

## ANEXO I

### Peixes mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica - I

#### 1. Introdução

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

Considerando essa variedade biológica, um ponto importante para iniciar as pesquisas utilizando-se peixes como modelo biológico é a escolha da espécie a ser estudada. Essa escolha é importante para definir as instalações, como por exemplo, água doce ou marinha. É importante a escolha de uma espécie que já apresente domínio no cultivo, com altas taxas de sobrevivência, para que os parâmetros de qualidade de água, reprodução, nutrição, sanidade, sejam conhecidos. É importante também ter o conhecimento de fontes de fornecimento desses animais. Espécies com importância econômica normalmente apresentam maiores facilidades para aquisição em pisciculturas comerciais. No entanto, muitos estudos podem ser realizados com espécies cujo único acesso é o ambiente natural. Nesse caso, deve ser considerada a solicitação das licenças ambientais para captura e manutenção (<http://www.icmbio.gov.br/sisbio/http://www.icmbio.gov.br/sisbio/http://www.icmbio.gov.br/sisbio/>), e as recomendações para se trabalhar com esses animais estão contempladas no Guia CONCEA capítulo **Animais silvestres de vida livre**.

Em termos objetivos, neste capítulo iremos abordar as espécies que são mais usadas em pesquisa ou ensino: lambari, tilápia e zebrafish.

#### 2. Biologia

##### 2.1 Lambari

Os lambaris pertencem à família Characidae, ordem Characiformes. O gênero *Astyanax* é o mais numeroso de toda a ordem (Nelson, 2006). Nos estudos biológicos com esses animais, as espécies mais utilizadas no Brasil são *Astyanax*

*fasciatus* (lambari-do-rabo-vermelho) e *Astyanax altiparanae* Garutti and Britski (2000) (lambari-do-rabo-amarelo ou tambiú). *A. fasciatus* é uma espécie que ainda vem sendo estudada do ponto de vista citogenético, pois representa um grupo de animais com diferentes cariótipos (Pazza et al., 2007), sendo inclusive sugerida a existência de duas diferentes linhagens com aspectos morfológicos similares que estariam vivendo em simpatria (Pansonato-Alves et al., 2013). Além das questões citogenéticas, a manutenção de indivíduos de *A. fasciatus* no laboratório apresenta dificuldades pelo seu comportamento agressivo (Langecker et al., 1995) e baixa sobrevivência (Correia, 2008), portanto não será abordado neste capítulo.

*A. altiparanae* é uma espécie que vem sendo utilizada intensamente como modelo experimental em várias áreas. Representantes dessa espécie apresentam a nadadeira caudal amarela, têm pequeno porte (10-15 cm de comprimento) com massa corpórea de até 60g e hábito alimentar onívoro (Porto-Foresti et al., 2010). Apresenta algumas características importantes para sua manutenção em laboratório, como facilidade de manejo, aceitação de alimentação artificial, alta prolificidade, crescimento rápido, atingindo a maturidade sexual em cerca de 4 meses de idade (Porto-Foresti et al., 2010; Gonçalves et al., 2014). Essas características têm levado recentemente o gênero *Astyanax* a ser considerado como um ótimo modelo experimental, principalmente em estudos que abordam biologia, ecotoxicologia e fisiologia reprodutiva (Gomes et al., 2013; Vieira et al., 2013; Chehade et al., 2014; Costa et al., 2014; Jesus et al., 2014; Adolphi et al., 2015; Brambila-Souza, 2015; Gomes, 2015; Siqueira-Silva et al., 2015; Yasui et al., 2015; Bettim et al., 2015). O dimorfismo sexual em *Astyanax* é apenas observado durante o período reprodutivo, quando os machos apresentam aspereza da nadadeira anal.

## 2.2 Tilápia

A tilápia pertence à família Cichlidae e é originária de países da África e do Oriente Médio. Existem 77 espécies já descritas, pertencentes aos gêneros *Tilapia*, *Sarotherodon* e *Oreochromis*, estando 22 difundidas em países de clima tropical e/ou subtropical onde são criadas em escala experimental e/ou em produção comercial. No Brasil, a tilápia do Congo (*Tilapia rendalli*) foi a primeira espécie introduzida, em 1953, seguida pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em 1971 e as tilápias vermelhas (*Sarotherodon hornorum*) em 1981. Tilápias são espécies que apresentam características favoráveis ao cativeiro, como adaptabilidade a condições ambientais

variáveis, conversão alimentar e ganho de peso adequados, rusticidade, aclimação ao confinamento e resistência a baixos níveis de oxigênio dissolvido e a doenças.

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

A tilápia possui dentes rudimentares nos lábios, intestino bastante longo, respiração do tipo branquial e corpo coberto de escamas. O dimorfismo sexual é feito pelos orifícios na região urogenital: o macho apresenta dois, o ânus e o orifício urogenital, e a fêmea três, o ânus, a abertura genital (microscópico) e a urinária. Outras características que podem ser utilizadas na diferenciação sexual são o menor porte e o escurecimento na região gular das fêmeas reprodutoras, enquanto os machos em idade reprodutiva podem apresentar coloração rosada na cabeça e na extremidade da nadadeira caudal e coloração azul/cinza na região abdominal (Ribeiro, 2001; MAPA, 2007).

É uma espécie ovípara que atinge a maturidade sexual ao redor dos 5-6 meses, ocorrendo desova quando a temperatura da água está em torno de 24°C. O processo reprodutivo começa quando o macho estabelece seu território, escava um ninho de 20 a 50 cm de diâmetro no substrato e passa a protegê-lo, atraindo uma fêmea e cortejando-a por horas. A fêmea madura então desova no ninho e imediatamente coleta os óvulos na cavidade bucal. O macho ejacula onde os óvulos haviam sido postos e a fêmea coleta o material para que a fertilização ocorra na cavidade bucal e afasta do local, ficando o ninho disponível para desovas de outras fêmeas. Os ovos são incubados na cavidade bucal e as larvas são cuidadas até que o saco vitelínico seja absorvido. Dependendo da temperatura, isto ocorre ao longo de 1 a 2 semanas. As larvas são então liberadas na água, mas podem retornar à boca da fêmea na iminência de situações adversas, o que confere um alto índice de sobrevivência da progênie (em torno de 100%) (Ribeiro, 2001; FAO, 2015; FISHBASE, 2015).

Devido ao cuidado parental ocorrer na cavidade bucal, o número de ovos por desova é menor se comparado a outras espécies de água doce, podendo uma fêmea de 600 a 1000 g produzir 1000 a 1500 ovos. Se a temperatura se mantiver na faixa

adequada para desova, a fêmea pode realizar nova desova a cada liberação das larvas da cavidade bucal ao fim do período de cuidado parental (pode desovar de 8 a 12 vezes/ano). Enquanto incuba os óvulos, a fêmea não se alimenta por duas ou mais semanas. Quando os jovens são então liberados, a energia da fêmea passa a ser canalizada para o desenvolvimento de novos óvulos, ficando o crescimento e a deposição de gordura estagnados. Após a maturidade as fêmeas apresentam redução drástica no crescimento, pois direcionam grande parte da energia do alimento para a produção de ovos (para cada grama de peso vivo, um a um e meio óvulos são produzidos), então os machos atingem o peso comercial mais cedo. Tilápias podem viver por mais de 10 anos e pesar aproximadamente 5 kg (Ribeiro, 2001; MAPA, 2007; FAO, 2015; FISHBASE, 2015).

