

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS DO PONTAL  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Respostas nociceptivas comportamental e hormonal da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Rafael Galisa de Oliveira

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas da  
Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção  
do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Ituiutaba - MG

Junho – 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS DO PONTAL  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Respostas nociceptivas comportamental e hormonal da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Rafael Galisa de Oliveira

Orientadora: Carla Patrícia Bejo Wolkers

Co-orientadora: Mônica Serra

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas da  
Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção  
do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Ituiutaba - MG

Junho – 2018

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	5
2. Materiais e métodos .....	6
2.1. <i>Condições experimentais</i> .....	6
2.2. <i>Teste nociceptivo e filmagem comportamental</i> .....	7
2.3. <i>Análise hormonal</i> .....	7
2.4. <i>Análises comportamentais</i> .....	8
2.5. <i>Análises da coloração da pele e dos olhos</i> .....	8
2.6. <i>Análise estatística</i> .....	10
2.7. <i>Nota ética</i> .....	11
3. Resultados .....	11
4. Discussão .....	18
5. Conclusão.....	22
Referências .....	23
ANEXO I – Normas da revista Fish Physiology and Biochemistry .....	26

## **Resumo**

O grau de mobilização do organismo em resposta a um estímulo nocivo varia de acordo com a evolução do sistema nervoso presente no mesmo e tudo indica que as respostas apresentadas são espécie-específicas e variam de acordo com tipo de estímulo aplicado. Na busca de averiguar se as respostas ao teste da formalina são espécie-específicas e ampliar o conhecimento acerca da nocicepção dentro do filo dos vertebrados, o presente estudo avaliou as respostas nociceptivas comportamental e hormonal de indivíduos da espécie *Oreochromis niloticus* tratados com injeção subcutânea de salina ou formalina 3% na região posterior da nadadeira dorsal. Aqueles que receberam a injeção de formalina ficaram mais tempo com a nadadeira dorsal de raio mole (NDM) abaixada e sem movimentação em relação aos animais tratados com salina. Houve correlação entre essas duas variáveis e foi identificado um padrão de escurecimento daqueles que morreram em decorrência do estímulo nocivo. A velocidade e distância percorrida, o tempo de permanência na parte inferior do aquário, o cortisol plasmático, o escurecimento do corpo e dos olhos e o tempo em que a nadadeira dorsal de raio duro (NDD) ficou eriçada, não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos. O teste da formalina ativou o sistema nociceptivo no *O. niloticus* e confirmou a hipótese de que as respostas apresentadas a esse teste são espécie-específicas. Além disso, a redução do uso do membro afetado (NDM), comportamento similar ao de mamíferos submetidos ao mesmo teste, indica que a sensação dolorosa pode estar presente nestes animais.

**Palavras-chave:** Dor. Nocicepção. Teste da formalina.

## **1. Introdução**

A nocicepção compreende o processo de detecção de estímulos produtores de dor por neurônios sensoriais primários também conhecidos como nociceptores (Julius e Basbaum 2001). Estes estímulos potencialmente lesivos aos tecidos são conduzidos ao Sistema Nervoso Central a partir da medula espinhal e processados em regiões sub-corticais, como o tronco encefálico e outras regiões que provocam respostas defensivas e recuperativas adequadas (para revisão ver Basbaum et al. 2009). As respostas defensivas podem ser observadas em uma ampla gama de grupos de animais, sendo que até mesmo os invertebrados apresentam reações a um estímulo nocivo, e o grau de mobilização do organismo em resposta a estes estímulos varia de acordo com a evolução do sistema nervoso (para revisão ver Smith e Lewin 2009).

Alguns estudos demonstram que peixes possuem terminações nervosas livres que se assemelham aos nociceptores presentes nos mamíferos (Dunlop e Laming 2005; Roques et al. 2010; Sneddon 2002, 2003b; Sneddon et al. 2003), vias de condução da informação para o encéfalo (Chandoo et al. 2004; Dunlop e Laming 2005) e respostas comportamentais e fisiológicas quando recebem estímulos potencialmente nocivos (Sneddon 2003a; Roques et al. 2012; Reilly et al. 2008; Roques et al. 2010; Alves et al. 2013; Wolkers et al. 2013). Pelo menos um componente da via espinhal ascendente em peixes elasmobrânquios e teleósteos é comparável ao trato espino-talâmico dos mamíferos, mas nestes, ocorre somente a informação nociceptiva e nos peixes ocorre a veiculação da informação da sensibilidade somática de diferentes modalidades, incluindo a nocicepção (Hoffmann 2008). Estas evidências indicam que o processamento das informações nociceptivas, bem como as respostas desencadeadas por elas em peixes, possa guardar similaridades com o sistema nociceptivo mamífero.

O conhecimento acerca da nocicepção em vertebrados basais como peixes ainda são incipientes e os testes utilizados para a avaliação da nocicepção são, em sua maioria, baseados

naqueles utilizados em mamíferos, em que geralmente, são utilizados estímulos nocivos mecânicos, como o uso de clips na cauda (Roques et al. 2010) e químicos, como a injeção subcutânea de ácido acético nos lábios (Sneddon 2003a; Sneddon et al 2003) e formalina na nadadeira (Alves et al. 2013; Ide e Hoffmann 2002; Wolkers et al. 2013, 2015a, b), sendo este especialmente interessante por ser uma metodologia bastante similar àquela aplicada em mamíferos (Dubuisson e Dennis 1977). O teste da formalina foi adaptado por Ide e Hoffmann (2002) para o estudo da nocicepção em peixes e aplicado em outros estudos por Alves et al. (2013) e Wolkers et al. (2013, 2015a, b), no entanto, a resposta nociceptiva comportamental, utilizando a injeção de formalina, foi estudada apenas na espécie *Leporinus macrocephalus*, sendo essencial a verificação da aplicabilidade do teste em outras espécies, visando averiguar se estas respostas comportamentais são espécie-específicas e ampliar o conhecimento acerca da nocicepção dentro do filo dos vertebrados. À vista disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta nociceptiva comportamental e hormonal em peixes da espécie *Oreochromis niloticus* por meio da injeção subcutânea de formalina 3% na região posterior da nadadeira dorsal.

## **2. Materiais e métodos**

### *2.1. Condições experimentais*

O estudo foi realizado no Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (FCAV/UNESP). Foram utilizados 20 juvenis de tilápia-do-Nilo de ambos os sexos, cedidos pelo Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE) da Universidade Estadual Paulista. Os animais foram mantidos em caixas de 1000 L, com aeração e fluxo de água constantes (6,25 mL/s) e ciclo claro/escuro de 12h/12h, mantido por meio de temporizador. Antes do experimento, os animais foram distribuídos individualmente em aquários de 40 L,

com aeração constante, preenchidos com o mesmo nível de água, e vedados nas laterais e face posterior com papel manilha e isopor, respectivamente, permanecendo apenas a tampa e face anterior sem cobertura opaca. Os peixes passaram por três dias de aclimação às condições experimentais e foram alimentados duas vezes ao dia, às 10 horas e 16 horas, exceto no dia do experimento. O experimento foi realizado no quarto dia, no período das 7 às 10 da manhã, para evitar alterações hormonais significativas desencadeadas pelo ritmo circadiano.

### *2.2. Teste nociceptivo e filmagem comportamental*

Uma câmera foi posicionada em direção a face anterior do aquário e o peixe foi filmado por 10 minutos (linha de base, LB). Imediatamente após esse período, o animal foi retirado do aquário com auxílio de uma rede de nylon e recebeu uma injeção subcutânea de 20 µl de solução salina ou formalina 3% na região posterior da nadadeira dorsal (salina, n=8; formalina, n=12). Após a aplicação, o animal foi devolvido ao aquário e filmado por 10 minutos (pós-estímulo, PE). A injeção subcutânea de formalina 3% foi utilizada como estímulo nocivo, reproduzindo o teste nociceptivo da formalina desenvolvido em ratos (Dubuisson e Dennis 1977) e adaptados para estudos nociceptivos em peixes (Alves et al. 2013; Ide e Hoffmann 2002).

### *2.3. Análise hormonal*

Após a filmagem comportamental pós-estímulo, o peixe foi retirado do aquário e anestesiado por imersão em água contendo benzocaína (100 mg/L). Em seguida, teve seu sangue coletado por meio de punção do vaso caudal. O material coletado foi armazenado em microtubos graduados contendo 10 µl de heparina e centrifugado por 10 min a 1000 rpm. Após a centrifugação, o plasma foi separado e congelado à -4° C até a realização da análise hormonal por ensaio imunológico (kit DRG® Cortisol ELISA - EIA-1887). Após a coleta do

sangue, os animais foram pesados e medidos para biometria e, em seguida, devolvidos às caixas de manutenção (peixes que receberam injeção subcutânea de salina) ou sacrificados (peixes que receberam injeção subcutânea de formalina 3%), por meio de imersão em solução de benzocaína (100 mg/L).

#### 2.4. *Análises comportamentais*

As imagens obtidas através da filmagem foram analisadas para avaliar a atividade locomotora, o posicionamento da nadadeira dorsal de raio duro (NDD) e da nadadeira dorsal de raio mole (NDM) e a movimentação da nadadeira dorsal de raio mole (NDM), antes e após a injeção subcutânea de formalina ou salina em cada peixe. Os dados são apresentados como a variação entre PE e LB ( $\Delta = PE - LB$ ).

