

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

Perfil hematológico de juvenis de *Aequidens pallidus* Heckel, 1840 (Cichlidae) submetidos a diferentes níveis de intensidade luminosa

Bolsista: Carolina Gomes Sarmiento, CNPq

MANAUS

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO PARCIAL

PIB-B/0020/2013

Perfil hematológico de juvenis de *Aequidens pallidus* Heckel, 1840 (Cichlidae) submetidos a diferentes níveis de intensidade luminosa

Bolsista: Carolina Gomes Sarmiento, CNPq

Orientadora: Prof^a Dr^a Thaís Billalba Carvalho

MANAUS

2014

Sumário

1. Resumo.....	4
2. Introdução.....	5
3. Objetivos.....	6
4. Material e Métodos.....	7
4.1 Aclimação e Manutenção dos Animais.....	7
4.2 Delineamento experimental.....	7
4.3 Nota Ética	10
5. Resultados.....	10
6. Discussão.....	12
7. Agradecimentos.....	15
8. Referências.....	15

1. Resumo

Alterações ambientais de curta ou longa duração causam modificações comportamentais e fisiológicas com as quais os animais têm de conviver. A luminosidade, por exemplo, é uma condição ambiental essencial para a sobrevivência dos peixes, pois regula muitas atividades e padrões fisiológicos desses animais. Assim, o objetivo deste trabalho foi testar o efeito da intensidade luminosa sobre o perfil hematológico no ciclídeo ornamental amazônico, *Aequidens pallidus*. Para isso, os espécimes foram mantidos sob condição de isolamento por oito dias e submetidos a dois níveis de intensidade luminosa- menor: 271 ± 100 lx e maior: 1.628 ± 113 lx (n=7 / cada). Antes e após o período de isolamento, os animais foram anestesiados por imersão em eugenol (64 μ L/L) para a realização das medidas biométricas e coleta de sangue. Foi analisado o perfil hematológico por meio do hematócrito, concentração de hemoglobina, número de eritrócitos (RBC) e índices hematimétricos (VCM, HCM e CHCM). Os valores médios para hematócrito, hemoglobina, RBC, VCM, HCM e CHCM foram semelhantes aos encontrados para outros ciclídeos. Além disso, não houve diferença significativa nos parâmetros hematológicos entre a maior e menor intensidades luminosas, o que indica que a condição ambiental não atuou como um agente estressor. Foi encontrada uma diminuição nos valores de hematócrito e HCM entre o primeiro e o oitavo dia para ambos os tratamentos experimentais. Este resultado pode ser atribuído ao isolamento social que, em peixes territoriais, atua como um estressor. Assim, conclui-se que a maior intensidade luminosa não atingiu o nível crítico para espécie, podendo ser utilizada na aquariofilia, pois não afeta os parâmetros hematológicos dos animais.

Palavras-chave: luminosidade, hematologia, peixes.

2. Introdução

A avaliação de índices hematológicos permite o monitoramento das respostas dos organismos frente a diferentes agentes estressores, tais como, deficiência nutricional, infecção por agentes patogênicos, poluição e alteração de parâmetros físicos ambientais (Conte 2004). O ambiente aquático, por exemplo, tem sofrido contínuas modificações estruturais (Barrella *et al.* 2000) que podem atuar como um estressor, afetando variáveis fisiológicas e comportamentais dos peixes, particularmente os parâmetros sanguíneos (Sloman *et al.* 2002; Sneddon *et al.* 2006, Carvalho *et al.* 2012; Obemeata *et al.* 2012). Isso é sugerido devido à relação da hematologia com o metabolismo energético, a respiração e os mecanismos de defesa (Caruso *et al.* 2005).

O aumento nas variáveis hematológicas, tais como, hematócrito, concentração de hemoglobina e número de eritrócitos indica maior capacidade de transporte de oxigênio pelo sangue, na tentativa de suprir o aumento da demanda energética, sendo este um indicador importante do estresse (Tavares-Dias e Moraes 2004). Já a redução, sugere que a capacidade de transportar oxigênio está comprometida, podendo diagnosticar anemia e gravidade no estado de saúde do peixe (Chagas e Val 2003; Silva *et al.* 2012). Além disso, esses parâmetros estão relacionados ao bem estar dos organismos que pode ser manifestado na sua taxa de crescimento (Yaji e Auta 2007).

Atualmente, pode-se notar uma gradativa perda da qualidade ambiental aquática causada por ação humana, que se reflete também em outros grupos animais. Por exemplo, a destruição das matas ciliares pode causar redução do nível de água, aumento da produtividade primária (biomassa perifítica), da temperatura e da luminosidade (Barrella *et al.* 2000; Bojsen e Barriga 2002). Os fatores ambientais também são essenciais em práticas de aquicultura, podendo expor os animais a baixa qualidade de água, variações de luminosidade e de temperatura (Baldisserotto 2002; Livengood e Chapman 2007). As condições ambientais de estocagem e comercialização de espécies ornamentais também devem ser consideradas, pois os peixes são submetidos a uma série de situações que atuam como potenciais estressores (ex. Waichman *et al.* 2001), podendo gerar uma redução na produtividade com o aumento na ocorrência de doenças e mortalidade (Conte 2004).