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

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

### 2.3 Zebrafish

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

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

O zebrafish é classificado como um peixe ósseo. Seu esqueleto axial inclui coluna vertebral e nadadeiras ímpares. Possuem corpos esguios e alongados, com uma cabeça curta, narina protuberante e uma boca inclinada e voltada para cima. A mandíbula superior possui uma saliência (protrusão) que possibilita a abertura da boca e ajuda na sucção de alimentos. A característica mais marcante do peixe zebra é o seu padrão de listras azuis e brancas ao longo do corpo e da nadadeira anal e caudal (Figura 1).



Foto Camila Carvalho

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

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



Foto: Mônica Lopes Ferreira

Figura 2 – (A) Estágios embrionários do Zebrafish.

Tabela I – Características dos estágios embrionários do Zebrafish

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

Em condições apropriadas, o zebrafish se reproduz continuamente durante a maturidade sexual. Sua grande fertilidade é uma de suas principais características. A liberação de feromônios pelo macho induz a ovulação da fêmea. A fêmea, por sua vez, induz o comportamento de acasalamento no macho através da liberação feromônios durante a ovulação. Por esta razão é importante manter machos e fêmeas

juntos compartilhando a mesma água antes do acasalamento. Também muito importante é diferenciar machos de fêmeas. Machos são geralmente mais delgados e escuros que as fêmeas. As fêmeas são muito mais desenvolvidas e atingem a maturidade sexual antes dos machos. Elas tendem a ser maiores e com suas cores um pouco mais suaves. No corpo da fêmea predomina o branco prateado e no macho, o amarelo ouro (Spence et al. 2008 ).

Tabela II – Principais Sistemas do Peixe zebra

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

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

A eficácia do protocolo de acasalamento irá determinar a quantidade de produção de ovos viáveis. Diferentes protocolos podem ser utilizados para a reprodução do peixe zebra em biotérios. Um dos principais e mais utilizados em

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

Os animais exibem rituais de acasalamento antes e durante a desova. Os machos competem pelas fêmeas, estabelecendo e defendendo território. Durante a cômte, nadam em círculos para que as fêmeas os percebam. No momento da desova nadam paralelo com as fêmeas, provocando a liberação dos óvulos e simultaneamente liberando o esperma para que ocorra a fecundação. Os embriões devem ser retirados do sistema de acasalamento o mais rápido possível evitando possíveis contaminações (Figura 3). Em seguida devem ser de maneira cuidadosa lavados com água limpa e transferidos para placas de Petri preenchidas com água. Um meio de evitar contaminação é utilizar azul de metileno (0,00003%) dissolvido em água. Após 12 ou 24 horas os embriões não-viáveis são facilmente identificados por sua aparência esbranquiçada e devem ser imediatamente retirados. Os ovos vão permanecer em recipientes de incubação até que as larvas eclodam e inflem a bexiga natatória. Os ovos do peixe zebra eclodem de 2-3 dias pós-fertilização (dpf). Após esses procedimentos, os ovos ficam em repouso, em recipientes de incubação, até que as larvas eclodam e inflem as bexigas natatórias (Westerfield, 2007).

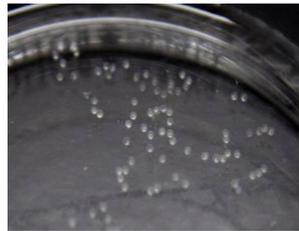


Foto Camila Carvalho

Figura 3 – Ritual de acasalamento e embriões.

### 3. Instalações

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

As condições da sala dependem muito do objetivo do trabalho. No entanto, de uma forma geral, a sala deve ter controle de temperatura de forma a facilitar a manutenção da temperatura da água (com aquecedores ou *chillers*). Considerando-se que o fotoperíodo não seja uma variável a ser analisada, recomenda-se o fotoperíodo natural (12 horas de luz), mas os animais toleram variações no fotoperíodo caso este seja o foco experimental.

A sala dos aquários deve apresentar um sistema de abastecimento de água, que pode ser da rede de tratamento; no entanto deve ser previsto um reservatório de armazenamento de água para que esta possa ser mantida ao menos 12-24 horas antes do abastecimento dos aquários, com a finalidade de volatilizar o cloro da água. É ideal

que este reservatório esteja localizado acima do nível dos aquários, de forma que os mesmos possam ser abastecidos por gravidade. Caso contrário, deve ser prevista a instalação de uma bomba, dimensionada de acordo com as necessidades de renovação e abastecimento de água dos aquários.

### 3.2 Aquários, qualidade da água e higienização

A água é o meio ambiente no qual os peixes vivem, sendo cruciais os cuidados com parâmetros que irão determinar o bem estar do animal. Neste quesito parâmetros de temperatura, pH, condutividade e compostos nitrogenados são de extrema importância. De uma forma geral, o manejo da água está diretamente relacionado à biomassa do aquário, temperatura da água e qualidade do alimento. As variáveis que devem ser monitoradas nos aquários e seus respectivos parâmetros são indicados na Tabela III, dentro dos limites desejáveis para cada espécie abordada neste capítulo.

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

	Lambari	Tilápia	Zebrafish
Oxigênio Dissolvido	> 4 mg/L	> 4 mg/L	≈7,8 mg/L
Amônia	< 1 mg/L	< 0,20 mg/L	<0,002 mg/L
pH	6,5-8,0	6,0 - 8,5	7,0 - 8,0
Temperatura	24-28°C	31-36°C	24 – 30°C

### 3.3 Exigências e particularidades de cada grupo

Não existe um tamanho ou volume padrão de aquários para a manutenção de indivíduos de *A. altiparanae*. Deve-se levar em conta a densidade de manutenção destes animais que não pode passar de 0,5-2g/L. Nas densidades mais elevadas é recomendada a troca de água a cada 24 ou no máximo 48 horas de experimento, sendo que esta troca pode ser total ou parcial. Na troca parcial, pode-se chegar até 70% de renovação da água do aquário, e na necessidade de troca total, os animais são geralmente mudados de aquários. Podem ser estabelecidos ainda sistemas de recirculação de água.

É importante destacar que dificilmente será obtida a reprodução de lambaris em aquários. Em cultivos dessa espécie em viveiros de piscicultura, a reprodução pode ocorrer naturalmente, mas normalmente opta-se pelo método de reprodução induzida, suplementando hormônios do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas.

### **3.4 Enriquecimento ambiental**

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

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

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

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

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

A tilápia demonstra alta resistência a baixos níveis de oxigênio dissolvido podendo viver sob anóxia por algumas horas, uma vez que regula o consumo de  $O_2$  à medida que os níveis na água vão baixando. Contudo, sua manutenção em ambientes com escassez de oxigênio dissolvido a torna mais susceptível a doenças e reduz seu desempenho. Na faixa de temperatura de 26-35°C, o nível crítico de  $O_2$  é de 20-10% da saturação (Kubitza, 2000a).