A atividade locomotora (velocidade e distância percorrida) e o tempo em que o animal permaneceu na parte superior do aquário foram analisados por meio do *software* de monitoramento e quantificação do comportamento, o *EthoVision XT 7.1* (Noldus Information Technology, Wageningen, Netherlands), de acordo com Wolkers et al. (2013). O posicionamento da nadadeira dorsal foi analisado medindo-se o tempo em que o animal permaneceu com a NDD eriçada e a NDM abaixada (Fig. 1c). O tempo em que a NDM realizava movimentos ondulatórios também foi cronometrado. Considerou-se que a NDD estava eriçada a partir do momento que a mesma saía do repouso (Fig. 1b), e as análises em cada porção da nadadeira (NDD e NDM) foram feitas separadamente.

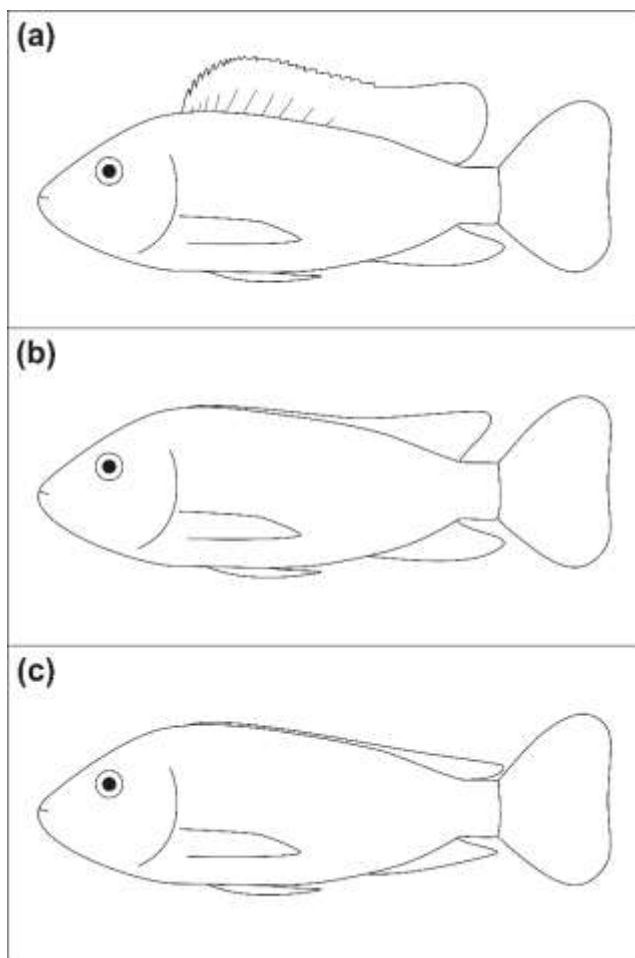
#### 2.5. *Análises da coloração da pele e dos olhos*

A avaliação do escurecimento da pele e dos olhos também foi realizada a partir das filmagens e os dados são apresentados como a variação entre PE e LB ( $\Delta = PE - LB$ ). O escurecimento da pele foi analisado por meio do *software* de processamento de imagens



projetado para imagens multidimensionais científicas, o *ImageJ* (National Institutes of Health, United States). Inicialmente foi realizada uma seleção da área corporal do animal com a ferramenta *freehand selections* e em seguida a área selecionada foi submetida à análise para obter uma medida em escala linear de preto e branco em que 0 equivale a preto e 255 a branco. O valor utilizado (*mean*) foi obtido selecionando a opção *measure* dentro do menu *analyze*. A análise do escurecimento da pele foi unilateral.

A metodologia utilizada para a análise do escurecimento dos olhos foi adaptada de Volpato et al. (2003) e Freitas et al. (2014), sendo estimada a porcentagem da área escurecida da esclera dos olhos do peixe. A estimativa foi realizada de maneira unilateral, com base nas imagens captadas através dos vídeos do experimento utilizando a função *print screen*. As imagens foram coletadas entre os minutos 2 e 8 da LB e do PE, visando evitar o efeito causado pela aproximação do experimentador para iniciar a filmagem.



**Fig. 1** Desenho esquemático da posição da nadadeira dorsal do *O. niloticus*. (a) nadadeira dorsal de raio duro totalmente eriçada, (b) nadadeira dorsal de raio duro em repouso e nadadeira dorsal de raio mole levantada e (c) nadadeira dorsal de raio mole abaixada.

## 2.6. Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de normalidade (teste Kolmogorov–Smirnov,  $P > 0,05$ ) e homogeneidade de variâncias (teste de Levene,  $P > 0,05$ ) para determinação da utilização de testes paramétricos ou não paramétricos. Os dados de distância e velocidade percorrida, tempo de permanência na parte inferior do aquário, cortisol, escurecimento do corpo e tempo de permanência com a NDM abaixada apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variâncias e foram submetidos ao teste-t ( $P < 0,05$ ). Os dados de tempo de permanência com a NDD eriçada, tempo de permanência com a NDM em movimento ondulatório e escurecimento do olho não apresentaram distribuição normal e foram submetidos ao teste de Mann-Whitney ( $P < 0,05$ ). Foi, ainda, realizada a análise de correlação

de Spearman entre o tempo de permanência com a NDM abaixada e a realização de movimento ondulatório e entre os níveis de cortisol e as variáveis comportamentais ( $P < 0,05$ ). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão ou mediana / 25% / 75% / máximo / mínimo.

### 2.7. Nota ética

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (CEUA/FCAV/UNESP).

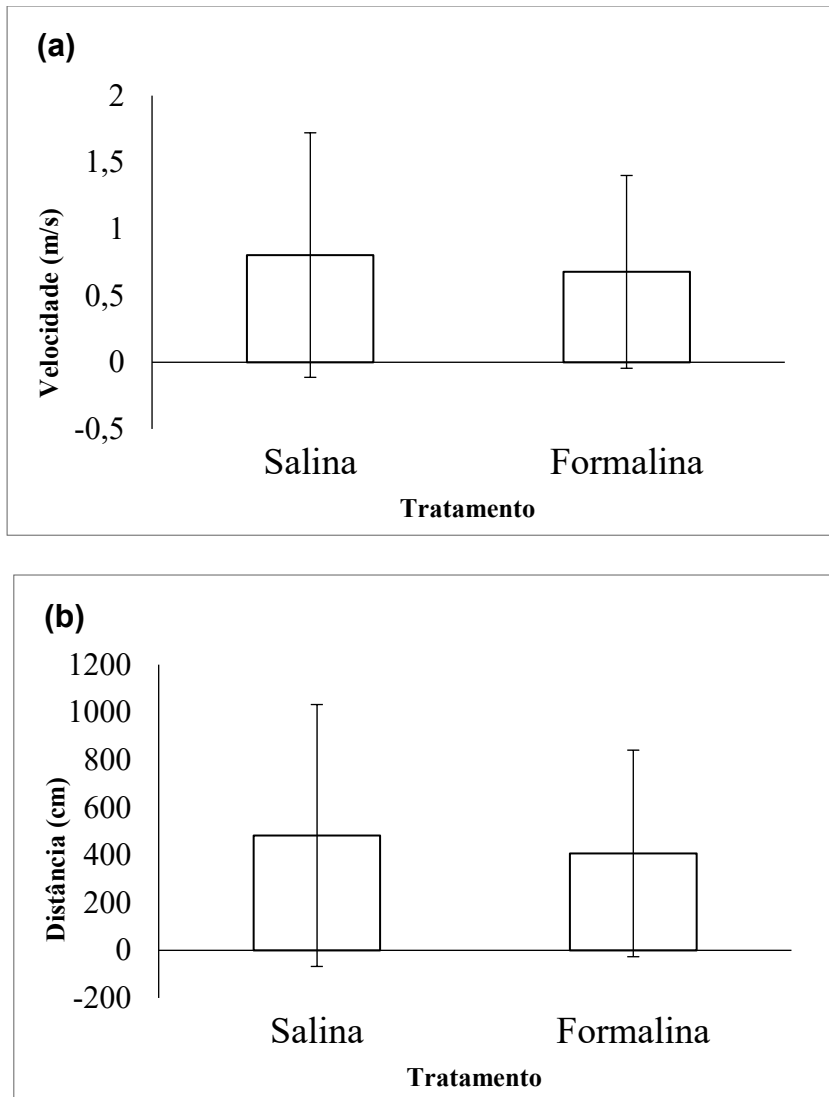
## 3. Resultados

Dos doze peixes submetidos à injeção subcutânea de formalina 3%, cinco (41%) morreram durante a filmagem de pós-estímulo, sendo seus dados excluídos das análises estatísticas. Nenhum dos peixes submetidos à injeção subcutânea de salina morreu durante o experimento.