A luminosidade é uma condição ambiental essencial para a sobrevivência dos peixes, pois regula muitas atividades e padrões fisiológicos desses animais (Helfman 1993; Biswas *et al.* 2002; Reynalte-Tataje *et al.* 2002; Almazán-Rueda *et al.* 2005; Rick e Bakker 2008). A luz também é o principal fator responsável pelo controle do ritmo biológico dos organismos

(Volpato e Trajano 2006; Zhdanova e Reebbs 2006), mas quando muito intensa e/ou prolongada pode ser irritante e prejudicial para os peixes, tornando-se um potencial estressor (Boeuf e Le Bail 1999; Stefánsson *et al.* 2002). De fato, Almazán-Rueda *et al.* (2005) e Cruz e Brown (2009) mostraram que diferentes fotoperíodos afetam variáveis indicadoras de estresse em *Clarias gariepinus* e *Oreochromis niloticus*. No entanto, estudos avaliando a intensidade luminosa como um agente estressor são incipientes.

Diante do exposto, a manutenção da luminosidade em condições adequadas pode reduzir o estresse dos animais em cativeiro, propiciando maior qualidade no processo de manejo animal e melhorias no sistema de criação de peixes com um maior rendimento e bem estar dos indivíduos. Estudos que relacionem fatores ambientais ao bem estar dos peixes são necessários para adequação de condições de criação e estocagem, pois esse conhecimento vem para moldar normas de boas práticas, linhas de orientação e legislação (Galhardo e Oliveira 2006).

Apesar da grande importância comercial, estudos relacionando o efeito de fatores abióticos sobre indicadores de estresse em espécies ornamentais são escassos. *Aequidens pallidus* Heckel 1840 foi escolhida, pois é uma espécie muito comum no entorno da cidade de Manaus, principalmente em igarapés (Bührnheim 2002; Claro-Jr 2002; Sousa 2002). Além disso, o gênero *Aequidens* apresenta espécies com captura permitida para fins ornamentais (Brasil 2012), sendo assim, muito apreciada na aquariofilia devido ao seu padrão de coloração que apresenta manchas e linhas características. Diante disso, o presente estudo busca colaborar com o conhecimento de respostas a alterações ambientais e determinação de condição de cultivo adequada para a espécie, tendo como objetivo avaliar o efeito da intensidade luminosa sobre o perfil hematológico no ciclídeo amazônico, *A. pallidus*.

3. Objetivos

3.1 Geral

- Testar se a intensidade luminosa atua como um agente estressor em juvenis de *Aequidens pallidus*.

3.2 Específicos

- Analisar se a maior intensidade luminosa afeta os parâmetros hematológicos (hematócrito, concentração de hemoglobina, número de eritrócitos e índices hematimétricos) em juvenis de *A. pallidus*.

- Testar o efeito da intensidade luminosa na taxa de crescimento específico em juvenis de *A. pallidus*.

4. Material e Métodos

4.1 Aclimação e Manutenção dos Animais

Os exemplares de *Aequidens pallidus* foram coletados em corpos d' água no km 25 da Estrada Manoel Urbano (AM 070), próximo ao município de Iranduba. Após isso, os espécimes foram aclimatados e mantidos no laboratório de Fisiologia (UFAM) em caixa de polietileno de 310 L (1 animal/5L). Durante esse período, a temperatura foi mantida em média ± 28 °C, a intensidade luminosa em $182 \pm 10,3$ lx e o fotoperíodo em 12L:12D (07:00 h às 19:00 h). Filtros biológicos permitiram que a qualidade da água permanecesse em níveis adequados e os animais foram alimentados com ração comercial (32% de proteína) oferecida até a saciação duas vezes ao dia (início da manhã e final da tarde).

Inicialmente foi sugerido o estudo com a espécie *Laetacara fulvipinnis*, no entanto, a coleta dos indivíduos desta espécie foi inviável. Dessa maneira, exemplares de mesma família (Cichlidae) foram coletados. Assim, foi realizada a identificação para confirmação do gênero e espécie do animal. As atividades experimentais foram realizadas com indivíduos da espécie *Aequidens pallidus* (**Figura 1**) sustentando a proposta inicial de avaliar parâmetros hematológicos diante de diferentes níveis de intensidade luminosa em um representante da família Cichlidae.



Figura 1. Espécimes de *Aequidens pallidus*.

3.2 Delineamento experimental

Foi avaliado o perfil hematológico por meio da análise do hematócrito, concentração de hemoglobina, número de eritrócitos e parâmetros hematimétricos em juvenis de *A. pallidus*. Para isso, os espécimes foram mantidos sob condição de isolamento por oito dias e

submetidos a dois níveis de intensidade luminosa: menor: 271 ± 100 lx e maior: 1.628 ± 113 lx (n=7 / cada).

A média da intensidade luminosa em cada condição experimental foi obtida a partir de 15 pontos amostrados no aquário. A maior intensidade de luz foi emitida por duas lâmpadas fluorescentes de 15 W fixadas a 7,5 cm da superfície da água do aquário (**Figura 2A**). Enquanto a menor intensidade a partir da iluminação convencional do laboratório (**Figura 2B**). A intensidade luminosa foi mensurada com o auxílio de um luxímetro digital portátil para averiguação da constância de luz emitida pelas lâmpadas.