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

O pH adequado para a manutenção da tilápia está entre 6 e 8,5, ocorrendo alta mortalidade abaixo de 4,5 e acima de 10,5. Em ambientes muito ácidos, como é o caso de viveiros com excesso de fitoplâncton e baixa alcalinidade (<20mg de  $CaCO_3/L$ ) ao final de dias muitos ensolarados, há aumento na secreção de muco e inchaço do tecido branquial, podendo evoluir para a destruição do mesmo. A mortalidade não é considerável nesses casos de alta acidez porque os peixes procuram

águas profundas como escape, mas a toxidez por amônia pode ficar exacerbada, além da menor resistência a doenças e ao estresse do manejo (Kubitza, 2000a).

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

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

Os extremos inferior e superior de temperatura para a tilápia são 12 e 42°C, sendo a faixa de preferência para um melhor crescimento de 31 a 36°C. Em baixas temperaturas a tilápia reduz o consumo de alimento, apresenta crescimento mais lento, menor resistência a doenças e maior predisposição à mortalidade durante o manejo (Kubitza, 2000a; Ribeiro, 2001).

A tolerância das tilápias à salinidade é determinada por fatores como a estratégia de adaptação, a idade, a prévia exposição de ovos e pós-larvas e principalmente o tamanho. Salinidade ao redor de 10-12 ppt são consideradas isoosmóticas para as tilápias, sendo a faixa onde há o menor gasto de energia com a osmorregulação e assim o crescimento é favorecido. O aumento gradual da salinidade de 5 ppt ao dia determina maior sobrevivência do que a transferência direta. A tolerância à salinidade aumenta com a idade, sendo que a variedade vermelha da Flórida apresenta melhor resultado aos 40 dias de vida e a tilápia do Nilo tem tolerância baixa até 40-45 dias de vida, podendo ser posteriormente aclimatada e se reproduzir normalmente em até 15 ppt. A tilápia de Moçambique e a tilápia de Zanzibar apresentam grande tolerância à alta salinidade, reproduzindo com eficiência em 32 ppt. A tilápia azul também pode ser aclimatada à água salgada, apresentando melhor crescimento em 10 ppt, assim como a tilápia do Nilo. Para esta, a tolerância máxima a salinidade ocorre a partir de 5 ppt e para tilápia de Moçambique e seus híbridos a partir de 2,5 ppt (Kubitza, 2000a).

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

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

Em relação à dureza da água, há considerável variação entre instalações laboratoriais devido a características próprias, incluindo origem da água (rede de tratamento, destilador ou osmose reversa), adição de sais de cálcio e magnésio, tamponamento com bicarbonato, etc. Via de regra, valores de dureza entre 75-200 mg/L CaCO<sub>3</sub> são considerados adequados para peixes de água doce (Wurts, 2002). Zebrafish prefere águas mais duras, excedendo 100 mg/L CaCO<sub>3</sub> (Lawrence, 2007).

### **3.6 Transporte**

Para o transporte de animais, inicialmente sugere-se um período de jejum de 24 horas para que o trato digestório seja esvaziado. O transporte pode ser realizado em caixas especializadas para transporte de peixes, com suprimento de oxigênio. Alternativamente, podem ser utilizados sacos plásticos, pelo período máximo de 8-10h, com uma biomassa máxima de 50g/L. Recomenda-se acrescentar 3 a 6g/L de NaCl na água de forma a reduzir o estresse no transporte. No saco plástico, apenas 2/3 do volume deve estar preenchido com água e 1/3 deve ser preenchido com oxigênio. A temperatura deve também estar dentro dos limites acima colocados, caso contrário deve haver renovação parcial ou total da água. Recomenda-se que o transporte dos animais seja realizado nos momentos de menor temperatura do dia (início da manhã ou final da tarde), e de preferência em veículos com ar condicionado. Além disso, antes de iniciar os experimentos, é recomendado que os animais passem por um período de quarentena.

### **4. Alimentação**

Os requerimentos nutricionais das espécies devem ser estabelecidos e essa informação deve ser aplicada de maneira adequada para que se promova máximo crescimento, sobrevivência, reprodução e atividade imune dos animais.

*A. altiparanae* tem hábito alimentar onívoro e aceita rações comerciais. A ração fornecida vai depender da fase do ciclo de vida que estes animais se encontram. Para as larvas devem ser fornecidas rações em pó ou trituradas, com teor de proteína de 30-36% de proteína bruta, com frequência de alimentação que pode variar de 4-6 vezes ao dia, sempre no período diurno. Na fase de juvenil a frequência alimentar pode ser reduzida para 2 vezes ao dia, assim como o teor de proteína da ração que

pode ser de 28-32%. Animais adultos podem ser mantidos com rações de 25-30% de proteína bruta, com frequência alimentar de apenas 1 vez ao dia.

A quantidade de alimento ofertado vai depender dos objetivos do experimento, assim como da possibilidade/necessidade de renovação de água. O alimento pode ser ofertado *ad libitum* ou então segundo a porcentagem da biomassa, que pode ser de 1-4% da biomassa/dia na fase adulta, chegando a valores próximos de 5-10% da biomassa/dia na fase larval. A definição da quantidade e frequência de alimento varia com os parâmetros de qualidade de água abaixo descritos.

A tilápia é fitoplantófaga, mas aceita alimentação artificial facilmente, seja farelada, peletizada ou extrusada. Por ocupar um baixo nível trófico na cadeia alimentar do ambiente aquático, possui grande capacidade de produzir proteína de alta qualidade através de fontes alternativas de proteína. O manejo alimentar e nutricional da tilápia depende de variáveis inerentes à dieta, como a frequência, a apresentação, a quantidade e a qualidade da mesma, em função da biomassa do tanque, da idade e do estado fisiológico e sanitário dos peixes, do sistema de cultivo, dos parâmetros de qualidade da água e da presença de plâncton. De forma geral, deve ser oferecida duas vezes ao dia de forma manual, especialmente se for extrusada (flutuante). Se for farelada ou peletizada, a qual é mais barata, recomenda-se o uso de comedouros submersos a 20-30 cm de profundidade. A conversão alimentar destes peixes encontra-se entre 1 a 2 pra 1: para cada quilograma de peixe produzido, serão consumidos 1-2 quilos de ração (Ribeiro, 2001).

A manutenção do alimento natural na dieta da tilápia possui fundamental importância a fim de se obter maior crescimento a um custo reduzido, uma vez que o fitoplâncton é rico em energia e em proteína de alta qualidade e assim as rações não precisam ser nutricionalmente completas. Isto é obtido em viveiros com baixa renovação de água, mas não no cultivo intensivo em tanques-rede e raceways, os quais requerem rações completas, com balanço de aminoácidos essenciais, adequados níveis proteicos, correta relação energia/proteína e suplementação vitamínica e mineral, objetivando o equilíbrio nutricional (Kubitza, 2000a). Deficiência de certos nutrientes podem causar: redução no crescimento, conversão alimentar e reduzida mineralização dos ossos (cálcio); escoriações lombares, deformações na boca, maior predisposição a agentes patogênicos, taxa de eclosão reduzida, deformidades em embriões, crescimento lento e comprometimento da sobrevivência de pós-larvas e jovens (vitamina C) (Kubitza, 2000a; Ribeiro, 2001).