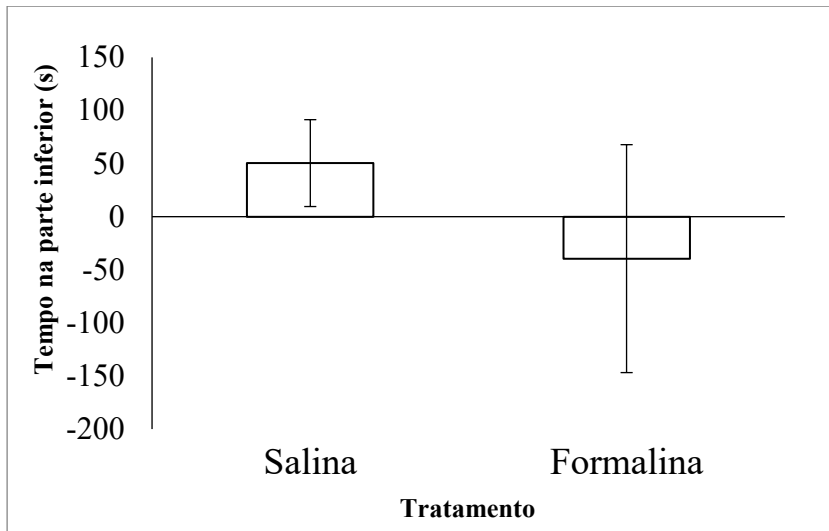
A velocidade e distância percorrida ( $t = 0,105$ ,  $GL = 13$ ;  $P = 0,918$ ; Fig. 2a, b), o tempo de permanência na parte inferior do aquário ( $t = 0,825$ ;  $GL = 13$ ;  $P = 0,424$ ; Fig. 3), o cortisol plasmático ( $t = -1,937$ ;  $GL = 13$ ,  $P = 0,075$ ; Fig. 4), o escurecimento do corpo ( $t = 0,500$ ;  $GL = 13$ ;  $P = 0,625$ ; Fig. 5) e dos olhos ( $U = 25,500$ ;  $P = 0,779$ ; Fig. 6) e o tempo em que a NDD ficou eriçada ( $U = 25,500$ ;  $P = 0,779$ ; Fig. 7), não apresentaram diferença significativa entre os animais tratados com injeção subcutânea de salina ou formalina.

Em relação a posição e movimentação da NDM, houve diferença significativa entre os tratamentos (posição,  $t = -3,025$ ;  $GL=13$ ;  $P = 0,010$ ; Fig. 8; movimentação,  $U = 49,000$ ;  $P = 0,014$ ; Fig. 9). Os animais tratados com injeção subcutânea de formalina ficaram mais tempo

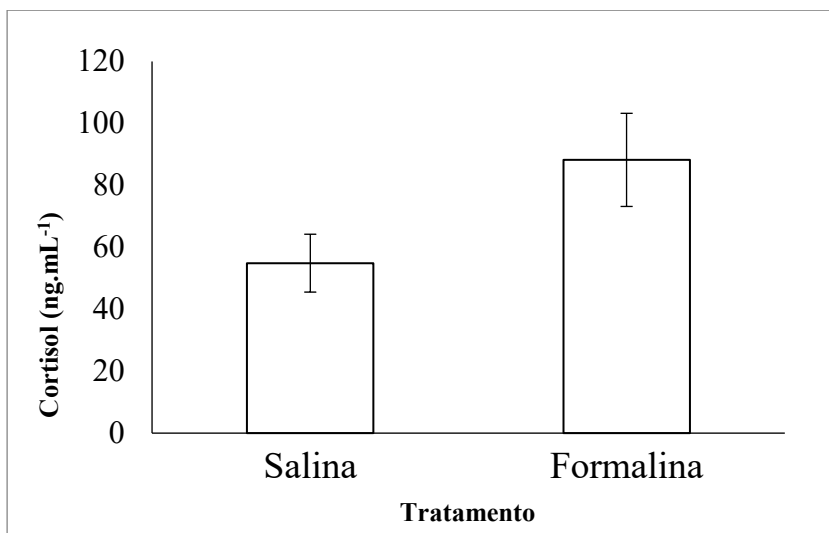
com NDM abaixada e sem movimentação em relação aos animais tratados com salina. Houve correlação negativa entre essas duas variáveis ( $\rho = -0,576$ ;  $P = 0,0241$ ).



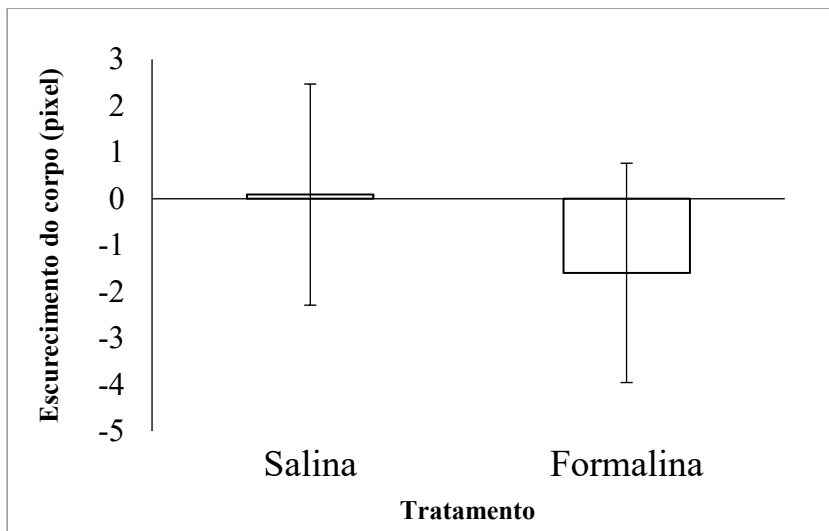
**Fig. 2** Atividade locomotora do *O. niloticus* submetida a injeção de salina (n=8) ou formalina 3% (n=7). Os dados são apresentados como a diferença ( $\Delta$ ) entre a linha de base e o pós-estímulo. (a) velocidade e (b) distância de natação apresentada entre os tratamentos.



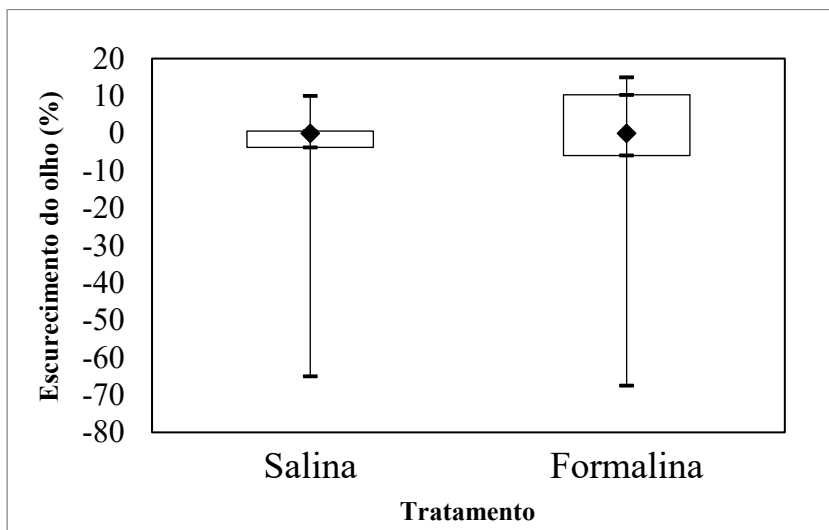
**Fig. 3** Tempo em que o *O. niloticus* submetido a injeção de salina (n=8) ou formalina 3% (n=7) permaneceu na parte inferior do aquário. Os dados são apresentados como a diferença ( $\Delta$ ) entre a linha de base e o pós-estímulo.



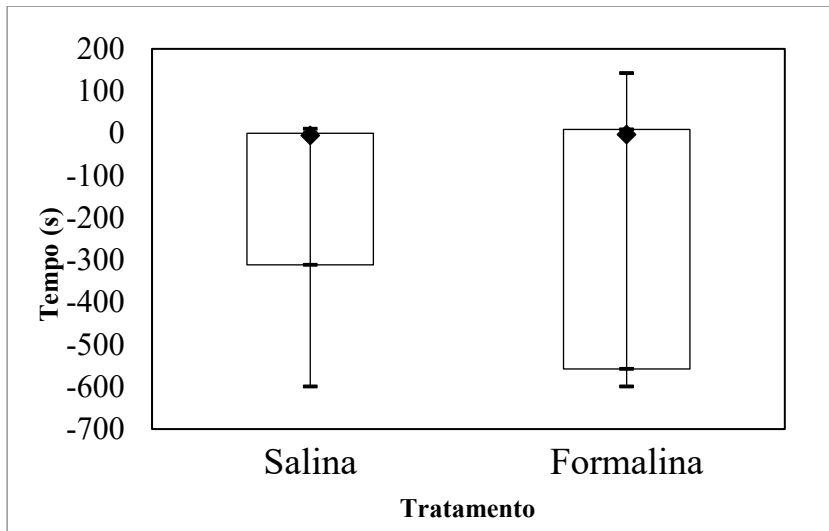
**Fig. 4** Cortisol plasmático do *O. niloticus* submetido a injeção de salina (n=8) ou formalina 3% (n=7). Os dados são apresentados como a diferença ( $\Delta$ ) entre a linha de base e o pós-estímulo.