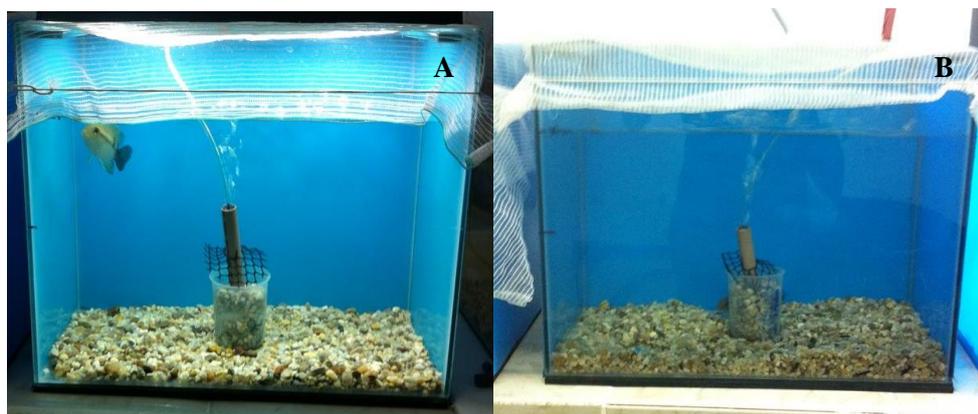


Figura 2. Tratamento de maior (A) e de menor (B) intensidade luminosa.

Os aquários (50 X 40 X 30 cm ~ 60L) foram revestidos externamente por plástico azul opaco em três laterais para evitar contato visual com animais de aquários vizinhos no laboratório. A cor azul será utilizada porque reduz o estresse em outra espécie de ciclídeo, *Oreochromis niloticus* (Volpato e Barreto 2001).

A qualidade da água foi mantida por meio de filtro biológico, aeração constante e controle de pH, amônia e nitrito. A temperatura da água foi controlada para 27 °C e a alimentação dos animais consistiu de ração para peixes tropicais na proporção de 2% da biomassa oferecida duas vezes ao dia.

Antes e após o período de isolamento, os animais foram anestesiados por imersão em eugenol (64 μ L/L) para a realização das medidas biométricas e coleta de sangue. A coleta de sangue foi precedida por 12 horas de jejum, sendo as amostras destinadas à análise de parâmetros hematológicos por serem considerados indicadores de estresse (Tavares-Dias *et al.* 2000). O peixe foi considerado anestesiado quando ocorrer perda postural (**Figura 3**), falta de reação motora a estímulo e manutenção da ventilação, critérios compatíveis com o estágio II de anestesia, como descrito por Iwama *et al.* (1989) para a truta arco-íris. O sangue foi coletado por punção do vaso caudal (0,1 ml por coleta), com a utilização de seringas

descartáveis de 1 ml contendo anticoagulante (EDTA). O tempo de anestesia e coleta de sangue, assim como o tempo de recuperação do animal foram registrados, a fim de detectar possíveis influências dessas manipulações nas variáveis fisiológicas analisadas.



Figura 3. Animal considerado anestesiado, devido à perda de postural, falta de reação motora a estímulo e manutenção da ventilação (estágio II de anestesia).

As análises hematológicas foram realizadas imediatamente após a coleta de sangue. A contagem de eritrócitos (RBC, milhões/mm³ sangue) foi feita por meio de leitura óptica em câmara de Neubauer, em amostras de sangue fixadas em formol-citrato, conforme o método habitual utilizado para peixes. A concentração de hemoglobina sanguínea (Hb, g/dL) foi analisada pelo método da cianometahemoglobina (Kampen e Zijlstra 1964). E o hematócrito (Ht, %) determinado pelo método do microhematócrito (Goldenfarb *et al.* 1971), onde os tubos capilares foram centrifugados a 13000 rpm por 6 minutos. Os índices hematimétricos absolutos, ou seja, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram calculados de acordo com Wintrobe (1934).

Crescimento

O crescimento individual dos animais foi avaliado pela taxa de crescimento específico (TCE), que é a taxa instantânea de crescimento obtida de uma unidade de peso em um período de tempo definido (Wootton 1998).

$TCE = [\ln Pf - \ln Pi / \Delta t] \cdot 100$, onde: Pi= peso inicial do animal; Pf= peso final do animal; Δt = 08 dias.

Análise dos Dados

Foi analisada a existência de valores discrepantes, onde os dados foram testados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e à homogeneidade de variância pelo teste F max (Zar 1999). Os índices hematológicos (contagem de eritrócitos, concentração de hemoglobina, hematócrito e índices hematimétricos) e a TCE entre os diferentes níveis de intensidade luminosa foram comparados por teste t independente (teste paramétrico) ou por Mann-Whitney (teste não paramétrico). Além disso, foi feito um teste de correlação (coeficiente de Spearman) entre o tempo de coleta e os parâmetros hematológicos. Foi considerado $p \leq 0,05$ para significância estatística. Todas as análises foram baseadas em Zar (1999) e Siegel e Castellan (2006).

3.3 Nota Ética

Este estudo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFAM, Manaus, AM.

5. Resultados

Durante o tratamento de menor e maior intensidade luminosa a anestesia dos animais foi registrada após 248 ± 128 s de imersão em eugenol. A coleta de sangue foi realizada em 166 ± 105 s e a recuperação dos animais em 355 ± 127 s. O peso corporal e o comprimento padrão dos animais foram semelhantes entre os tratamentos (**Tabela 1**) e não houve diferença significativa entre o primeiro e oitavo dia na menor e maior intensidade luminosa (teste t dependente, d.f.= 6; $t = 2,248$; $p > 0,065$). Além disso, não houve diferença na taxa de crescimento específico entre a maior e a menor intensidade luminosa (teste t independente, $t = -0,81$; $p = 0,43$).

Tabela 1. Média (\pm desvio padrão) do peso corporal (g) e comprimento padrão (cm) nos tratamentos de menor e maior intensidade luminosa.