A proteína é o nutriente mais indispensável na dieta, por ser continuamente utilizada na manutenção, crescimento e reprodução, devendo, portanto, ser continuamente reposta. Devido ao alto custo, deve aparecer na correta relação energia/proteína, garantindo seu uso para as funções mencionadas acima e não como fonte de energia. Assim, apesar de não ser um nutriente, a energia também apresenta papel fundamental na dieta da tilápia, devendo aparecer na quantidade necessária já que seu excesso leva os peixes à obesidade e reduz a ingestão da dieta e por consequência o consumo dos demais itens presentes na mesma. Já a proteína em excesso não afeta o consumo da dieta. O nível ótimo de proteína na dieta da tilápia é influenciado pelo tamanho e idade dos peixes, variando de 28% a 50%, podendo ser de origem vegetal (Shiau, 2002). Assim como os demais peixes, a tilápia necessita dos 10 aminoácidos essenciais: arginina, fenilalanina, histidina, isoleucina, leucina, valina, metionina, treonina, triptofano e lisina (NRC, 2011).

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

## **5. Doenças mais comuns e cuidados**

A manutenção da qualidade da água, manejo alimentar e experimental dos lambaris são os principais pontos a serem considerados para que não se instalem doenças nos indivíduos. As doenças ocorrem principalmente em situações nas quais a concentração de oxigênio dissolvido é mantida abaixo do limite mínimo desejável, a concentração de amônia mantida acima do limite máximo, sobras de alimentos são

mantidas nos aquários, além de biomassas excessivas. Recomenda-se ainda que os utensílios utilizados nos aquários (como redes, puçás, termostatos, aeradores, dentre outros), sejam limitados a cada aquário, para que as doenças não sejam transmitidas entre animais de diferentes aquários.

Variações na temperatura da água são as principais causas do surgimento de fungos, como a *Saprolegna*, e protozoários, como *Ichthyophthirius multifiliis*, que surgem quando a temperatura na água está abaixo de 20°C. Um ectoparasita muito comum em lambaris é a *Lernaea* sp. De uma forma geral, medidas profiláticas como abastecimento com água não infectada, desinfecção dos peixes transferidos para nova localidade e sua quarentena na chegada são sugeridas. Muitos tratamentos com medicamentos já foram desenvolvidos e estes só podem ser utilizados com a orientação de um médico veterinário.

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

Alterações em fatores ambientais, nutricionais, genéticos e sanitários podem causar alterações no ambiente de cultivo que tornam as tilápias menos resistentes a certos patógenos comumente encontrados na água, porém sem determinar doença nos peixes (Pavanelli et al. 2002; Kubitza, 2008; Roberts, 2012). Portanto, o método profilático é o mais indicado a fim de se evitar a ocorrência de surtos no ambiente de cultivo, devendo-se: manter a qualidade da água, observando variáveis como temperatura, oxigênio dissolvido e pH; evitar o acúmulo de matéria orgânica; oferecer dieta na qualidade e quantidade adequadas às exigências nutricionais da fase de desenvolvimento; evitar manuseio grosseiro, prevenindo a perda de escamas e o aparecimento de lesões; minimizar estressores físicos e fisiológicos (transporte,

biometria, etc.); utilizar a densidade de estocagem condizente; realizar quarentena antes da introdução de animais no plantel e adquiri-los de fornecedores idôneos (i.e., portadores de licença ambiental, de acordo com a Resolução CONAMA vigente. Separar unidades de produção (berçário, crescimento, etc.); realizar inspeção sanitária de rotina por pessoal técnico especializado (inspeção externa e interna e exames laboratoriais); atentar para alterações comportamentais; retirar peixes mortos ou moribundos dos tanques, pois podem servir como reservatório de agentes infecciosos; dar o correto descarte às carcaças; desinfetar o material de uso rotineiro (redes, puçás, etc.); restringir o uso de antibióticos apenas à ocorrência de surtos para evitar o desenvolvimento de resistência; controlar infestações por parasitas, que podem ser vetores de doenças; e controlar a população de outros animais nas proximidades dos tanques, uma vez que podem servir como vetores de doenças ou hospedeiros intermediários de parasitas (Pavanelli et al., 2002; Kubitza, 2008; Figueiredo et al., 2009; Pádua et al., 2012; Roberts, 2012; Kubitza et al., 2013).

As principais doenças que acometem as tilápias e os peixes-zebra são:

- Septicemia móvel por *Aeromonas* (SMA). É a doença bacteriana mais comum em peixes de água doce e pode ser causada por diversas espécies, sendo *A. hydrophilla*, *A. caviae* e *A. sobria* as mais patogênicas. Em tilápias, ocorre com maior frequência em temperaturas baixas ou amenas devido à resposta imune diminuída, mas a elevação da temperatura acima de 30°C também predispõe à ocorrência de surtos. A enfermidade provoca septicemia, podendo também ocorrer na forma de doença ulcerativa. Os sinais clínicos mais frequentes são anorexia, anemia (palidez das brânquias e mucosas), letargia, perda de equilíbrio, queda de escamas, úlceras disseminadas pelo corpo, erosão e hemorragia nas nadadeiras, ascite e exoftalmia (Kubitza, 2000b; Pavanelli et al., 2002; Costa, 2003; Figueiredo et al., 2008; Roberts, 2012). Em zebrafish, os principais sinais clínicos são eritema na base das nadadeiras ventrais e na nadadeira dorsal, associadas a infecções bacterianas da bexiga natatória; no entanto, septicemias Gram-negativas também podem produzir esses sintomas, e o diagnóstico final só pode ser determinado a partir do exame histopatológico da bexiga natatória (Kent et al., 2007). Marcadores genéticos específicos também podem ser amplificados por PCR, podendo por vezes ser detectados na água (Singh *et al.*, 2013)

- Vibriose. Causada por bactérias do gênero *Vibrio*, em especial *V. anguillarum*. A sintomatologia é semelhante à da SMA, por isso se faz necessário o

diagnóstico diferencial por meio de isolamento em amostras de órgãos ou sangue e técnicas bioquímicas e moleculares (Kubitza, 2000b; Figueiredo et al., 2008).

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

- Edwardsiellose. Doença bacteriana causada pelas espécies *Edwardsiella tarda* e *Edwardsiella ictaluri*, que possuem caráter zoonótico. Ocorrem lesões cutâneas na cabeça, musculatura e cauda, podendo haver exposição da musculatura com presença de abscessos com tecido necrótico, bolhas gasosas e mau odor (Baraúna, 2008; Roberts, 2012). Como manifestação típica das septicemias Gram-negativas em peixes, causa alta mortalidade e eritema difuso nos animais sobreviventes. Em zebrafish, o diagnóstico pode ser obtido através de secções coradas com hematoxilina e eosina, revelando alterações necróticas no prosencéfalo, nervos e narinas (Kent et al., 2007). O diagnóstico confirmatório pode ser obtido por cultura em ágar sangue ou ágar infusão de cérebro e coração (BHI) e identificação bioquímica da bactéria. A amplificação de uma sequência específica de rDNA (AF310622) pode auxiliar no diagnóstico molecular (Kent et al., 2007).