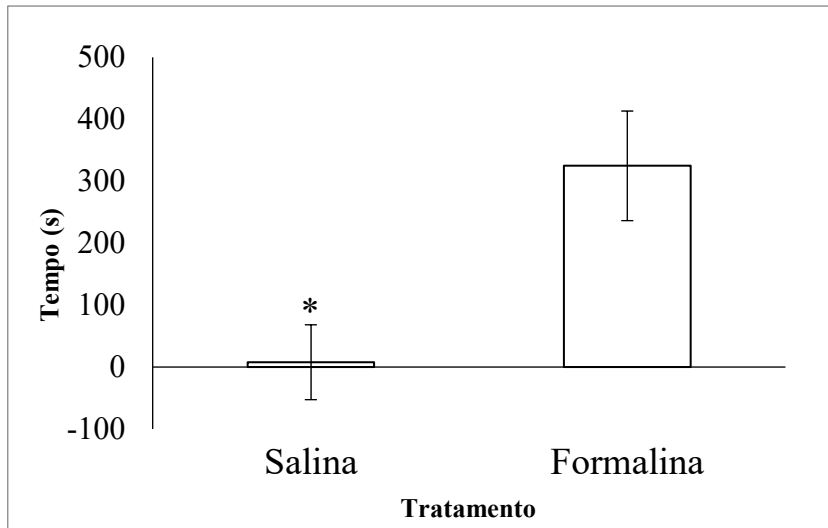
**Fig. 5** Escurecimento do corpo do *O. niloticus* submetidos a injeção de salina (n=8) ou formalina 3% (n=7). Os dados são apresentados como a diferença ( $\Delta$ ) entre a linha de base e o pós-estímulo.



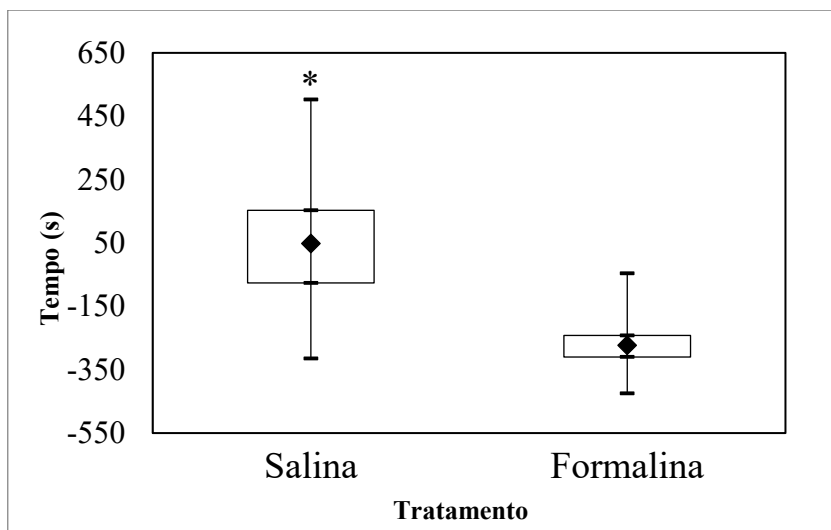
**Fig. 6** Escurecimento dos olhos do *O. niloticus* submetidos a injeção de salina (n=8) ou formalina 3% (n=7). Os dados são apresentados como a diferença ( $\Delta$ ) entre a linha de base e o pós-estímulo. O  $\blacklozenge$  indica a mediana.



**Fig. 7** Tempo de permanência com a nadadeira dorsal de raio duro eriçada de *O. niloticus* submetidos a injeção de salina (n=8) ou formalina 3% (n=7). Os dados são apresentados como a diferença ( $\Delta$ ) entre a linha de base e o pós-estímulo. O  $\blacklozenge$  indica a mediana.



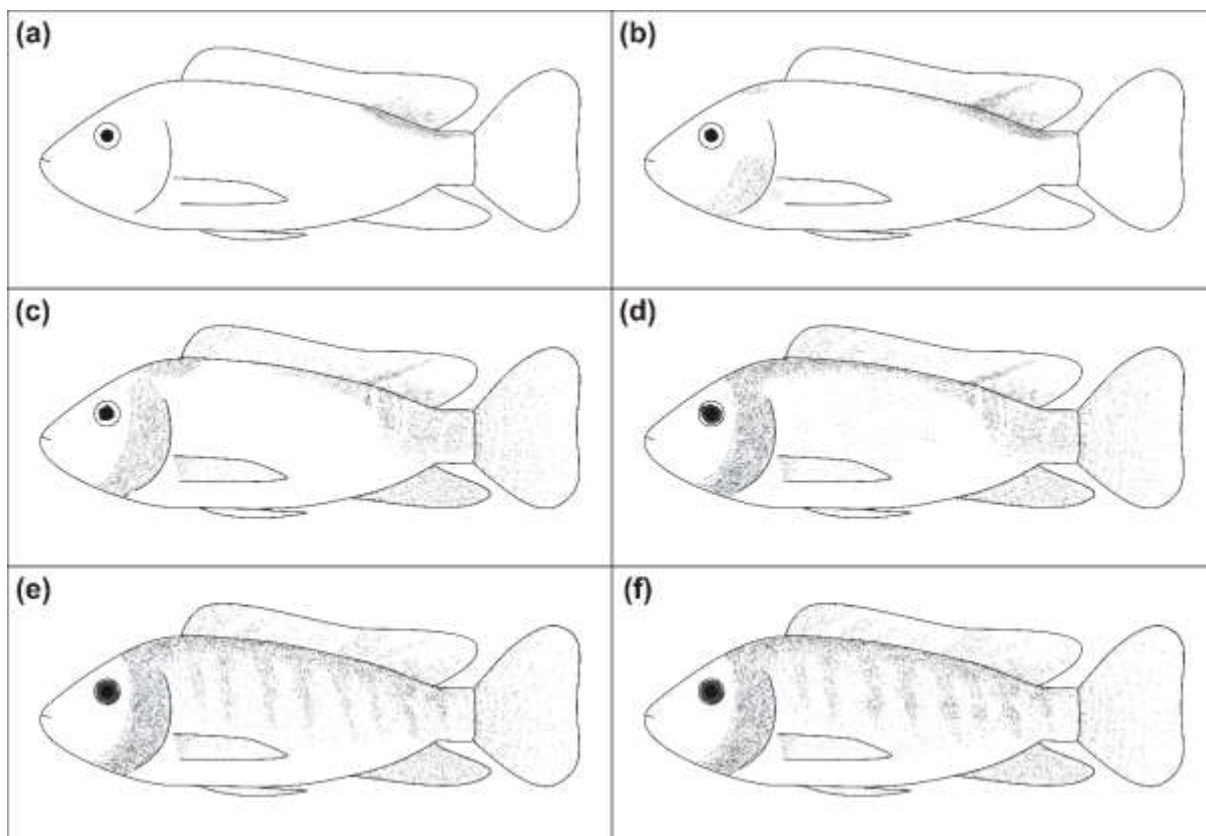
**Fig. 8** Tempo de permanência com a nadadeira dorsal de raio mole abaixada de *O. niloticus* submetidos a injeção de salina (n=8) ou formalina 3% (n=7). Os dados são apresentados como a diferença ( $\Delta$ ) entre a linha de base e o pós-estímulo. O \* indica diferença significativa (teste t,  $t = -3,025$ ;  $GL=13$ ;  $P = 0,010$ ).



**Fig. 9** Tempo de permanência com a nadadeira dorsal de raio mole em movimento de *O. niloticus* submetidos a injeção de salina (n=8) ou formalina 3% (n=7). Os dados são apresentados como a diferença ( $\Delta$ ) entre a linha de base e o pós-estímulo. O \* indica diferença significativa (teste Mann Whitney,  $U = 49,000$ ;  $P = 0,014$ ). O ♦ indica a mediana.

Durante as análises comportamentais, foi observado que os peixes (n=5) que receberam injeção subcutânea de formalina e que morreram antes do final da filmagem pós-estímulo apresentaram alteração no padrão de coloração nos momentos que precederam a morte, tendo sido observado cinco fases de padrão de coloração (Fig. 10), além disso, na última fase todos os animais que tiveram essa alteração apresentaram posicionamento da nadadeira dorsal semelhante ao apresentado na Fig. 11, sendo que, essa mudança inicia-se tempos antes da morte do animal (próximo à fase c). O olho e as demais nadadeiras também apresentaram escurecimento progressivo após a injeção. Essas alterações não ocorreram em nenhum dos animais tratados com salina ou tratados com formalina e que não morreram durante o período experimental.





**Fig. 10** Desenho esquemático do padrão de escurecimento da pele de *O. niloticus* que morreram durante os procedimentos experimentais após a injeção subcutânea de formalina 3% na região posterior da nadadeira dorsal. (a) início do escurecimento da pele na região dorsal próximo ao local da injeção; (b) início do escurecimento da pele na região opercular e superior ao opérculo e contínuo escurecimento da região dorsal; (c) início do escurecimento da pele na região caudal e contínuo escurecimento da região opercular e dorsal; (d) contínuo escurecimento da pele na região dorsal, opercular e caudal; (e) em alguns casos há o aparecimento de listras no meio do corpo ou (f) aparecimento de listras e manchas sobrepostas, sendo o primeiro mais comum em nosso grupo experimental.



**Fig. 11** Última fase do padrão de cores apresentado pelo *O. niloticus* que morreram durante o período experimental após a injeção subcutânea de formalina 3%. A seta indica a nadadeira dorsal e sua posição na última fase do padrão de cor.

