Effect of anaesthesia with clove oil in fish (review). *Fish Physiology and Biochemistry*, v.38, p.1545-1552, 2012.

JOHANSEN, R.; NEEDHAM, J. R.; COLQUHOUN, D. J.; POPPE, T. T.; SMITH, A. J. Guidelines for health and welfare monitoring of fish used in research. *laboratory Animals*, v.40, p.323-340, 2006.

KAFUKU, T. Changes in technique for hatching of eggs spawned in flow. *Int. J. Aq. Fish. Technol.*, 1: 99-108, 1989.

KARLSSON, A.; ROSSELAND, B. O.; MASSABUAU, J-C.; KIESSLING, A. Pre-anaesthetic metomidate sedation delays the stress response after caudal artery cannulation in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Fish Physiology and Biochemistry*, v.38, p.401-411, 2012.

KELLEY, K. M. Experimental diabetes mellitus in a teleost fish. I. Effect of complete isletectomy and subsequent hormonal treatment on metabolism in the goby, *Gillichthys mirabilis*. *Endocrinology*, v.132, n.6, p.2689-2695, 1993.

KIANG, J. G.; TSOKOS, G. C. Heat shock proteins 70kDa: Molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacology e Therapeutics*, v.80, p.183–201,1998.

KIESSLING, A.; JOHANSSON, D.; ZAHL, I. H.; SAMUELSEN, O. B. Pharmacokinetics, plasma cortisol and effectiveness of benzocaine, MS-222 and isoeugenol measured in individual dorsal aorta-cannulated Atlantic salmon (*Salmo salar*) following bath administration. *Aquaculture*, v.286, p.301-308, 2009.

KING, W. V.; HOOPER, B.; HILLSGROVE, S.; BENTON, C.; BERLINSKY, D. The use of clove oil, metomidate, tricaine, methanesulphonate and 2-phenoxyethanol for inducing anaesthesia and their effect on the cortisol stress response in black sea bass (*Centropristis striata* L.). *Aquaculture Research*, v.36, p.1442-1449, 2005.

KÖRNER, S. et al. The effect of pH variation at the ammonium/ammonia equilibrium in wastewater and its toxicity to *Lemna gibba*. *Aquatic Botany*, 2001.

KRAMER, D. L. Dissolved oxygen and fish behavior *Environmental Biology of Fishes*, 1987.

KUBITZA, F. Qualidade da água na produção de peixes. 3. ed Jundiaí:Degaspari. 97p, 1999.

KUBITZA, F. Técnicas de transporte de peixes vivos. Degaspari, Jundiaí, 1999.

LAWRENCE, C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture*, v269, p1-20, 2007.

LAZZARI, R.; RADÜNZ NETO, J.; CORRÊIA, V.; VEIVERBERG, C. A.; TAFFAREL BERGAMIN, G.; EMANUELLI, T.; PORTES RIBEIRO, C. Densidade de estocagem no crescimento, composição e perfil lipídico corporal do jundiá. *Ciência Rural*, v. 41, n. 4, 2011.

LEMBI, C. A. Limnology, Lake and River Ecosystems. *Journal of Phycology*, 2001.

LEWBART, G. A.; HARMS, C. Building a fish anesthesia delivery system. *Exotic DVM*, v.1, p.25-28, 1999.

LEWBART, G. A.; SPODNICK, G.; BARLOW, N.; LOVE, N. E.; GEOLY, F.; BAKAL, R. S. Surgical removal of an undifferentiated abdominal sarcoma from a koi carp (*Cyprinus carpio*). *Veterinary Record*, v.143, p.556-558, 1998.

LI, L. et al. Ammonium stability and nitrogen isotope fractionations for  $\text{NH}_4^+$ - $\text{NH}_3(\text{aq})$ - $\text{NH}_3(\text{gas})$  systems at 20-70°C and pH of 2-13: Applications to habitability and nitrogen cycling in low-temperature hydrothermal systems. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2012.