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

-Microsporidiose neural. Doença fúngica causada por parasitos intracelulares (*Pseudoloma neurophilia*) de ciclo de vida complexo, transmitido por canibalismo ou por transmissão vertical. Associada a emaciação severa e curvatura espinhal, mas esse sinais não são específicos para a doença. O sítio primário da

infecção é o sistema nervoso central e raízes nervosas; os esporos podem ser visualizados em cortes histológicos de rotina, mas sua detecção é facilitada por coloração de Gram (Kent et al., 2007). O parasito pode se alojar em estruturas importantes no controle do comportamento defensivo, sendo altamente relevante para pesquisadores que estudam variáveis comportamentais em zebrafish (Spagnoli et al., 2015). Testes moleculares para *P. neurophilia* por PCR são altamente específicos e sensíveis (Kent et al., 2007). Em sistemas de recirculação, a utilização de esterilizadores ultravioleta (30.000-50.000  $\mu\text{Wsec/cm}^2$ ) é necessária para eliminar o parasito (Kent et al., 2007).

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

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

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

- Ictiofitiríase (Doença dos pontos brancos). Doença causada pelo protozoário ciliado *Ichthyophthirius multifiliis*. Pontos brancos visíveis a olho nu aparecem nas brânquias, nadadeiras e pele, juntamente com excessiva produção de muco. As lesões podem favorecer o estabelecimento de infecção bacteriana ou fúngica secundária e, se ocorrerem de forma severa nas brânquias, podem dificultar a ventilação (Kubitza, 2000b). Para zebrafish, o tratamento recomendado é banho externo em formalina (1:4000 ou 1:5000) por 1 h (Kent et al., 2007).

- Outros protozoários ectoparasitas. Pequenas quantidades são geralmente encontradas em tilápias aparentemente saudáveis, determinando grandes infestações

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

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

Indicadores mais frequentes de estresse em zebrafish são:

- a) Mudança de Coloração - a mudança ocorre em função de estresse fisiológico, subordinação social e muito comumente estímulos ambientais;
- b) Anormalidades morfológicas – os indicadores mais comuns de estresse são anormalidades nas brânquias, olhos e nadadeiras. Visualizamos opacidade nas nadadeiras e a descoloração nas brânquias, alterações que ocorrem como consequência de múltiplos fatores e que podem indicar a presença de um problema crônico subjacente, associado à má qualidade da água.
- c) Taxas de crescimento - podem variar de acordo com a genética, parâmetros ambientais, densidade e nutrição. Uma taxa de crescimento reduzida, especialmente nos primeiros estágios de vida, pode ser um indicativo de estresse crônico, de que o sistema de criação não está adequado.
- d) Desempenho reprodutivo – muitos são os fatores que podem provocar alteração no desempenho reprodutivo entre os principais podemos citar: desequilíbrio nutricional, desequilíbrio na química da água, perturbações no ambiente e idade do animal.

## **6. Procedimentos em atividades de ensino ou pesquisa científica**

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

É importante que todo o manejo dos animais seja realizado utilizando-se um pano ou toalha molhada para que a região das brânquias e opérculo seja mantida úmida. Deve-se evitar qualquer contato das mãos com o corpo dos animais, evitando assim a retirada de muco e/ou escamas, o que pode ocasionar lesões. Após imersão dos animais no anestésico, as seguintes características comportamentais devem ser observadas: 1) Movimentos operculares sem ritmo; 2) O equilíbrio começa a ficar prejudicado e o animal apresenta dificuldades para manter o equilíbrio, mesmo parado; 3) Ocorre perda total do equilíbrio e os animais não conseguem permanecer na posição vertical. Em alguns casos podem até mesmo ficar com a região ventral voltada para cima; 4) Incapacidade de reagir a qualquer estímulo. Nesta etapa, o animal pode ser capturado com o puçá para os procedimentos experimentais. Para reverter os efeitos da anestesia, deve-se colocar o animal em água sem a adição de nenhum produto químico, bem oxigenada, e se possível, colocá-lo em água corrente. Em poucos minutos, o animal retorna ao seu comportamento inicial.

Ainda em termos experimentais, a tilápia demonstrou ser um ótimo receptor para transplante de células germinativas, o que possibilitou a avaliação da função testicular, a espermatogênese e a biologia da espermatogônia tronco de forma pioneira em um modelo experimental písceo (Lacerda et al., 2006).

### **6.1 Administração de substâncias**

A forma menos invasiva de se administrar substâncias a peixes é em banhos de imersão, sendo esta a via de eleição principalmente quando se trata de lotes de animais. A substância é dissolvida na água (na concentração adequada ao volume da mesma) e absorvida através das brânquias (ou outros órgãos respiratórios) e/ou da pele. O método dispensa contenção física, poupando os animais de manipulações que podem ser estressantes e evitando lesões no tegumento, as quais podem tornar-se

porta de entrada para agentes infecciosos. Todos os parâmetros físico-químicos da água devem ser controlados, uma vez que podem influenciar a farmacodinâmica de substâncias dissolvidas na mesma. Ao se observar sinais de toxicidade, deve-se transferir prontamente os peixes para recipiente contendo água pura e devidamente aerada. Os antiparasitários são exemplos de fármacos geralmente administrados via banho de imersão (Carpenter, 2005; Sutili 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 de eleição para injeções intramusculares, que podem ser usadas para aplicação de antibióticos, por exemplo. Quando se optar por administração intracelomática, deve-se evitar a inoculação em órgãos internos (Yanong, 2006). Algumas substâncias, como os aditivos, podem ser incorporadas à dieta a ser oferecida aos peixes, sendo absorvidas no trato gastrointestinal (Saccol et al., 2013).

## **6.2 Colheita de tecidos, fluidos, secreções e excreções**

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

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

Material fecal pode ser coletado para visualização de parasitas no exame direto em microscópio. A coleta é feita facilmente pressionando-se regiões próximas à abertura anal, por isso deve-se atentar para a contaminação de outros tipos de

amostras, como raspados de epiderme, pois a pressão da lâmina pode induzir a eliminação tanto de fezes quanto de esperma nos machos. As fezes também podem ser obtidas via sonda cloacal.

Quanto à coleta de sêmen, deve-se eliminar a urina e as fezes antes da extração do mesmo; se isto não for possível, descarta-se a amostra. Se o macho estiver pronto para a reprodução, a liberação de sêmen ocorrerá quando a região abdominal for pressionada delicadamente da frente para trás até as proximidades do poro urogenital. O sêmen é então utilizado para avaliar as condições de saúde espermática, como motilidade, viabilidade e concentração de espermatozoides, podendo ser usado para criopreservação (Eiras et al., 2000; Yanong, 2006).