#### 4. Discussão

Os resultados obtidos indicam que a injeção subcutânea de formalina 3% na região posterior da nadadeira dorsal causa um efeito local que pode ser observado através da diminuição de movimentos ondulatórios e posicionamento da NDM abaixada, corroborando a conclusão de Wolkers et al. (2013) de que as respostas comportamentais e fisiológicas ao estímulo nocivo são espécie-específicas. A resposta comportamental à injeção subcutânea de formalina, observada para a espécie *O. niloticus* no presente estudo difere daquela descrita para a espécie *L. macrocephalus*, submetidos ao mesmo tipo de estimulação nociva. Em *L. macrocephalus* foi observado o aumento significativo na velocidade e distância percorrida em resposta a injeção subcutânea de formalina quando comparada a injeção de salina (Alves et al. 2013; Wolkers et al. 2013), além de apresentarem natação errática (Wolkers et al. 2013). O estudo de Ide e Hoffmann (2002) sobre a parada cardíaca reversível na *O. niloticus* mostra, ainda, que o estresse causado pela injeção subcutânea de formalina (2% e 3%) reduziu significativamente a magnitude da parada cardíaca reversível, além de promover imobilidade. No presente estudo, os animais que receberam a estimulação nociva por meio da injeção subcutânea de formalina não apresentaram alterações significativas no padrão de locomoção e não foi observado o comportamento de natação errática, embora tenha sido observada uma tendência à redução da locomoção. Estudos utilizando outras espécies de peixes e diferentes testes nociceptivos também demonstraram respostas diversas. Em *Danio rerio*, por exemplo, o tratamento com ácido acético a 10%, promoveu uma redução significativa em sua atividade (movimento) (Correia et al. 2011). Já em *Oncorhynchus mykiss*, a administração de 0,1 mL do mesmo ácido provocou comportamentos anômalos como fricção dos lábios no cascalho e contra os lados do tanque, e os animais demoram mais tempo para começar a ingerir alimento após o estímulo nocivo em relação aos controles (Sneddon 2003a). Em *Oreochromis mossambicus*, foi observado que os animais tiveram diminuição significativa na atividade de

natação por pelo menos 3 horas quando submetidos ao estímulo elétrico (Roques et al. 2012). Já no *Gadus morhua* foi observada uma redução no uso do abrigo, ficando mais tempo próximo ao fundo do aquário e apresentando um ligeiro atraso na recuperação dos batimentos operculares quando tratados com capsaicina 1% (Eckroth et al. 2014).

No presente estudo, a injeção subcutânea de formalina na *O. niloticus* promoveu alterações no posicionamento e movimentação da NDM, uma região que constitui a porção final da nadadeira dorsal, localizada após uma região mais rígida (Geerlink e Videler 1974), a nadadeira dorsal apresenta a função de dar maior estabilidade ao corpo do peixe durante a natação (Lauder e Madden 2007). Alterações no padrão locomotor e posicionamento da nadadeira não foram observados em estudos que aplicaram o mesmo estímulo nocivo na espécie *L. macrocephalus*. É possível que a ausência desta resposta no *L. macrocephalus* esteja relacionada ao local de injeção, já que, nesta espécie, a injeção subcutânea de formalina foi aplicada na região da nadadeira adiposa, uma nadadeira de tamanho bastante reduzido e ausente em ciclídeos como a *O. niloticus*. A alteração no padrão de uso da nadadeira dorsal observado aqui pode estar relacionada a uma redução no uso de uma região afetada com o objetivo de evitar que a sensação de dor seja intensificada. De fato, em estudos realizados com ratos e gatos, a aplicação da injeção de formalina 5% em uma das patas dianteiras causa uma diminuição do uso do membro afetado, sendo caracterizada pela elevação da pata como uma resposta a dor (Dubuisson e Dennis 1977). Entretanto, mais estudos precisam ser realizados para elucidar essa similaridade e os mecanismos fisiológicos ativados em decorrência da injeção de formalina no *O. niloticus*.

Em ciclídeos, a cor da pele está relacionada a comunicação social, competição, escolha do parceiro, forrageamento e predação (Maan e Sefc 2013). Além disso, os peixes podem apresentar padrões de cor que estão associados a diferentes tipos de comportamentos (Baerends e Baerends-Van Roon 1950; Baldaccini 1973; Hulscher-Emeis 1992; Lanzing e

Bower 1973; Potts 1974). Em nosso estudo foi identificado um padrão de escurecimento nos animais que morreram em decorrência da injeção subcutânea de formalina. O padrão de coloração observado se assemelha àquele descrito para juvenis de *Tilapia mossambicus* (*Oreochromis mossambicus* em nomenclatura atual) quando estas encontram-se excitadas, amedrontadas e assustadas (Lanzing e Bower 1973). As listras verticais que se destacam na fase final do padrão apresentado aqui, também aparece na *Tilapia natalensis* (Baerends e Baerends-Van Roon 1950) e *Tilapia zillii* (listras verticais do corpo juntamente com as da cabeça) (Hulscher-Emeis 1992) quando as mesmas estão sob potencial ameaça. No *Crenilabrus melops*, há o aparecimento de listras verticais de coloração castanha escura nos agressores em encontros agressivos intensos, situação semelhante é observada no comportamento de corte do macho, em peixes em situação de medo onde os mesmos não conseguem escapar (causada por ameaças de peixes dominantes) e quando são perturbados de alguma forma (Potts 1974). O aparecimento de listras pretas, também associadas ao estresse, foi descrito por Ide e Hoffmann (2002) em *O. niloticus* submetidas a injeção subcutânea de formalina 2 e 3%. Embora os níveis de cortisol, no presente estudo, não tenham apresentado aumento significativo nos animais submetidos à injeção subcutânea de formalina em relação aos tratados com salina, é importante ressaltar que os animais que morreram durante o experimento, que eram, possivelmente, aqueles mais responsivos ao estresse causado pelo estímulo nocivo, não puderam ter seu sangue amostrado, não sendo possível, portanto, avaliar seus níveis de cortisol. Entretanto, considerando que o padrão de escurecimento da pele apresentado por estes peixes está relacionado às situações de estresse extremo, este resultado sugere que os animais que receberam injeção subcutânea de formalina desenvolveram respostas fisiológicas associadas àquelas desencadeadas por, medo e predação, indicando que o estímulo nocivo ativou o comportamento defensivo da espécie.

Embora o padrão de coloração da pele tenha sido influenciado pela injeção subcutânea de formalina, especialmente naqueles animais que morreram durante o experimento, o estímulo nocivo não afetou significativamente o escurecimento da pele nos animais que não morreram devido à injeção. Segundo Leclercq et al. (2010), estas alterações no escurecimento da pele podem ser causadas por alterações fisiológicas, mais especificamente com a translocação (agregação/desagregação) de melanossomos dentro dos melanóforos. Embora o escurecimento da pele tem sido associado ao estresse em diversos estudos, as alterações no padrão de coloração observados no presente estudo não parecem estar diretamente associadas a resposta endócrina ao estresse, já que não foi observada uma correlação entre o escurecimento da pele e os níveis de cortisol plasmático. Em *O. mykiss* também não foi observado correlação entre os níveis de cortisol e o escurecimento da pele em peixes submetidos ao estresse social, entretanto os autores sugerem que o escurecimento da pele esteja relacionado ao aumento nos níveis de  $\alpha$ -MSH induzido pela ativação do eixo HPI (Höglund et al. 2000). Já outros estudos mostram haver correlação positiva entre os níveis de cortisol e o escurecimento da pele em peixes subordinados submetidos ao estresse social agudo em *O. niloticus* (Templonuevo e Cruz 2016). Em estudo realizado com o *O. mykiss* e *Salmo salar*, peixes com maior responsividade ao estresse apresentam menos manchas de eumelalina, embora não tenha sido observada correlação significativa entre os níveis de cortisol e as manchas (Kittilsen et al. 2009). As larvas de *Solea senegalensis* que tinham a cor da pele mais escura apresentaram maior nível de cortisol quando submetidos a perturbação por agitação em relação a larvas com coloração mais clara (Ruane et al. 2005). Os peixes da espécie *O. niloticus* submetidos a níveis tóxicos de substâncias como o nitrito (Yanbo et al. 2006), o extrato aquoso e etanólico de folhas de *Ipomoea aquatica* (Ayoola et al. 2011) e concentrações aumentadas de amônia (El-Shebly e Gad 2011) tiveram alterações comportamentais e escurecimento na pele, contudo, a taxa de escurecimento não foi medida e

não foi demonstrado correlações com níveis de cortisol plasmático. Esses resultados indicam que o escurecimento da pele pode ou não estar diretamente associado à resposta fisiológica do estresse (aumento nos níveis de cortisol) e que isto pode variar entre espécies e até mesmo entre os estímulos estressores aplicados.

Com relação ao escurecimento dos olhos, o presente estudo não demonstrou alteração significativa entre os animais submetidos ou não ao estímulo nocivo. Além disso, também não foi observada correlação entre os níveis de cortisol plasmático e o escurecimento dos olhos. Embora em algumas espécies de peixes, incluindo a *O. niloticus*, o escurecimento dos olhos venha sendo relacionada à situações de estresse social (Suter e Huntingford 2002; Volpato et al. 2003; Miyai et al. 2011) e não social (Freitas et al. 2014), estes estudos também não demonstraram haver correlação entre este parâmetro e a ativação do eixo HPI, sendo possível que outros mecanismos, além da resposta ao estresse, sejam responsáveis por este escurecimento.