- LIKENS, G. E.; HARRIS, G. Salinity. In: Encyclopedia of Inland Waters. [s.l: s.n.].
- LOGAN, D.W., BURN, S.F., JACKSON, I.J Regulation of pigmentation in zebrafish melanophores. *Pigment Cell Res.*, 2006.
- MACINTYRE, C. M.; ELLIS, T.; NORTH, B. P.; TURNBULL, J. F. The Influences of Water Quality on the Welfare of Farmed Rainbow Trout: a Review In: BRANSON, E. J. (Org.). *Fish Welfare*. Oxford: Blackwell Publishing, p. 150-184; 2008.
- MACLEAN, A.; METCALFE, N. B. Social status, access to food, and compensatory growth in the juvenile Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology*, London, v. 58, n. 5, p. 1331-1346, 2001.
- MAINARDES-PINTO, C.S.R. *et al.* Viability of Thailand tilapia, *Oreochromis niloticus* culture raised in small volume net cages placed in populated ponds. In: *WORLD AQUACULTURE*, Salvador, Bahia, BA. Book of Abstracts... Salvador: WAS, 2003. p.442, 2003.
- MATSCHE, M. A.; BAKAL, R. S.; ROSEMARY, K. M. Use of laparoscopy to determine sex and reproductive status of shortnose sturgeon (*Acipenser brevirostrum*) and Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus oxyrinchus*). *Journal of Applied Ichthyology*, v.27, p.627-636, 2011.
- MATTHEWS, M., TREVARROW, B., MATTHEWS, J. A virtual tour of the guide for zebrafish users. *Lab Anim.* (NY). doi:10.1038/5000140, 2002.
- MATUSHIMA, E. R. Técnicas Necroscópicas. In: Cubas, Z. S.; Silva, J. C. R.; Catão- Dias, J. L. *Tratado de Animais Selvagens*. São Paulo: Roca, Cap. 61, p.980-990, 2006.
- MAXIMINO, C., MARQUES DE BRITO, T., DE MATTOS DIAS, C.A.G., GOUVEIA, A., MORATO, S. Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. *Nat. Protoc.* 2010.
- MCCLESKEY, R. B.; KIRK NORDSTROM, D.; RYAN, J. N. Electrical conductivity method for natural waters. *Applied Geochemistry*, 2011.
- MCLEAN, E.; ASH, R. Chronic cannulation of the hepatic portal vein in rainbow trout, *salmo gairdneri*: a prerequisite to net absorption studies. *Aquaculture*, v.78, p.195-205, 1989.
- MEADE, J. W. Allowable Ammonia for Fish Culture. *The Progressive Fish-Culturist*, 1985.
- MELLOR, D.J. A. Updating Animal Welfare Thinking: Moving beyond the “Five Freedoms” towards “A Life Worth Living”. *Animals* 6(3): 21, 2016.
- MILLSOPP, S.; LAMING, P. Trade-offs between feeding and shock avoidance in goldfish (*Carassius auratus*). *Applied Animal Behaviour Science*, 113:247-254,2007.
- MOLENTO, C. F. M.. *Senciência Animal*. Revista do Conselho Regional de Medicina Veterinária, Curitiba, v. 16, p. 18-18, 2005.

MONFORT, P. et al. Molecular mechanism of acute ammonia toxicity: Role of NMDA receptors. *Neurochemistry International*, 2002.

MORAIS-FILHO, M.B.; SCHUBART, O. Contribuição ao estudo do dourado (*Salminus maxillosus* Val.) do rio Mogi Guassu (Pisces, Characidae). EGRT-Ministério da Agricultura-Divisão de Caça e Pesca. São Paulo, SP, 1955.

MORAN, D.; WELLS, R. M. G.; PETHER, S. J. Low stress response exhibited by juvenile yellowtail kingfish (*Seriola lalandi* Valenciennes) exposed to hypercapnic conditions associated with transportation. *Aquaculture Research*, v. 39, p. 1399-1407, 2008.

MOREIRA, H. L. M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R. P.; ZIMMERMANN, S. Fundamentos da moderna aquicultura. Canoas: Ulbra, 2001.

MORIMOTO, R. I.; KROEGER, P. E.; COTTO, J. J. 1990. The transcriptional regulation of heat shock genes: A plethora of heat shock factors and regulatory conditions. In: Feige, U.; Morimoto, R. I.; Yahara, I.; Polla, B. S. Stress-inducible cellular responses. Basel: Birkhauser, p.139-164, 1996.

MURRAY, M. J. Endoscopy in sharks. *Veterinary Clinic of Exotic Animal*, v.13, p.301-313, 2010.