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

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

A coleta de sangue em peixes é extensamente realizada para a avaliação de parâmetros hematológicos, bioquímicos e morfológicos e pesquisa de hemoparasitas. O acesso mais explorado são os vasos da região caudal, localizados ventrolateralmente à medula espinhal. Para tal procedimento, o peixe pode ser apenas contido mecanicamente (no grupo controle em estudos para verificar o efeito de anestésicos) ou ainda estar sob efeito de um sedativo ou anestésico. Porém, apesar de serem utilizados para minimizar o estresse, tais fármacos podem promover alterações nos índices a serem avaliados (Velisek et al., 2007; Zahl et al., 2010; Gholipour Kanani & Ahadizadeh, 2013; Gomulka et al., 2014; Gressler et al., 2014). A punção

intracardiaca é menos utilizada, sendo a anestesia indispensável neste caso. Anticoagulantes (por ex., heparina, EDTA) são utilizados em quantidade mínima apenas para umedecer internamente a agulha e a seringa (Ranzani-Paiva et al., 2013).

### **6.3 Estudos embrionários e larvais**

Ovos, embriões e larvas devem ser mantidos com o mesmo cuidado destinado aos juvenis e adultos, evitando-se ambientes muito iluminados e aeração excessiva, o que pode levar à morte.

### **6.4 Modificação de ingestão de alimento**

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

### **6.5 Cirurgia experimental**

Estudos biológicos em peixes têm utilizado técnicas cirúrgicas minimamente invasivas como a intubação esofágica, a canulação da aorta dorsal e o cateterismo urinário a fim de reduzir o estresse relacionado à manipulação e amostragem. No caso da intubação esofágica, o objetivo é a administração de compostos diretamente no trato gastrointestinal, minimizando inconvenientes como a regurgitação (Glover & Hogstrand, 2002). A canulação da aorta dorsal permite o monitoramento de parâmetros sanguíneos e/ou plasmáticos através de coletas repetidas (Gingerich & Drottar, 1989; Belanger et al., 2001; Lo et al., 2003; Kiessling et al., 2009; Djordjevic et al., 2012). Outras técnicas de canulação vascular incluem a veia e a artéria caudal, vasos dos arcos branqueais e a veia porta hepática (Wells et al., 1984; McLean & Ash, 1988; Belanger et al., 2001; Karlsson et al., 2012). O cateterismo urinário tem sido realizado para estudar as funções renais e da bexiga urinária (Wood e Patrick 1994). Algumas destas técnicas são utilizadas em combinação durante protocolos experimentais, permitindo a avaliação da cinética de absorção, distribuição, metabolismo e excreção de certos compostos (Deng et al., 2000; Deng et al., 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 e Wagner, 2004; Erickson e Webb, 2007; Harms e Lewbart, 2011); biópsias teciduais (Gilliland, 1994; Grant, 1996; Murray, 2010); e

cirurgias reprodutivas com ou sem o uso de técnicas endoscópicas (Hernandez-Divers 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.

## **7. CUIDADOS NO MANEJO**

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

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).

### **7.2. 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 ventilação rápida, posição anormal e imobilidade são indicativos de dor em peixes. No entanto, são poucos os estudos investigando os efeitos farmacocinéticos de analgésicos nestes animais, o que faz com que a administração empírica dos mesmos seja baseada no conhecimento obtido a partir de outras espécies animais (Murray, 2002; Sneddon, 2012).

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

As propriedades analgésicas de anti-inflamatórios não-esteróides (por ex., cetoprofeno e carprofeno) e anestésicos (por ex., lidocaína) também têm sido testadas para prevenir ou tratar a dor em peixes (Weber et al., 2009; Roberts, 2010; Sneddon, 2012). Fármacos com ação analgésica podem ser administrados nestes animais pelas vias intramuscular, subcutânea e intracelomática (Carpenter, 2005).

### **7.3. Anestesia**

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; Zahl et al., 2012).

Os anestésicos também podem ser administrados em peixes pelas vias intravenosa, intracelômica, intramuscular e oral e por aspensão 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 tricaína (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., 2012a) 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., 2014).

Estudos avaliando protocolos anestésicos variados para objetivos distintos (ex: transporte, biometria, coleta de amostra biológica) em tilápias, principalmente *O. niloticus*, são frequentes. Quando testado em baixas concentrações diluídas na água, o propofol (0,15, 0,30 e 0,60 mL/L) promoveu anestesia eficiente e não causou efeitos genotóxicos e mutagênicos (Valença-silva et al., 2014). De forma semelhante, o eugenol promoveu anestesia mesmo nas mais baixas concentrações testadas (50, 75, 100, 150, 200 e 250 mg/L) (Vidal et al., 2008) e a benzocaína produziu sedação adequada na concentração de 190 mg/L (Okamura et al., 2010). Já a associação de tiletamina e zolazepam administrada via intramuscular (5, 10, 20, 30, 40 e 60 mg/kg) não induziu a níveis anestésicos (Borin et al., 2010).

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; Benovit et al., 2012; Gressler et al., 2012b; Toni et al., 2014).

Inicialmente, os anestésicos induzem um efeito sedativo. Em seguida há perda de equilíbrio, mobilidade, consciência e, por fim, de ação reflexa (Ross & Ross, 2008). Tais mudanças correspondem a estágios de indução à anestesia (Tabela IV), sendo o nível de depressão anestésica monitorado de acordo com o objetivo do procedimento. 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 IV - Estágios de indução à anestesia (modificado de Schoettger & Julin (1967))

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

A recuperação pode ser classificada nos seguintes estágios:

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

## 7.4 Cirurgia

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

Neoplasias, distúrbios do globo ocular (por ex., catarata), biópsias de fígado, rins e baço, distúrbios da bexiga natatória, problemas reprodutivos e ingestão de corpo

estranho constituem os procedimentos cirúrgicos mais comumente realizados em peixes (Wooster et al., 1993; Wildgoose, 2000).

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

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

### **7.5 Eutanásia**

A eutanásia é utilizada com o intuito de causar a morte rápida de animais com o mínimo de dor e sofrimento possíveis. A preparação para o procedimento deve considerar em primeiro plano o bem-estar do peixe, sendo este mantido dentro da sua zona de conforto (por ex., parâmetros físico-químicos da água, intensidade de luz e nível de ruído). Devem ser seguidas as recomendações publicadas na Diretriz da Prática de Eutanásia do CONCEA.

### **7.6 Necropsia**

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

histopatológico, microbiológico, toxicológico, parasitológico e citológico, a fim de determinar a *causa mortis* (Matushima, 2006).

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

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

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

### **7.7 Destino de carcaças**

As carcaças de peixes, bem como os restos de tecidos de animais necropsiados, devem ser acondicionados em recipientes específicos para descarte de material biológico devidamente selados e identificados. O material deve ser mantido sob congelamento até o recolhimento por empresas especializadas em destinação deste tipo de resíduo.

### **Referências bibliográficas**

Adolfi, M.C., Carreira, A.C.O.Jesus, L.W.O.; Bogerd, J.; Funes, R.M., Schart, M.; Sogayar, M.C.; Borella, M.I. 2015. Molecular cloning and expression analysis of *dmrt1* and *sox9* during gonad development and male reproductive cycle in the lambari fish, *Astyanax altiparanae*. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 13: 1-15.

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.

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.