## **5. Conclusão**

Os resultados do presente estudo mostram que o teste da formalina ativou o sistema nociceptivo no *O. niloticus* desencadeando respostas comportamentais associadas a proteção do tecido lesado e que indicam ativação do sistema de defesa da espécie. Além disso, a redução do uso da NDM em decorrência da injeção subcutânea de formalina, comportamento similar ao de mamíferos submetidos ao mesmo estímulo, indica que a sensação dolorosa pode estar presente nestes animais. Os resultados também confirmam a hipótese de que as respostas apresentadas a esse teste são espécie-específicas e corroboram o conhecimento acerca da nociceção dentro do filo dos vertebrados. Mais estudos precisam ser realizados para averiguar quais mecanismos fisiológicos são ativados em decorrência da injeção de formalina nesta espécie.

## Referências

- Alves FL, Barbosa Júnior A, Hoffmann A (2013) Antinociception in piauçu fish induced by exposure to the conspecific alarm substance. *Physiol Behav.* <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.12.003>
- Ayoola SO, Kuton MP, Idowu AA, Adelekun AB (2011) Acute toxicity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) juveniles exposed to aqueous and ethanolic extracts of *Ipomoea aquatica* leaf. *Nat Sci* 9: 91-99
- Baerends GP, Baerends-Van Roon JM (1950) An Introduction to the Study of the Ethology of the Cichlid Fishes. *Behaviour* 1: 1-243
- Baldaccini NE (1973) An ethological study of reproductive behaviour including the colour patterns of the cichlid fish *Tilapia mariae* (Boulanger). *Monit Zool Italo - Ital J Zool* 7: 247-290
- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D (2009) Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell.* <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.028>
- Chandroo KP, Duncan IJH, Moccia RD (2004) Can fish suffer?: perspectives on sentience, pain, fear and stress. *Appl Anim Behav Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2004.02.004>
- Correia AD, Cunha SR, Scholze M, Stevens ED (2011) A novel behavioral fish model of nociception for testing analgesics. *Pharmaceuticals.* <https://doi.org/10.3390/ph4040665>
- Dubuisson D, Dennis SG (1977) The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain.* [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(77\)90130-0](https://doi.org/10.1016/0304-3959(77)90130-0)
- Dunlop R, Laming P (2005) Mechanoreceptive and nociceptive responses in the central nervous system of goldfish (*Carassius auratus*) and trout (*Oncorhynchus mykiss*). *The J Pain.* <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2005.02.010>
- Eckroth JR, Øyvind AH, Sneddon LU, Bichão H, Døving KB (2014) Physiological and behavioural responses to noxious stimuli in the Atlantic cod (*Gadus morhua*). *PloS One.* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100150>
- El-Shebly AA.; Gad HAM (2011) Effect of chronic ammonia exposure on growth performance, serum growth hormone (GH) levels and gill histology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J Microbiol Biotechnol Res* 1: 183-197
- Freitas RHA, Negrão CA, Felício AKC, Volpato GL (2014) Eye darkening as a reliable, easy and inexpensive indicator of stress in fish. *Zoology.* <https://doi.org/10.1016/j.zool.2013.09.005>
- Geerlink PJ, Videler JJ (1973) Joints and Muscles of the Dorsal Fin of *Tilapia Nilotica* L. (Fam. Cichlidae). *Neth J Zool.* <https://doi.org/10.1163/002829674X00075>
- Hoffmann A (2008) Dor na perspectiva da evolução filogenética. In: Hoffmann A, Massimi M, Menescal-de-Oliveira L (ed) Reflexões em torno da dor, 3 rd edn. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, Ribeirão Preto, pp 169-196
- Höglund E, Balm PHM, Winberg S (2000) Skin darkening, a potential social signal in subordinate arctic charr (*Salvelinus alpinus*): The regulatory role of brain monoamines and pro-opiomelanocortin-derived peptides. *J Exp Biol* 203: 1711-1721
- Hulscher-Emeis TM (1992) The variable colour patterns of *Tilapia zillii* (Cichlidae): integrating ethology, chromatophore regulation and the physiology of stress. *Neth J Zool.* <https://doi.org/10.1163/156854292X00062>
- Ide LM, Hoffmann A (2002) Stressful and behavioral conditions that affect reversible cardiac arrest in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei). *Physiol Behav.* [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(01\)00633-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(01)00633-3)

- Julius D, Basbaum AI (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/35093019>
- Kittilsen S, Schjolden J, Beitnes-Johansen I, Shaw JC, Pottinger TG, Sørensen C, Braastad BO, Bakken M, Øverli Ø (2009) Melanin-based skin spots reflect stress responsiveness in salmonid fish. *Horm Behav*. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2009.06.006>
- Lanzing WJR, Bower CC (1973) Development of colour patterns in relation to behaviour in *Tilapia mossambica* (Peters). *J Fish Biol*. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1974.tb04519.x>
- Lauder GV, Madden PGA (2007) Fish locomotion: kinematics and hydrodynamics of flexible foil-like fins. *Exp Fluids*. <https://doi.org/10.1007/s00348-007-0357-4>
- Leclercq E, Taylor JF, Migaud H (2010) Morphological skin colour changes in teleosts. *Fish Fish*. <https://doi.org/10.1111/j.1467-2979.2009.00346.x>
- Maan ME, Sefc KM (2013) Colour variation in cichlid fish: Developmental mechanisms, selective pressures and evolutionary consequences. *Sem Cell Develop Biol*. <https://doi.org/10.1016/j.semdb.2013.05.003>
- Miyai CA, Sanches FHC, Costa TM, Colpo KD, Volpato GL, Barreto RE (2011) The correlation between subordinate fish eye colour and received attacks: a negative social feedback mechanism for the reduction of aggression during the formation of dominance hierarchies. *Zoology*. <https://doi.org/10.1016/j.zool.2011.07.001>
- Potts GW (1974) The colouration and its behavioural significance in the corkwing wrasse, *Crenilabrus melops*. *J Mar Biol Assoc U K*. <https://doi.org/10.1017/S0025315400057659>
- Reilly SC, Quinn JP, Cossins AR, Sneddon LU (2008) Behavioural analysis of a nociceptive event in fish: Comparisons between three species demonstrate specific responses. *Appl Anim Behav Sci*. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2008.01.016>
- Roques JAC, Abbink W, Chereau G, Fourneyron A, Spanings T, Burggraaf D, van de Bos R, van de Vis H, Flik G (2012) Physiological and behavioral responses to an electrical stimulus in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Fish Physiol Biochem*. <http://dx.doi.org/10.1007/s10695-011-9586-9>
- Roques JAC, Abbink W, Geurds F, van de Vis H, Flik G (2010) Tailfin clipping, a painful procedure: Studies on Nile tilapia and common carp. *Physiol Behav*. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.08.001>
- Ruane NM, Makridis P, Balm PHM, Dinis MT (2005) Skin darkness is related to cortisol, but not MSH, content in post-larval *Solea senegalensis*. *J Fish Biol*. <https://doi.org/10.1111/j.0022-1112.2005.00747.x>
- Smith ESJ, Lewin GR (2009) Nociceptors: a phylogenetic view. *J Comp Physiol A*. <https://doi.org/10.1007/s00359-009-0482-z>
- Sneddon LU (2002) Anatomical and electrophysiological analysis of the trigeminal nerve in a teleost fish, *Oncorhynchus mykiss*. *Neurosci Lett*. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(01\)02584-8](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(01)02584-8)
- Sneddon LU (2003a) The evidence for pain in fish: the use of morphine as an analgesic. *Appl Anim Behav Sci*. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(03\)00113-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(03)00113-8)
- Sneddon LU (2003b) Trigeminal somatosensory innervation of the head of the rainbow trout with particular reference to nociception. *Brain Res*. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(03\)02483-1](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(03)02483-1)
- Sneddon LU, Braithwaite VA, Gentle JM (2003) Do fish have nociceptors? Evidence for the evolution of a vertebrate sensory system. *Proc R Soc Lond B: Biol Sci*. <https://doi.org/10.1098/rspb.2003.2349>



- Suter HC, Huntingford FA (2002) Eye colour in juvenile Atlantic salmon: effects of social status, aggression and foraging success. *J Fish Biol.* <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2002.tb00899.x>
- Templonuevo RMC, Cruz EMV (2016) Responses of red Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) subjected to social and confinement stresses. *CLSU Int J Sci Technol* 1: 7-14. <http://dx.doi.org/10.22137/ijst.2016.v1n2.02>
- Volpato GL, Luchiari AC, Duarte CRA, Barreto RE, Ramanzini GC (2003) Eye color as an indicator of social rank in the fish Nile tilapia. *Braz J Med Biol Res.* <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2003001200007>
- Wolkers CPB, Barbosa Junior A, Menescal-de-Oliveira L, Hoffmann A (2013) Stress-induced antinociception in fish reversed by naloxone. *PloS One.* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071175>
- Wolkers CPB, Barbosa Junior A, Menescal-de-Oliveira L, Hoffmann A (2015a) Acute administration of a cannabinoid CB1 receptor antagonist impairs stress-induced antinociception in fish. *Physiol Behav.* <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.01.038>
- Wolkers CPB, Barbosa Junior A, Menescal-de-Oliveira L, Hoffmann A (2015b) GABA<sub>A</sub>-benzodiazepine receptors in the dorsomedial (Dm) telencephalon modulate restraint-induced antinociception in the fish *Leporinus macrocephalus*. *Physiol Behav.* <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.04.037>
- Yanbo W, Wenju Z, Weifen L, Zirong X (2006) Acute toxicity of nitrite on tilapia (*Oreochromis niloticus*) at different external chloride concentrations. *Fish Physiol Biochem.* <https://doi.org/10.1007/s10695-005-5744-2>