Parâmetros biométricos	Menor intensidade	Maior intensidade
Peso (g)	$35,8 \pm 5,4$	$44,9 \pm 12,2$
Comprimento padrão (cm)	$9,55 \pm 0,58$	$10,07 \pm 0,97$

Não houve diferença significativa nos parâmetros hematológicos entre tratamentos de maior e menor intensidade luminosa para o primeiro e oitavo dia (Teste t dependente, $t =$

2,205; $p > 0,069$; **Figura 4**). No entanto, foi observada redução no hematócrito durante o período de isolamento em ambos os tratamentos experimentais (teste t dependente, $t = 2,366$; $p < 0,0001$; **Figura 4A**). Na avaliação dos índices hematimétricos houve diferença significativa apenas na hemoglobina corpuscular média (HCM), onde foi encontrada uma diminuição nos valores do oitavo dia na menor intensidade luminosa (teste não-paramétrico Wilcoxon, $z = 2,366$; $p < 0,0001$; **Figura 5B**). Já para os valores de hemoglobina, RBC, volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) não foram observadas diferenças entre o início e fim do isolamento (teste não-paramétrico Wilcoxon, $z = 1,859$; $p < 0,062$).

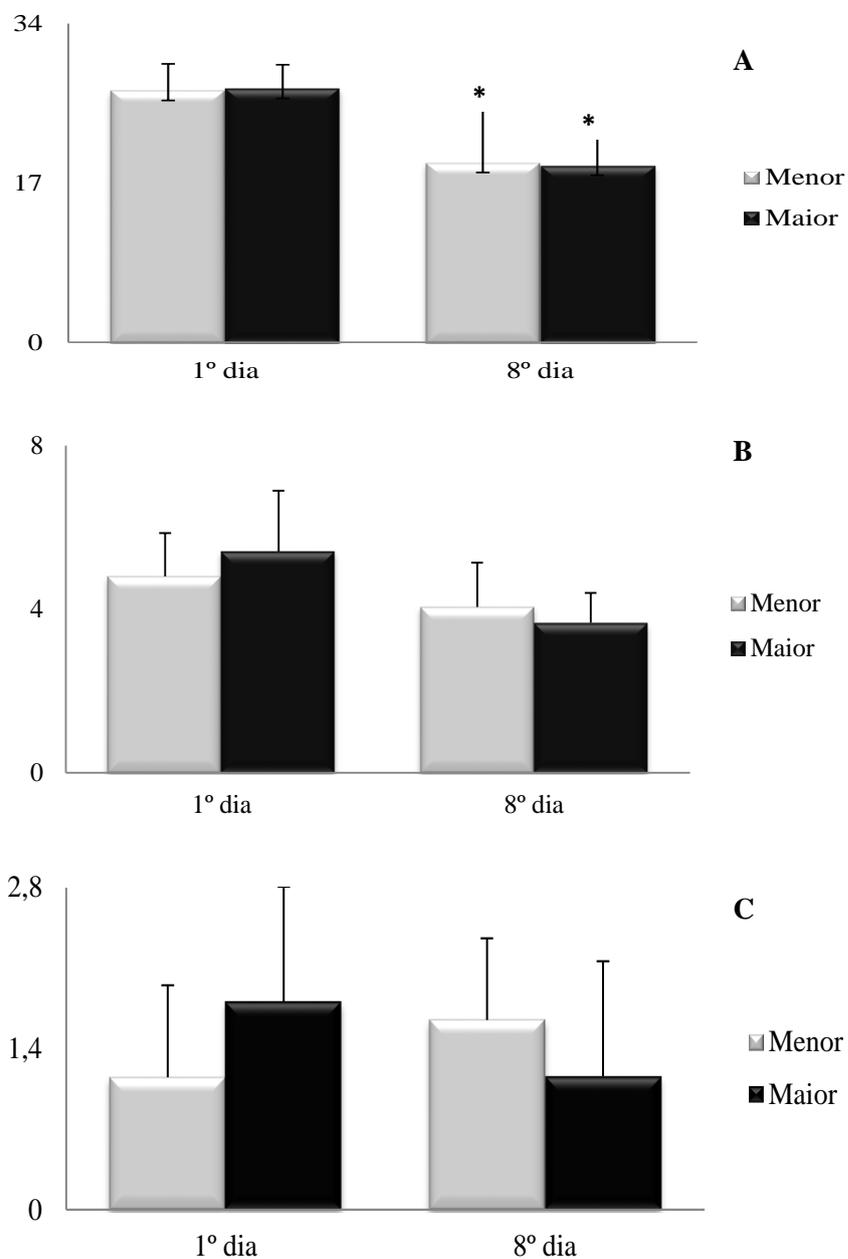


Figura 4. Média (\pm desvio padrão) de hematócrito (%; **A**), hemoglobina (g/dL; **B**) e RBC ($10^6/\mu\text{L}$; **C**) na menor e maior intensidade luminosa. Asterisco indica diferença significativa entre os períodos de observação em cada tratamento (teste t dependente, $t = 2,366$; $p < 0,0001$).