MURRAY, M. J. Fish Surgery. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, v.11, n.4, p.246-257, 2002.

NASCIMENTO, T. S. R.; BOIJINK, C. DE L. .; PÁDUA, D. M. C. Efeito do pH da água no equilíbrio iônico de alevinos de *Piaractus mesopotamicus*. 2007 Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/115054/1/QAGUA-06.pdf>>

NAVARRO, F.K.S.P., NAVARRO, R.D., MURGAS, L.D.S., FELIZARDO, V. DE O. Effect of photoperiod stress assessment and locomotor activity of female lambari (*Astyanax bimaculatus*). *Ciência e Agrotecnologia* 38, 173–180, 2014.

NELSON, J. S. *Fishes of the world*. 4ª Ed. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 622 p. 2006.

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

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

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

NORDGREEN, J.; HORSBERG, T.E.; RANHEIM, B.; CHEN, A.C.N. Somatosensory evoked



potentials in the telencephalon of Atlantic salmon (*Salmo salar*) following galvanic stimulation of the tail. *Journal of Comparative Physiology A*, v. 193, p.1235-1242, 2007.

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

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

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

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

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

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

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

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

PIEDRAS, S. R. N., FERNANDES, J. L. O., MOTOYAMA, I. S., MARTINS, G. B. Efeito de diferentes concentrações de salinas (NaCl) na sobrevivência de embriões de peixe – rei *Odontesthes bonariensis* e *Odontesthes humensis*. *Biotemas*, v.22, p235-238, 2009.

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

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

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

PORTER, K. G. The plant-animal interface in freshwater ecosystems. *American Scientist*, v. 65, n. 2, p. 159-170, 1977.

QUEIROZ, J. F. Boas práticas aquícolas (BPA) em viveiros garantem sucesso da produção. Embrapa Meio Ambiente-Artigo em periódico indexado (ALICE), *Visão Agrícola* n. 11, p. 36-39, 2012.

RAJESWARI, M.V., RAJASREE, S.R.R., BALASUBRAMANIAN, T. Effect of Light Levels on Growth, Survival and Skin Colour Enhancement of Marine Angelfish, *Apolemichthys xanthurus* (Bennett, 1833). *Turkish J. Fish. Aquat. Sci.* 17, 2017.

RANDALL, D. J.; LIN, H. Effects of Variations in Water pH on Fish. In: LAHLOU, B.; VITIELLO, P. (Org.). *Aquaculture: Fundamental and Applied Research*. Washington: American Geophysical Union, 1993.

RANDALL, D. J.; TSUI, T. K. N. Ammonia toxicity in fish *Marine Pollution Bulletin*. Anais. 2002

RANDLER, C., RAHAFAR, A. Latitude affects Morningness-Eveningness: evidence for the environment hypothesis based on a systematic review. *Sci. Rep.* 7, 39976, 2017.

RANZANI-PAIVA, M. J. T.; DE PÁDUA, S. B.; TAVARES-DIAS, M.; EGAMI, A. I. Métodos para análise hematológica em peixes. Maringá: Eduem, 120 p., 2013.

REILLY, S.C.; QUINN, J.P.; COSSINS, A.R.; SNEDDON, L.U. Behavioural analysis of a nociceptive event in fish: Comparisons between three species demonstrate specific responses. *Applied Animal Behaviour Science*, 114: 248-259, 2008.

REINHARDT, V. Common husbandry-related variables in biomedical research with animals. *Laboratory Animals*, v.38, p.213–235, 2004.

REIS, A. B. et al. Alterações do epitélio branquial e das lamelas de tilápias (*Oreochromis niloticus*) causadas por mudanças do ambiente aquático em tanques de cultivo intensivo. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 2009.

REYNALTE-TATAJE, D. A.; BALDISSEROTTO, B.; ZANIBONI-FILHO, E. The effect of water pH on the incubation and larviculture of curimatá *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1837) (Characiformes: Prochilodontidae). *Neotropical Ichthyology*, 2015.

REYNALTE-TATAJE, D. A.; ESQUIVEL, B. M.; ESQUIVEL, J. R.; ZANIBONI-FILHO, E. Reproducción inducida del piauçu, *Leporinus macrocephalus* GARAVELLO y BRITSKI, 1988 (Characiformes, Anostomidae). *Boletim do Instituto da Pesca*, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 11-18, 2002.