## ANEXO I – Normas da revista Fish Physiology and Biochemistry

Disponível

em:

<[https://www.springer.com/life+sciences/ecology/journal/10695?detailsPage=pltdci\\_1060339](https://www.springer.com/life+sciences/ecology/journal/10695?detailsPage=pltdci_1060339)>. Acessado em: 11 jun. 2018

**Fish Physiology and Biochemistry**  
ISSN: 0920-1742 (Print) 1573-5168 (Online)

### Description

*Fish Physiology and Biochemistry (FISH)* is an international journal publishing original research papers and reviews on all physiological aspects of fishes. The Editorial Board of FISH gives a high priority to mechanistic studies in the field of fish physiology, from an environmental and evolutionary perspective. All levels of biological organization are considered, from molecular to whole organismal one. Emphasis should be given to functional understanding and links between physiological/biochemical traits and evolutionary history as well as ecology and environmental plasticity of fish species. Except in specific cases, purely descriptive papers are not considered for peer-reviewing and publication in FISH. The following areas will be given preference, but other topics will be given consideration:

- Reproductive physiology and endocrinology
- Nutritional physiology and metabolism
- Osmotic, ionic, respiratory and excretory homeostasis
- Nerve and muscle physiology
- Bioenergetics and growth physiology
- Stress and welfare physiology
- Neuro-immune-endocrine interactions
- Physiological responses of fish to toxicants under environmentally relevant scenarios

FISH receives many more manuscripts than it can publish. As a consequence, the publication rate averages 25% of the submitted manuscripts.

Categories of articles include full papers, brief communications, unsolicited and invited reviews, and editorial comments and announcements.

[Hide](#)

Impact Factor	Available
1.647	1986 - 2018
Volumes	Issues
44	185
Articles	Open Access
2,861	<a href="#">40 Articles</a>

### Stay up to Date

- Article abstracts by RSS
- Register for journal updates

## Instructions for Authors

### MANUSCRIPT SUBMISSION

#### Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

#### Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

## Online Submission

Please follow the hyperlink "Submit online" on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

### TITLE PAGE

#### Title Page

The title page should include:

- » The name(s) of the author(s)
- » A concise and informative title
- » The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- » The e-mail address, and telephone number(s) of the corresponding author
- » If available, the 16-digit ORCID of the author(s)

#### Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

#### Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

### TEXT

#### Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- » Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- » Use italics for emphasis.
- » Use the automatic page numbering function to number the pages.
- » Do not use field functions.
- » Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- » Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- » Use the equation editor or MathType for equations.
- » Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

- » LaTeX macro package (zip, 182 kB)

## Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

## Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

## Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

## Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

## REFERENCES

### Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- ▶ Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- ▶ This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- ▶ This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995a, b; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999, 2000).

### Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work. Order multi-author publications of the same first author alphabetically with respect to second, third, etc. author. Publications of exactly the same author(s) must be ordered chronologically.

» Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. <https://doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of "et al" in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325-329

» Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. <https://doi.org/10.1007/s001090000086>

» Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

» Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

» Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

» Dissertation

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

» ISSN LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

» EndNote style (zip, 2 kB)

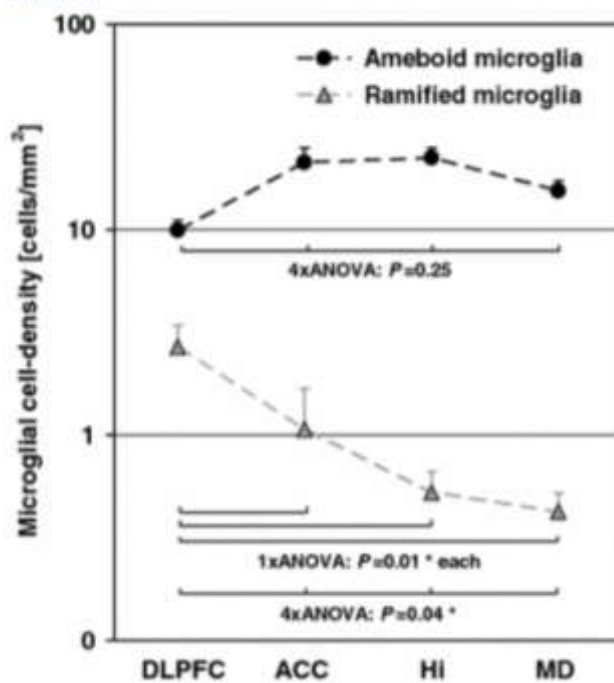
## TABELAS

- » Todas as tabelas devem ser numeradas usando algarismos arábicos.
- » As tabelas devem sempre ser citadas em texto em ordem numérica consecutiva.
- » Para cada tabela, forneça uma legenda da tabela (título) explicando os componentes da tabela.
- » Identifique qualquer material publicado anteriormente, fornecendo a fonte original na forma de uma referência no final da legenda da tabela.
- » As notas de rodapé das tabelas devem ser indicadas por letras minúsculas sobrescritas (ou asteriscos para valores de significância e outros dados estatísticos) e incluídas abaixo do corpo da tabela.

## Electronic Figure Submission

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

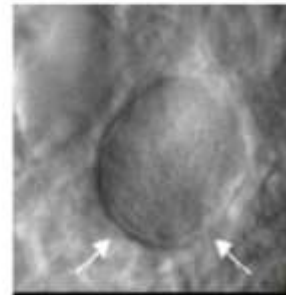
## Line Art



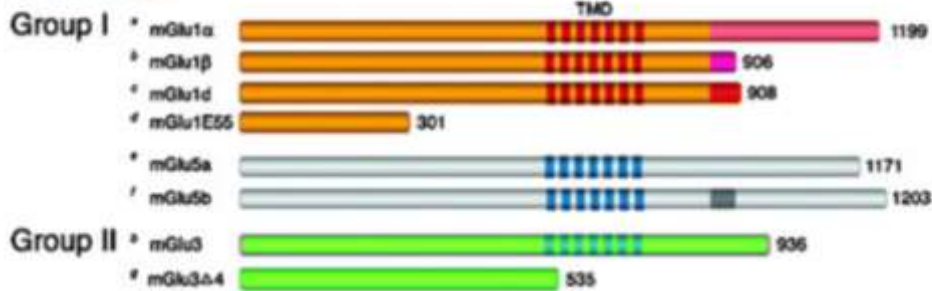
- ⇒ Definition: Black and white graphic with no shading.
- ⇒ Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- ⇒ All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- ⇒ Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- ⇒ Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

#### Halftone Art

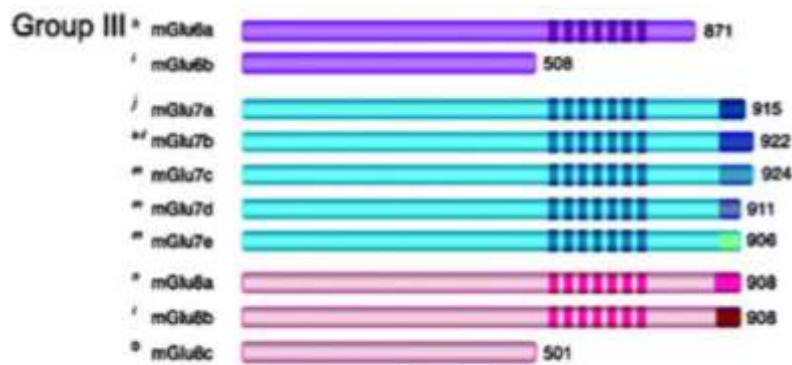
- ⇒ Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- ⇒ If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- ⇒ Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.



#### Combination Art







- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

### Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

### Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.



### Figure Numbering

- ▶ All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- ▶ Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- ▶ Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- ▶ If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

### Figure Captions

- ▶ Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- ▶ Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- ▶ No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- ▶ Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.

- ▶ Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

### Figure Placement and Size

- ▶ Figures should be submitted separately from the text, if possible.
- ▶ When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- ▶ For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- ▶ For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

### Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

### Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- ▶ All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- ▶ Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- ▶ Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Before submitting research datasets as electronic supplementary material, authors should read the journal's Research data policy. We encourage research data to be archived in data repositories wherever possible.

### Submission

- ▶ Supply all supplementary material in standard file formats.
- ▶ Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- ▶ To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

### Audio, Video, and Animations

- ▶ Aspect ratio: 16:9 or 4:3
- ▶ Maximum file size: 25 GB
- ▶ Minimum video duration: 1 sec
- ▶ Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

### Text and Presentations

- ▶ Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- ▶ A collection of figures may also be combined in a PDF file.