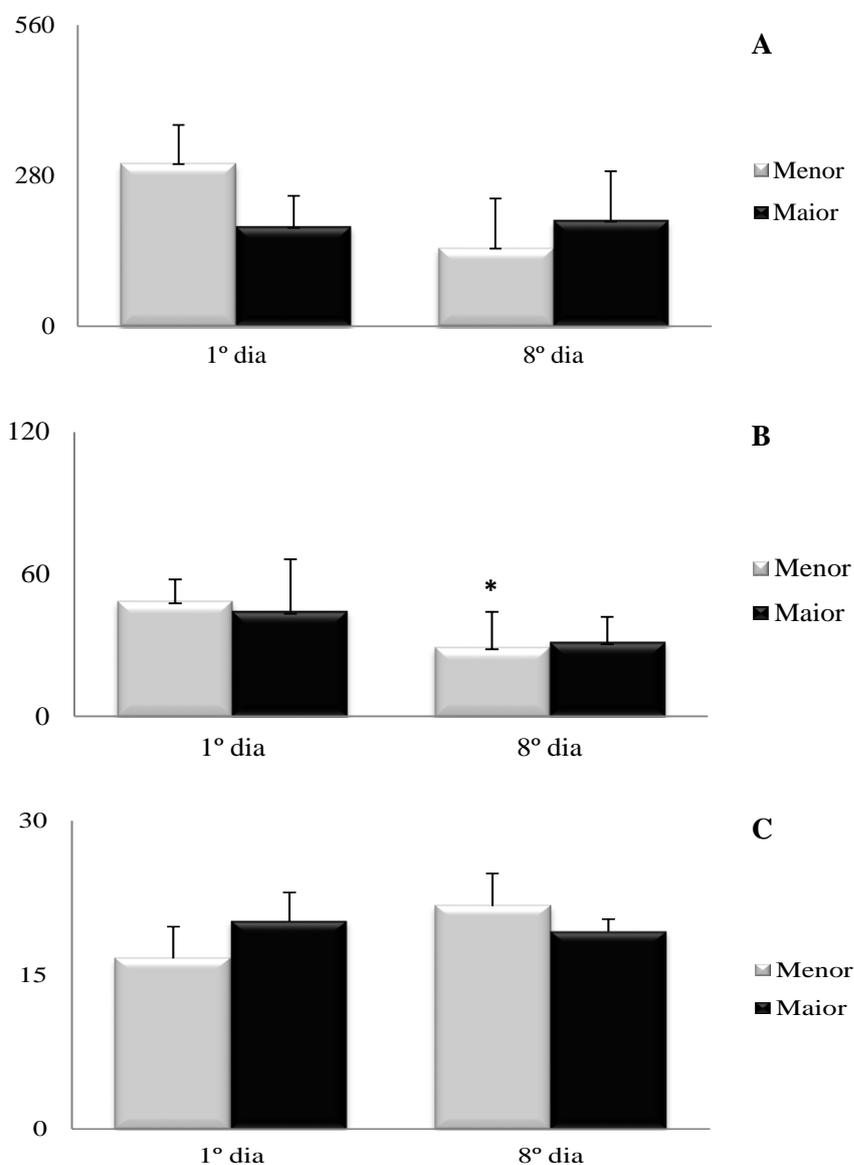


Figura 5. Média (\pm desvio padrão) dos índices hematimétricos (VCM- **A**; HCM- **B**; CHCM- **C**) avaliados na menor e maior intensidade luminosa. Asterisco indica diferença significativa entre os períodos de observação (teste não-paramétrico Wilcoxon, $z = 2,366$; $p < 0,0001$).

6. Discussão

Os valores médios para hematócrito, hemoglobina, RBC, VCM, HCM e CHCM foram semelhantes aos descritos para outros ciclídeos (**Tabela 3**), tais como, *Tilapia rendalli* (Tavares-Dias e Moraes 2003), *Astronotus ocellatus* (Lima *et al.* 2010), *Iranocichla*

hormuzensis (Daneshvar *et al.* 2012) e *Oreochromis niloticus* (Ueda *et al.* 1997). As pequenas variações observadas podem ser atribuídas a características intra ou inter específicas, e/ou à metodologia utilizada (Tavares-Dias e Moraes 2003).

Tabela 3. Média (\pm desvio padrão) de hematócrito (Htc), hemoglobina (Hb), contagem de eritrócitos (RBC), hemoglobina corpuscular média (HCM), volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) de diferentes espécies de ciclídeos.

Ciclídeos	Htc (%)	Hb (g/dL)	RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	VCM (μm^3)	HCM (μg)	CHCM (%)	Referência
<i>Aequidens pallidus</i>	26,9 \pm 2,7	5,10 \pm 1,2	1,48 \pm 1,0	253 \pm 139	44,0 \pm 20,0	19,1 \pm 4,95	Presente estudo
<i>Astronotus ocellatus</i>	-	4,7 \pm 1,9	-	129 \pm 42,5	-	19,8 \pm 8,6	Lima <i>et al.</i> (2010)
<i>Iranocichla hormuzensis</i>	26,9 \pm 5,15	6,67 \pm 1,46	0,96 \pm 0,38	307 \pm 118	79,2 \pm 31,6	26,0 \pm 0,06	Daneshvar <i>et al.</i> (2012)
<i>Oreochromis niloticus</i>	27,8 \pm 1,62	7,04 \pm 0,38	2,35 \pm 0,12	118 \pm 3,53	30,3 \pm 1,64	25,7 \pm 1,72	Ueda <i>et al.</i> (1997)
<i>Tilapia rendalli</i>	29,2 \pm 6,9	7,3 \pm 4,0	-	-	-	23,9 \pm 8,0	Tavares-Dias e Moraes (2003)

De acordo com Tavares-Dias e Moraes (2004) em situações estressoras o aumento nas variáveis hematológicas indicaria maior capacidade de transporte de oxigênio pelo sangue, na tentativa de suprir o aumento da demanda energética causada pela exposição ao estresse. No entanto, a intensidade luminosa não interferiu no perfil hematológico de *Aequidens pallidus*, pois os valores de hematócrito, hemoglobina, RBC, VCM, HCM e CHCM foram semelhantes entre os tratamentos. Uma possível explicação é que a maior intensidade luminosa (1.628 ± 113 lx) e o tempo de exposição à mesma não atingiu o nível crítico para a espécie e, portanto, equivale ao intervalo ótimo de luminosidade para *Aequidens pallidus*.