REYNALTE-TATAJE, D. A.; LOPES, C. A.; ÁVILA-SIMAS, S.; GARCIA, J. R. E.; ZANIBONI-FILHO, E. Artificial reproduction of neotropical fish: Extrusion or natural spawning?. *Natural Science (Print)*, v. 05, p. 1-6, 2013.

RIBEIRO, P. A. P.; GOMIERO, J. S. G.; LOGATO, P. V. R. Manejo alimentar de peixes. *Boletim de extensão nº 98*, Universidade Federal de Lavras, 2002. 17p.

RINK, E.; WULLIMANN, M.F. Connections of the ventral telencephalon (subpallium) in the zebrafish (*Danio rerio*). *Brain Research*, v.1011, p.206-220, 2004.

ROBERTS, H. E. Anesthesia, analgesia, and euthanasia. In: Roberts HE. *Fundamentals of ornamental fish health*. Ames (IA): Blackwell Publishing, 2010. 169 p.

RODRIGUES , A.P.O.; BERGAMIN, G. T.; SANTOS, V. R. V. Nutrição e alimentação de peixes. In: RODRIGUES et al. (Eds.). Piscicultura de água doce: multiplicando conhecimentos. Brasília, DF: Embrapa, 2013. Cap.6, p.171-213.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SILVEIRA, T. L. R., MARTINS, G. B., DOMINGUES, W. B., REMIÃO, M. H., BARRETO, B. F., LESSA, I. M., SANTOS, L., PINHAL, D., DELLAGOSTIN, O. A., SEIXAS, F. K., COLLARES, T., ROBALDO, R. B., CAMPOS, V. F. Gene and Blood Analysis Reveal That Transfer from Brackish Water to Freshwater Is More Stressful to the Silverside *Odontesthes humensis*. *Frontiers in Genetics*, v.28, n.9, 2018.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SOSO, A. B.; BARCELLOS, L. J. G.; RANZANI-PAIVA, M. J.; KREUTZ, L. C.; QUEVEDO, R. M.; LIMA, M.; BOLOGNESI-SILVA, L.; RITTER, F.; BEDIN, A. C.; FINCO, J. A. The effects of stressful broodstock handling on hormonal profiles and reproductive performance of *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard) females. *Journal of the World Aquaculture Society*, v. 39, p. 835–841, 2008.

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

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

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

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

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

STRÜSSMANN, C. A., MORIYAMA, S., HANKE, E. F., COTA, J. C. C., TAKASHIMA, F. Evidence of thermolabile sex determination in pejerrey. *Journal of Fish Biology*, v48, p643-651, 1996.

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

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

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

SUTILI, F. J.; GRESSLER, L. T.; VARGAS, A. C.; ZEPPENFELD, C. C.; BALDISSEROTTO, B.; CUNHA, M. A. The use of nitazoxanide against the pathogens

Ichthyophthirius multifiliis and Aeromonas hydrophila in silver catfish (Rhamdia quelen). *Veterinary Parasitology*, v.197, p.522-526, 2013.

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

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

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

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

TSUZUKI, M. Y., AIKAWA, H., STRÜSSMANN, C. A., TAKASHIMA, F. Physiological responses to salinity increases in the freshwater silversides *Odontesthes bonariensis* and *O. hatcheri* (Pisces, Atherinidae). *Revista Brasileira de Oceanografia*, v48, p81-85, 2000.

TSUZUKI, M. Y., OGAWA, K., STRÜSSMANN, C. A., MAITA, M., TAKASHIMA, F. Physiological responses during stress and subsequent recovery at different salinities in adult pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Aquaculture*, v.200, p.349-362, 2001.

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

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

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

VELISEK, J.; WLASOW, T.; GOMULKA, P.; SVOBODOVA, Z.; NOVOTNY, L. Effects of 2- phenoxyethanol anaesthesia on sheatfish (*Silurus glanis* L.). *Veterinarni Medicina*, v.52, p.103-110, 2007.

VOLPATO, G. L.; GONÇALVES-DE-FREITAS, E. e FERNANDES-DE-CASTILHO, M. Insights into the concept of fish welfare. *Diseases of Aquatic Organisms* 75 (2): 165-171, 2007.