Baraúna, L.C.R.I. Utilização de megadoses de vitamina C na ração de alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) submetidos à infecção experimental por *Edwardsiella tarda*. Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária, 2008. Dissertação. 52f.

Barreto, R.E.; Carvalho, G.G.A.; Volpato G.L. The aggressive behavior of Nile tilapia introduced into novel environments with variation in enrichment. *Zoology* v. 114, p. 53-57.

Batista, L. Papel do Enriquecimento Ambiental na cognição de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). Departamento de Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, 2010. Monografia. 26f.

Becker, A. G.; Cunha, M. A.; Garcia, L. O.; Zeppenfeld, C. C.; Parodi, T. V.; Maldane, G.; Morel, A. F.; Baldisserotto, B. Transportation of silver catfish, *Rhamdia quelen*, in water with eugenol and the essential oil of *Lippia alba*. *Fish Physiology and Biochemistry*, v.38, p.789-796, 2012.

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

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.

Bettim FL, Galvan GL, Cestari MM, Yamamoto CI, Silva de Assis HC. 2015. Biochemical responses in freshwater fish after exposure to water-soluble fraction of gasoline. *Chemosphere*, 144:1467-1474.

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

Brambila-Souza, G. 2015. Biologia reprodutiva de fêmeas de *Astyanax fasciatus* com números de cromossomos diferentes vivendo em ambiente natural e no cativeiro, São Paulo, 47f. Dissertação (Mestrado) em Ciências - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia.

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.

Brydges, N.M.; Braithwaite, V.A. 2009. Does environmental enrichment affect the

behaviour of fish commonly used in laboratory work? *Applied Animal Behaviour Science* v. 118, p. 137-143.

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.

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

Carvalho, T.B.; Mendonça, F.Z.; Costa-Ferreira, R.S.; Gonçalves-de-Freitas, E. 2013. The effect of increased light intensity on the aggressive behavior of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae). *Zoologia* v. 30, p. 125-129.

Chehade, C.; Cassel, M.; Borella, M.I.; Costa, F.G. 2014. Morphologic study of the liver of lambari (*Astyanax altiparanae*) with emphasis on the distribution of cytokeratin. *Fish Physiol Biochem*. 40:571-6.

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

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.

Collymore, C.; Tolwani, R. J.; Rasmussen, S. The behavioral effects of single housing and environmental enrichment on adult zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, v. 54, p. 280-285, 2015.

Colquhoun, D.J.; Duodu, S. 2011. *Francisella* infections in farmed and wild aquatic organisms. *Veterinary Research* p. 42-47. doi:10.1186/1297-9716-42-47.

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.

Correia, T.G. 2008. Influência do alumínio e do pH ácido sobre a fisiologia reprodutiva de peixes teleósteos continentais. São Paulo, 204f. Dissertação (Mestrado) em Ciências - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Fisiologia.

Costa, F.G.; Adolphi, M.C.; Gomes, C.C.; Jesus, L.W.O.; Batlouni, S.R.; Borella, M.I. 2014. Testes of *Astyanax altiparanae*: The Sertoli cell functions in a semicyclic spermatogenesis. *Micron*, v. 61, p. 20-27.

Costa, A.B. Caracterização de bactérias do complexo *Aeromonas* isoladas de peixes de água doce e sua atividade patogênica. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2003. Tese. 54f.

Cunha, M. A.; Barros, F. M. C.; Garcia, L. O.; Veeck, A. P. L.; Heinzmann, B. M.; Loro, V. L.; Emanuelli, T.; Baldisserotto, B. 2010. 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. 2008. Time-place learning in food-restricted Nile tilapia. *Behavioural Processes* v. 77, p. 126-130.

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

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.

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.

Eiras, J. C.; Takemoto, R. M.; Pavanelli, G. C. Métodos de Estudo e Técnicas Laboratoriais em Parasitologia de Peixes. Maringá: Eduem, 2000. 173 p.

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.

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.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2014. The State of World Fisheries and Aquaculture 2014. Rome. 223 p.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2015. Cultured Aquatic Species Information Programme - *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). Fisheries and Aquaculture Department. Disponível em: [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis\\_niloticus](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis_niloticus). Acesso em 05 Novembro 2015.

Figueiredo, H.C.P. 2007. Columnariose: Doença da piscicultura moderna. Panorama da aquicultura v. 17, p. 32-37.

Figueiredo, H.C.P.; Mian, G.F.; Godoy, D.T. 2007. Estreptococose em tilápia do Nilo - parte 1. Panorama da Aquicultura v. 19, p. 36-38.

Figueiredo, H.C.P.; Castro, G.A.C.; Leal, C.A.G.; Lopes, C.O. 2008. Quem tem medo de *Aeromonas*? Panorama da Aquicultura v. 17, p. 26- 31.

Figueiredo, H.C.P.; Castro, G.A.C.; Leal, C.A.G.; Netto, L.N. 2009. Uso de vacinas na piscicultura: verdades, mitos e perspectivas. Panorama da Aquicultura v. 19, p. 22-31.

FISHBASE, 2015. *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) Nile tilapia. Disponível em: <http://FishBase.org/Summary/speciesSummary.php?ID=2&genusname=Oreochromis&species>. Acesso em 05 Novembro 2015.

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.

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

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

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

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

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

Gomes, C. C. 2015. Expressão das diferentes formas de GnRH no encéfalo de lambari (*Astyanax altiparanae*). Tese (Doutorado) em Biologia Celular e Tecidual - Instituto de Ciências Biomédicas - USP.

Gomes, C.C.; Costa, F.G.; Borella, M.I. 2013. Distribution of GnRH in the brain of the freshwater teleost *Astyanax altiparanae*. *Micron*,52-53:33-8.

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.

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, 2012a.

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, 2012b.

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.40, n.5, 2014.

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

Harms, C. A.; 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. Surgery in fish. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, v.3, p.759-774, 2000.

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.

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.

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

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

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.

Kent, M. K.; Spitsbergen, J. M.; Matthews, J. M.; Fournie, J. W.; Westerfield, M. Diseases of zebrafish in research facility. Disponível em <http://zebrafish.org/zirc/health/diseaseManual.php>

Kiessling, A.; Johansson, D.; Zahl, I. H.; Samuelson, 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.

Klontz, G.W. (1971). In Animal Models for Biomedical Research, vol. 4. Symposium, pp. 27-30. National. Academy of Sciences, Washington, DC.

Kubitza, F. 2000a. Qualidade da água, sistemas de cultivo, planejamento da produção, manejo nutricional e alimentar e sanidade. Parte I. Panorama da Aquicultura v.10, p. 44-53.

Kubitza, F. 2000a. Qualidade da água, sistemas de cultivo, planejamento da produção, manejo nutricional e alimentar e sanidade. Parte I. Panorama da Aquicultura v.10, p. 44-53.

Kubitza, F. 2000b. Principais parasitoses e doenças em tilápias. Panorama da Aquicultura v.10, p. 39-53.

Kubitza, F. 2008. Tilápias na mira dos patógenos. Panorama da aquicultura v.18, p. 28-37.