Os resultados obtidos também podem evidenciar que a avaliação apenas da hematologia pode não ser satisfatória para ponderar o estresse causado pela intensidade luminosa em *A. pallidus* (ex. Wendelaar-Bonga 1997). Assim, sugere-se que as variáveis bioquímicas são igualmente vitais nas estratégias de adaptação ambiental em peixes (Moraes 2002) e, portanto, podem ser utilizadas como indicativos de estresse em estudos futuros. De fato, a exposição ao estresse promove um aumento nos níveis circulantes de catecolaminas e cortisol, dando origem a um conjunto de alterações no organismo (Barcellos *et al.* 2000).

O cortisol é um hormônio glicocorticóide, conhecido como “hormônio do estresse” que atua junto com as catecolaminas em alterações fisiológicas do animal, desempenhando papel fundamental na adaptação metabólica do peixe requerendo grande demanda energética em situações crônicas de estresse como, por exemplo, a exposição prolongada à alta intensidade de luminosidade (Barcellos *et al.* 2000). Desse modo, uma proposta de iniciação científica pretende avaliar os parâmetros bioquímicos como indicador de bem estar em animais, o que gera resultados mais precisos sobre o estado de saúde e bem estar de peixes submetidos a diferentes condições ambientais (ex. isolamento social e intensidade luminosa).

Em ambas as intensidades luminosas foram observadas redução do hematócrito entre o primeiro e oitavo dia de isolamento. Também foi observada diminuição do HCM na menor luminosidade. Esta diminuição nos parâmetros sanguíneos tem sido observada em várias espécies submetidas a fatores estressantes, indicando que a capacidade de transporte de oxigênio está comprometida, o que afeta o estado de saúde do animal e pode ser usado como indicativo de anemia (Chagas e Val 2003; Silva *et al.* 2012; Silveira *et al.* 2009).

Tendo em vista que a intensidade luminosa não atuou como agente estressor, o resultado observado provavelmente é uma resposta fisiológica ao estresse causada pelo isolamento social a que os animais foram submetidos durante o experimento. Segundo Baerends e Baerends Van-Roon (1950) a família Cichlidae apresenta espécies territoriais com organização social baseada na hierarquia de dominância. Estas espécies apresentam um repertório diversificado de comportamentos agonístico quando agrupados, onde é definida por confronto uma hierarquia de dominância e submissão (Merighe *et al.* 2004).

O isolamento social para animais territoriais atua como um agente estressor e aumenta o nível de agressão. O aumento da agressividade representa uma vantagem frente aos oponentes, podendo alargar a chance de vencer confrontos contra intrusos (Gómez-Laplaza e Morgan 2000). De fato, Gonçalves-de-Freitas e Mariguela (2006) mostraram um aumento na agressividade em *Astronotus ocellatus*, submetidos ao isolamento. Além disso, Barbosa *et al.* (2009) verificaram que esta condição provoca um maior consumo de oxigênio em tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*.

Diante do exposto, os resultados evidenciam que a intensidade luminosa não atua como um estressor, no entanto, o isolamento social afeta o perfil hematológico em *Aequidens pallidus*. Desse modo, os resultados obtidos contribuem para a avaliação de técnicas de aquarofilia, onde a manipulação da luminosidade é muito utilizada para realçar a coloração de peixes e manter plantas cultivadas em aquários (França 2007). Além disso, o presente estudo contribui para o estabelecimento de valores de referência da hematologia em *A.*

pallidus e poderão ser utilizados como base para comparação com dados desta espécie submetida a outras condições ambientais.

7. Agradecimentos

Às técnicas de laboratório Rejane e Ana Maria pela ajuda e paciência oferecida. Ao Sr. Edson (proprietário do Balneário Ecológico Três Irmãos) e seus funcionários pela autorização e coleta de peixes em sua propriedade.