WAGNER, E.; ARNDT, R.; HILTON, B. Physiological stress responses, egg survival and sperm motility for rainbow trout broodstock anesthetized with clove oil, tricaine methanesulfonate or carbon dioxide. *Aquaculture*, v. 211, p. 353-366, [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00878-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00878-X), 2002.

WALLACE, J. C.; KOLBEINSHAVN, A. G.; REINSNES, T. The effects of stocking density on early growth in Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.). *Aquaculture*, Amsterdam, v. 73, p. 101-110, 1988.

WALSH, W.A.; SWANSON, C.; LEE, C.S.; BANNO, J.E.; EDA, H. Oxygen consumption by eggs and larvae of striped mullet, *Mugil cephalus* in relation to development, salinity and temperature. *J. Fish. Biol.*, 35: 347-358. 1989.

WEBB, M.; ERICKSON, D. Reproductive structure of the adult green sturgeon, *Acipenser medirostris*, population in the Rogue River, Oregon. *Environmental Biology of Fishes*, v.79, p.305-314, 2007.

WEBER, E. S. 3rd. Fish Analgesia: Pain, Stress, Fear Aversion, or Nociception? *Veterinary Clinic of Exotic Animal*, v.14, p.21-32, 2011.

WEBER, E. S.; WEISSE, C.; SCHWARZ, T.; INNI, C.; KLIDE, A. M. Anesthesia, diagnostic imaging, and surgery of fish. *Compendium: Continuing Education for Veterinarians*, v.31, n.2, E1-9 Online, 2009.

WELLS, R. M. G.; TETENS, V.; DEVRIES, A. L. Recovery from stress following capture and anaesthesia of Antarctic fish: haematology and blood chemistry. *Journal of Fish Biology*, v.25, p.567-576, 1984.

WENDELAAR BONGA, S. E. The stress response in fish. *Physiological Reviews*, v.77, p.591-625, 1997.

WHITEAR, M. The free nerve endings in fish epidermis. *Journal of Zoology (London)*, v.163, p. 231-236, 1971.

WILDGOOSE, W. H. Fish surgery: an overview. *Fish Veterinary Journal*, n.5, p.22-36, 2000.

WILKIE, M. P. Mechanisms of ammonia excretion across fish gills *Comparative Biochemistry and Physiology - A Physiology*, 1997.

WILLIAMS, T. D.; READMAN, G. D.; OWEN, S. F. Key issues concerning environmental enrichment for laboratory-held fish species. *Laboratory Animals*, v. 43, p.107-120, 2009.

WOLFF, L. L.; DONATTI, L. Estudo do comportamento do peixe de água doce *Phalloceros harpagos* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) submetido à alteração artificial do pH. *Luminária*, v. 18, n. 1, p. 10-21, 2016.

WOLKERS, C.P.B., BARBOSA JUNIOR A., MENESCAL-DE-OLIVEIRA L., HOFFMANN A. Acute administration of a cannabinoid CB1 receptor antagonist impairs stress-induced antinociception in fish. *Physiology and Behavior*, v.142, p.37-41, 2015a.

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

WOLKERS, C. P. B.; JUNIOR, A. B.; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L.; HOFFMANN, A. Stress-induced antinociception in fish reversed by naloxone. PLoS One, v.8, n.7, e71175, 2013.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

ZERAIK, V. M.; BELÃO, T. C.; FLORINDO, L. H.; KALININ, A. L.; RANTIN, F. T. Branchial O<sub>2</sub> chemoreceptors in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: Control of cardiorespiratory function in response to hypoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, v. 166, p. 17-25, 2013.

ZHENG, J.-L., YUAN, S.-S., LI, W.-Y., WU, C.-W. Positive and negative innate immune responses in zebrafish under light emitting diodes conditions. *Fish Shellfish Immunol.*

ZIMMERMAM, S. FITZSIMMONS, K. 2004; Tilapicultura intensiva. In: CYRINO, J.E.P. et al. (Ed.). *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia Aquática. TecArt, Cap.9, p.239-266, *Modelos Limnológica*, 2002.

ZINABU, G. M.; CHAPMAN, L. J.; CHAPMAN, C. A. Conductivity as a predictor of a total cations and salinity in Ethiopian lakes and rivers: Revisiting earlier models. *Limnologia* 32 (21-26), 2002.