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

Lacerda, S.M.S.N.; Batlouni, S.R.; Silva, S.B.G.; Homem, C.S.P.; França, L.R. 2006. Germ cells transplantation in fish: the Nile-tilapia model. Animal Reproduction v.3, p146-159.

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

Ino

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

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.

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

Lo, W-Y.; Chang, C-F.; Song, Y-L. Evaluation of dorsal aorta cannulation for immunological studies of grouper (*Epinephelus malabaricus*). Fish and Shellfish Immunology, v.14, p.289-303, 2003.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2007. Produção de tilápia: Mercado, espécie, biologia e recria. Circular Técnica 45. 12p.

Maricchiolo, G.; Genovese, L. 2011. Some contributions to knowledge of stress response in innovative species with particular focus on the use of the anaesthetics. The Open Marine Biology Journal, v. 5, p. 24-33, 2011.

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.

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

- 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.
- Merighe, G.K.F.; Pereira-da-Silva, E.M.; Negrão, J.A.; Ribeiro, S. 2004. Efeito da cor do ambiente sobre o estresse social em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Revista Brasileira de Zootecnia* v. 33, p. 828-837.
- Mian, G.F.; Godoy, D.T.; Leal, C.A.G.; Yuhara, T.Y.; Costa, G.M.; Figueiredo, H.C.P. 2009. Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. *Veterinary Microbiology* v.136, p.180-183.
- 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.
- Nelson, J.C. 2006. *Fishes of the World*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 622p.
- Nordgreen J.; Garner, J. P.; Janczak, A. M.; Ranheim, B.; Muir, W. M.; Horsberg, T. E. Thermnociception 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.
- NRC - National Research Council. *Nutrient requirements of fish*. Washington: National Academy Science, 2011. 376p.
- Okamura, D.; Araújo, F.G.; Rosa, P.V.; Freitas, R.T.F.; Murgas, L.D.S; Cesar, M.P. 2010. Influência da concentração de benzocaína e do comprimento dos peixes na anestesia e na recuperação de tilápias-do-Nilo. *Revista Brasileira de Zootecnia* v. 39, p. 971-976.
- Pádua, S.B.; Filho, R.N.M.; Cruz, C. 2012. Alevinos saudáveis: o ponto de partida para uma produção estável. *Panorama da Aquicultura* v. 22, p. 30-37.
- 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.
- Pavanelli, G. C.; Eiras, J. C.; Takemoto, R. M. *Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento*. 2. ed. Maringá: Eduem, 2002.
- Pazza, R.; Kavalco, K.F.; Prioli, S.M.A.P.; Prioli, A.J.; Bertollo, L.A.C. 2007. Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae), part 3: analysis of the RAPD and ISSR molecular markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35: 843-851.

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

Porto-Foresti, F., Castilho-Almeida, R.B., Senhorini, J.A. & Foresti, F. 2010. Biologia e criação do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). In: Espécies Nativas Para Piscicultura No Brasil, 2nd edn, Vol. 1 (Baldisserotto, B. & Gomes, L.C. eds), pp. 101–115. Editora UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

Ranzani-Paiva, M. J. T.; de Pádua, S. B.; Tavares-Dias, M.; Egami, A. I. Métodos para análise hematológica em peixes. Maringá: Eduem, 2013. 120 p.

Ribeiro, R.P. Espécies Exóticas. In: Fundamentos da Moderna Aquicultura. Moreira, H.L.M.; Vargas, L.; Ribeiro, R.P.; Zimmermann, S. (Eds.). Canoas: Ed. da ULBRA. 2001. p. 91-100.

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

Roberts, R.J. Fish Pathology. In: Roberts, R.J. The Bacteriology of Teleosts. 4. ed. Edinburgh: W. B. Saunders, 2012. p. 339-382

Roques, J. A. C.; Abbink, W.; Geurds, F.; Vis, J. W. van de.; Flik, G. Tailfin clipping, a painful procedure: studies on Nile tilapia and common carp. *Physiology and Behaviour*, v.101, p.533-540, 2010.

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

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.

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.

Shiau, S.Y. 2002. Tilapia, *Oreochromis* spp. In WEBSTER, C.D.; LIM, C. Nutrient Requirements and Feeding of Finfish for Aquaculture. Cap. 20, p. 273-292.

Singh, V.; Chaudhary, D. K.; Mani, I.; Jain, R.; Mishra, B. N. Development of diagnostic and vaccine markers through cloning, expression, and regulation of putative virulence-protein-encoding genes of *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Microbiology*, v. 51, p 275-282, 2013. doi: 10.1007/s12275-013-2437-x

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

Sneddon, L. U.; Braithwaite, V. A.; Gentle, M. J. Do fishes have nociceptors? Evidence for the evolution of a vertebrate sensory system. *Proceedings of the Royal Society of London: Biological Science*, v.270, p.1115-1121, 2003.

Spagnoli, S.; Xue, L.; Kent, M. L. The common neural parasite *Pseudoloma neurophilia* is associated with altered startle response habituation in adult zebrafish (*Danio rerio*): Implications for the zebrafish as a model organism. *Behavioural Brain Research*, v. 291, p 351-360, 2015. doi: 10.1016/j.bbr.2015.05.046.

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

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.

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.

Torrezani, C.S. A influência do enriquecimento ambiental no comportamento agressivo da tilápia do Congo *Tilapia rendalli*. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2012. Monografia. 15p.

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

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

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

Volpato, G.L.; Barreto, R.E. 2001. Environmental blue light prevents stress in the fish Nile tilapia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* v. 34, p. 1041-1045.

Volpato, G.L.; Duarte, C.R.A.; Luchiari, A.C. 2004. Environmental color affects Nile tilapia reproduction. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* v. 37, p. 479-483.

Von Krogh, K.; Sørensen, C.; Nilsson, G. E.; Øverli, Ø. Forebrain cells proliferation, behavior, and physiology of zebrafish, *Danio rerio*, kept in enriched or barren

environments. *Physiology & Behavior*, v. 101, p. 32-39, 2010. doi:10.1016/j.physbeh.2010.04.003.

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; Weisse, C.; Schwarz, T.; Inni, C.; Klide, A. M. Anesthesia, diagnostic imaging, and surgery of fish. *Compendium: Continuing Education for Veterinarians*, v.31, n.2, E1-9 Online, 2009.

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

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

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

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

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, 1994. Cap. 12, p.127-143.

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.

Wurts, W. A.. Alkalinity and hardness in production ponds. *World Aquaculture*, v. 33, p. 16-17.

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, 2006. Cap. 4, p.81-111.

Yasui, G.S.; Senhorini, J,A.; Shimoda, E.; Pereira-Santos, M.; Nakaghi, L.S.; Fujimoto, T.; Arias-Rodriguez, L.; Silva, L.A. 2015. Improvement of gamete quality and its short-term storage: an approach for biotechnology in laboratory fish. *Animal*, 9 (3):464-70.

Zago, A.C.; Franceschini, L.; Garcia, F.; Schalch, S.H.C.; Gozi, K.S.; Silva, R.J. 2014. Ectoparasites of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in cage farming in a hydroelectric reservoir in Brazil. Brazilian Journal of Veterinary Parasitology, Jaboticabal, v. 23, p. 171-178.

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.