8. Referências

- Almazán-Rueda, P.; Van-Helmond, A.T.M.; Verreth, J.A.J.; Schrama, J.W. 2005. Photoperiod affects growth, behaviour and stress variables in *Clarias gariepinus*. *Journal of Fish Biology*, 67: 1029-1039.
- Baerends, G.P.; Baerends-Van Roon, J. 1950. An introduction to the study of the ethology of cichlid fishes. *Behaviour Supplement*, 1: 1-242.
- Baldisserotto, B. 2002. *Fisiologia de Peixes Aplicada à Piscicultura*. Editora UFSM, Santa Maria, 211p.
- Barbosa, A.C.; Ferreira, P.M.F.; Souza, R.N.; Barbosa, J.M. 2009. Avaliação da taxa metabólica do tambaqui (*Colossomacropomum*) e da tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). *Rev. Bras. Eng. Pesca*, 4(2): 46-55.
- Barcellos, L.J.G.; Souza, S.M.G.; Woehl, V.M. 2000. Estresse em peixes: fisiologia da resposta ao estresse, causas e consequências (Revisão). *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 26(1): 99-111.
- Barrella, W.; Petrere, M.Jr.; Smith, W.S.; Montag, L.F.A. 2000. As relações entre as matas ciliares, os rios e os peixes. In: Rodrigues, R.R.; Filho, H.F.L. (Ed.). *Matas Ciliares: conservação e recuperação*. EDUSP e FAPESP, São Paulo. 320 p.
- Biswas, A.K.; Takeuchi, T. 2002. Effect of different photoperiod cycles on metabolic rate and energy loss of both fed and unfed adult tilapia *Oreochromis niloticus*: Part II. *Fish Science*, 68: 543-553.
- Boeuf, G.; Le Bail, P.Y. 1999. Does light have an influence on fish growth? *Aquaculture*, 177: 129-152.
- Bojsen, B.H.; Barriga, R. 2002. Effects of deforestation on fish community structure in Ecuadorian Amazon streams. *Freshwater Biology*, 47: 2246-2260.
- Brasil. 2012. Instrução Normativa Interministerial N° 001, de 3 de janeiro de 2012. Estabelece normas, critérios e padrões para a exploração de peixes nativos ou exóticos de águas continentais com finalidade ornamental ou de aquarofilia, (http://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Instrucao_normativa/2012/in_instrucao_mpa_mma_01_2012_exploracaopeixesnativosexoticosaguascontinentais.pdf). Acesso em 03/04/2014.
- Bührnheim, C.M. 2002. Heterogeneidade de habitats: rasos x fundos em assembleias de peixes de igarapés de terra firme na Amazônia Central, Brasil. *Revta bras. Zool*, 19(3): 889 – 905.
- Caruso, G.; Genovese, L.; Maricchiolo, G.; Modica, A. 2005. Haematological, biochemical and immunological parameters as stress indicators in *Dicentrarchus labrax* and *Sparus aurata* farmed in off-shore cages. *Aquaculture International*, 13: 67-73.

- Carvalho, T.B.; HA, J.C.; Gonçalves-de-Freitas, E. 2012. Light intensity can trigger different agonistic responses in juveniles of three cichlid species, *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 1-10.
- Chagas, E.C.; Val, A.L. 2003. Efeito da vitamina C no ganho de peso e em parâmetros hematológicos de tambaqui. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, 38(3): 397-402.
- Claro-Jr, L.H. 2002. Influência de parâmetros físicos na riqueza de peixes em igarapés de terra firme na Amazônia Central. In: Zuanon, J.; Venticinque, E. *Curso de Campo Ecologia da Floresta Amazônica*. Instituto Nacional de Pesquisa, p. 138-141.
- Conte, F.S. 2004. Stress and the welfare of cultured fish. *Applied Animal Behavior Science*, 86: 205-223.
- Cruz, E.M.V.; Brown, C.L. 2009. Influence of the photoperiod on growth rate and insulin-like growth factor-I gene expression in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Journal of Fish Biology*, 75: 130-141.
- Daneshvar, E.; Ardestani, M.Y.; Dorafshan, S.; Martins, M.L. 2012. Hematological parameters of Iranian cichlid *Iranocichlahormuzensis* – Coad, 1982 (Perciformes) in Mehran River. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 84(4): 943-949.
- França, K.C. 2007. Dossiê Técnico: Criação de peixes ornamentais. Instituto de Tecnologia do Paraná-TECPAR.
- Galhardo, L.; Oliveira, R. 2006. Bem estar animal: um conceito legítimo para peixes? *Revista de Etologia*, São Paulo 8: 51-61.
- Goldenfarb, P.B.; Bowyer, F.P.; Hall, E.; Brosious, E. 1971. Reproducibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. *American Journal of Clinical Pathology*, 35-39.
- Gómez-Laplaza, L. M.; Morgan, E., 2000, Laboratory studies of the effects of short-term isolation on aggressive behaviour in fish. *Mar. Fresh. Behav. Physiol*, 33: 63-102.
- Gonçalves-de-Freitas, E.; Mariguela, T.C. 2006. Social isolation and aggressiveness in the Amazonian juvenile fish *Astronotus ocellatus*. *Braz. J. Biol.*, 66(1b): 233-238.
- Helfman, G.S. 1993. Fish Behaviour by Day, Night and Twilight. In: Pitcher, T.J. *Behaviour of Teleost Fishes*. Chapman e Hall, London, 715 p.
- Iwama, G.K.; McGeer, J.C.; Pawluk, M.P. 1989. The effects of five fish anaesthetics on acid-base balance, hematocrit, blood gases, cortisol, and adrenaline in rainbow trout. *Canadian Journal of Zoology*, 67: 2065-2073.
- Kampen, E.J.; Zilstra, W.G. 1964. Standardization of haemoglobinometry In: Boroviczény, G. *Erythrocytometric methods and their standardization*. New York: Bibl. Haematol, p.68-72.
- Lima, F.S.; Castilhos, Z.C.; Rodrigues, A.P.C.; Almosny, N. 2010. Alterações hematológicas em Apaiaris (*Astronotus ocellatus*) expostos artificialmente a metilmercúrio. *XVII Jornada de Iniciação Científica*, 304-310.
- Livengood, E.J.; Chapman, F.A. 2007. The Ornamental Fish Trade: An Introduction with Perspectives for Responsible Aquarium Fish Ownership. IFAS, *Extension- University of Florida*.
- Merighe, G.K.F.; Pereira-da-Silva, E.M.; Negrao, J.A.; Ribeiro, S. Efeito da cor do ambiente sobre o estresse social em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). 2004. *R. Bras. Zootec.* [online], 33(4): 828-837.
- Obemeata, O.; Aduabobo, H.; Wokoma, E. 2012. Acute haematological response of a cichlid fish *Sarotherodon melanotheron* exposed to crude oil. *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences*, 4: 151-155.
- Reynalte-Tataje, D.; Luz, R.K.; Meurer, S.; Zaniboni-Filho, E.; Nuñez, A.P.O. 2002. Influência do fotoperíodo no crescimento e sobrevivência de pós-larvas de piracanjuba *Bryconorbignyanus* (Valenciennes, 1849) (Osteichthyes, Characidae). *Acta Scientiarum*, 24: 439-443.

- Rick, I.P.; Bakker, T.C.M. 2008. UV wavelengths make female three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*) more attractive for males. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 62: 439-445.
- Siegel, S.; Castellan Jr., N. 2006. *Estatística Não-Paramétrica para Ciências do Comportamento*. Artmed, Porto Alegre, 448 p.
- Silva, A.S.E.; Lima, J.T.A.X; Blanco, B.S. 2012. Hematologia em peixes. *Revista Centauro*, 3(1): 24-32.
- Silveira, U.S.; Logato, P.V.R.; Pontes, E.C. 2009. Fatores estressantes em peixes. *Revista Eletrônica Nutritime*, 6(4): 1001-1017.
- Sloman, K.A.; Wilson, L.; Freel, J.A.; Taylor, A.C.; Metcalfe, N.B.; Gilmour, K.M. 2002. The effects of increased flow rates on linear dominance hierarchies and physiological function in brown trout, *Salmo trutta*. *Canadian Journal of Zoology*, 80: 1221-1227.
- Sneddon, L.U.; Hawkesworth, S.; Braithwaite, V.A.; Yerbury, J. 2006. Impact of environmental disturbance on the stability and benefits of individual status within dominance hierarchies. *Ethology*, 112: 437-447.
- Sousa, L.M. 2002. Abundância e riqueza da ictiofauna em trechos de um igarapé na Reserva do km 41, Manaus, AM. In: Zuanon, J.; Venticinque, E. *Curso de Campo Ecologia da Floresta Amazônica*. Instituto Nacional de Pesquisa, p. 94-96.
- Stefánsson, M.O.; Fitzgerald, R.D.; Cross, T.F. 2002. Growth, feed utilization and growth heterogeneity in juvenile turbot *Scophthalmus maximus* (Rafinesque) under different photoperiod regimes. *Aquaculture Research*, 33: 177-187.
- Tavares-Dias, M.; Schalch, S.H.C.; Silva, E.D.; Martins, M.L.; Moraes, F.R. 2000. Características hematológicas de *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) cultivada intensivamente em "Pesque-Pague" do município de Franca, São Paulo, Brasil. *Ars Veterinaria*, Jaboticabal, 16: 76-82.
- Tavares-dias, M.; Moraes, F.R. 2003. Características hematológicas da *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: cichlidae) capturada em "pesque-pague" de Franca, São Paulo, Brasil. *Biosci. J.*, Uberlândia, 19(1): 107-114.
- Tavares-Dias, M.; Moraes, F.R. 2004. *Hematologia de peixes teleósteos*. Villimpres, Ribeirão Preto.
- Ueda, I.K.; Egami, M.I.; Sasso, W.S.; Matushima, E.R. 1997. Estudos hematológicos em *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) (Cichlidae, Teleostei) - Parte I. *Braz. J. vet. Res. anim. Sei.*, São Paulo, 34(5): 270-275..
- Volpato, G.L.; Barreto, R.E. 2001. Environmental blue light prevents stress in Nile tilapia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 34: 1041-1045.
- Volpato, G.L.; Trajano, E. 2006. Biological Rhythms. In: Val, L.A.; Val, V.M.F.A.; Randall, D.J. (Org.); *Fish Physiology*. Elsevier e Academic Press, San Diego, p.101-153.
- Waichman, A.V.; Pinheiro, M.; Marcon, J. L. 2001. Water quality monitoring during the transport of Amazonian ornamental fish. In: Chao, N.L.; Petry, P.; Prang, G.; Sonneschien, L.; Tlusty, N. (Org.). *Conservation and management of ornamental fish resources of the Rio Negro Basin*, Amazônia, Brazil- Project Piaba. EDUA, Manaus. p.279.
- Wendelaar-Bonga, S.E. 1997. The Stress Response in Fish. *Physiological Reviews*, 77 (3): 593-625.
- Wintrobe, M.M. 1934. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Haematologica*, 51: 32-49.
- Wootton, R.J. 1998. *Ecology of Teleost Fishes*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2da ed. 386 p.
- Yaji A.J.; Auta, J. 2007. Sub-lethal effects of monocrotophos on some haematological indices of African catfish *Clarias gariepinus* (Teugels). *Journal of Fisheries International*, 2: 115-117.
- Zar, J. 1999. *Biostatistical Analyses*. Printice Hall, New Jersey.

Zhdanova, I.V.; Reeb, S.G. 2006. Circadian Rhythms in Fish. In: Sloman, K.A.; Wilson, R.W.; Balshine, S. (Org.); *Behaviour and Physiology of Fish*. Academic Press, San Diego, p.197-228.