### Spreadsheets

- ▶ Spreadsheets should be submitted as .csv or .xlsx files (MS Excel).

### Specialized Formats

- ▶ Specialized format such as .pdb (chemical), .vrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

### Collecting Multiple Files

- ▶ It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

### Numbering

- ▶ If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- ▶ Refer to the supplementary files as "Online Resource", e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4".
- ▶ Name the files consecutively, e.g. "ESM\_3.mpg", "ESM\_4.pdf".

### Captions

- ▶ For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

### Processing of supplementary files

- ▶ Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

### Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- ▶ The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- ▶ Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

## ENGLISH LANGUAGE EDITING



For editors and reviewers to accurately assess the work presented in your manuscript you need to ensure the English language is of sufficient quality to be understood. If you need help with writing in English you should consider:

- ▶ Asking a colleague who is a native English speaker to review your manuscript for clarity.
- ▶ Visiting the English language tutorial which covers the common mistakes when writing in English.
- ▶ Using a professional language editing service where editors will improve the English to ensure that your meaning is clear and identify problems that require your review. Two such services are provided by our affiliates Nature Research Editing Service and American Journal Experts. Springer authors are entitled to a 10% discount on their first submission to either of these services, simply follow the links below.

- 🔗 [English language tutorial](#)
- 🔗 [Nature Research Editing Service](#)
- 🔗 [American Journal Experts](#)

Please note that the use of a language editing service is not a requirement for publication in this journal and does not imply or guarantee that the article will be selected for peer review or accepted.

If your manuscript is accepted it will be checked by our copyeditors for spelling and formal style before publication.

为便于编辑和评审专家准确评估您稿件中陈述的研究工作，您需要确保您的英语语言质量足以令人理解。如果您需要英文写作方面的帮助，您可以考虑：

- 请一位以英语为母语的同事审核您的稿件是否表意清晰。
- 查看一些有关英语写作中常见语言错误的教程。
- 使用专业语言编辑服务，编辑人员会对英语进行润色，以确保您的意思表达清晰，并识别需要您复核的问题。我们的附属机构 **Nature Research Editing Service** 和合作伙伴 **American Journal Experts** 即可提供此类服务。

[☞ 教程](#)

[☞ Nature Research Editing Service](#)

[☞ American Journal Experts](#)

请注意，使用语言编辑服务并非在期刊上发表文章的必要条件，同时也并不意味或保证文章将被选中进行同行评议或被接受。

如果您的稿件被接受，在发表之前，我们的文字编辑会检查您的文稿拼写是否规范以及文体是否正式。

エディターと査読者があなたの論文を正しく評価するには、使用されている英語の質が十分に高いことが必要とされます。英語での論文執筆に際してサポートが必要な場合には、次のオプションがあります：

- 英語を母国語とする同僚に、原稿で使用されている英語が明確であるかをチェックしてもらう。
- 英語で執筆する際によくある間違いに関する英語のチュートリアルを参照する。
- プロの英文校正サービスを利用する。校正者が原稿の意味を明確にしたり、問題点を指摘し、英語の質を向上させます。**Nature Research Editing Service** と **American Journal Experts** の2つは弊社と提携しているサービスです。**Springer** の著者は、いずれのサービスも初めて利用する際には10%の割引を受けることができます。以下のリンクを参照ください。

[☞ 英語のチュートリアル](#)

[☞ Nature Research Editing Service](#)

[☞ American Journal Experts](#)

英文校正サービスの利用は、投稿先のジャーナルに掲載されるための条件ではないこと、また論文審査や受理を保証するものではないことに留意してください。

原稿が受理されると、出版前に弊社のコピーエディターがスペルと体裁のチェックを行います。

영어 원고의 경우, 에디터 및 리뷰어들이 귀하의 원고에 실린 결과물을 정확하게 평가할 수 있도록, 그들이 충분히 이해할 수 있을 만한 수준으로 작성되어야 합니다. 만약 영작문과 관련하여 도움을 받기를 원하신다면 다음의 사항들을 고려하여 주십시오:

- 귀하의 원고의 표현을 명확히 해줄 영어 원어민 동료들 찾아서 리뷰를 의뢰합니다.
- 영어 튜토리얼 페이지에 방문하여 영어로 글을 쓸 때 자주하는 실수들을 확인합니다.
- 리뷰에 대비하여, 원고의 의미를 명확하게 해주고 리뷰에서 요구하는 문제점들을 식별해서 영문 수준을 향상시켜주는 전문 영문 교정 서비스를 이용합니다. Nature Research Editing Service 와 American Journal Experts에서 저희와 협약을 통해 서비스를 제공하고 있습니다. Springer 저자들이 본 교정 서비스를 첫 논문 투고를 위해 사용하시는 경우 10%의 할인이 적용되며, 아래의 링크를 통하여 확인이 가능합니다.

↳ 영어 튜토리얼 페이지

↳ Nature Research Editing Service

↳ American Journal Experts

영문 교정 서비스는 게재를 위한 요구사항은 아니며, 해당 서비스의 이용이 피어 리뷰에 논문이 선택되거나 게재가 수락되는 것을 의미하거나 보장하지 않습니다.

원고가 수락될 경우, 출판 전 저희측 편집자에 의해 원고의 철자 및 문체를 검수하는 과정을 거치게 됩니다.

#### ETHICAL RESPONSIBILITIES OF AUTHORS

22

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include:

- The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.
- The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on the re-use of material to avoid the hint of text-recycling ("self-plagiarism")).
- A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. "salami-publishing").
- No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions
- No data, text, or theories by others are presented as if they were the author's own ("plagiarism"). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted.

**Important note:** the journal may use software to screen for plagiarism.

- Consent to submit has been received explicitly from all co-authors, as well as from the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute/organization where the work has been carried out, **before** the work is submitted.
- Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results.



- Authors are strongly advised to ensure the correct author group, corresponding author, and order of authors at submission. Changes of authorship or in the order of authors are **not** accepted **after** acceptance of a manuscript.
- Adding and/or deleting authors and/or changing the order of authors **at revision stage** may be justifiably warranted. A letter must accompany the revised manuscript to explain the reason for the change(s) and the contribution role(s) of the added and/or deleted author(s). Further documentation may be required to support your request.
- Requests for addition or removal of authors as a result of authorship disputes after acceptance are honored after formal notification by the institute or independent body and/or when there is agreement between all authors.
- Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results. This could be in the form of raw data, samples, records, etc. Sensitive information in the form of confidential proprietary data is excluded.

If there is a suspicion of misconduct, the journal will carry out an investigation following the COPE guidelines. If, after investigation, the allegation seems to raise valid concerns, the accused author will be contacted and given an opportunity to address the issue. If misconduct has been established beyond reasonable doubt, this may result in the Editor-in-Chief's implementation of the following measures, including, but not limited to:

- If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.
- If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction, either an erratum will be placed with the article or in severe cases complete retraction of the article will occur. The reason must be given in the published erratum or retraction note. Please note that retraction means that the paper is **maintained on the platform**, watermarked "retracted" and explanation for the retraction is provided in a note linked to the watermarked article.
- The author's institution may be informed.

#### COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled "Compliance with Ethical Standards" when submitting a paper:

- Disclosure of potential conflicts of interest
- Research involving Human Participants and/or Animals
- Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests **that are directly or indirectly related to the research** may include but are not limited to the following:

- ⇒ Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)
- ⇒ Honoraria for speaking at symposia
- ⇒ Financial support for attending symposia
- ⇒ Financial support for educational programs
- ⇒ Employment or consultation
- ⇒ Support from a project sponsor
- ⇒ Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships
- ⇒ Multiple affiliations
- ⇒ Financial relationships, for example equity ownership or investment interest
- ⇒ Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)
- ⇒ Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found

[here](#):

The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

See below examples of disclosures:

**Funding:** This study was funded by X (grant number X).

**Conflict of Interest:** Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

### Support for Research Data Sharing

Many journals and funding agencies encourage or require data sharing in repositories. If you need help organising and sharing your research data (including code, text, raw and processed data, video and images) you should consider:

- ▶ Finding a suitable data repository for your data
- ▶ Uploading your data to Springer Nature Research Data Support
- ▶ Contacting Springer Nature's Research Data Support Helpdesk for advice

- 🔗 [List of recommended data repositories](#)
- 🔗 [Access Research Data Support](#)
- 🔗 [More information on Research Data Support](#)
- 🔗 [Contact the Research Data Helpdesk](#)

Research Data Support is an optional Springer Nature service available to all researchers who have datasets they want to make easier to cite, share and find. The service provides a secure portal for data upload, and data and metadata are curated and improved by professional Research Data Editors. The publication of datasets is coordinated by our Research Data Editors in consultation with the researcher, and a DOI is provided to allow the dataset to be cited and shared.

Checks are carried out as part of a submission screening process to ensure that researchers who should use a specific community-endorsed repository are advised of the best option for sharing and archiving their data. Use of Research Data Support is optional and does not imply or guarantee that a manuscript will be accepted.

### OPEN CHOICE

Open Choice allows you to publish open access in more than 1850 Springer Nature journals, making your research more visible and accessible immediately on publication.

Benefits:

- ▶ Increased researcher engagement: Open Choice enables access by anyone with an internet connection, immediately on publication.
- ▶ Higher visibility and impact: In Springer hybrid journals, OA articles are accessed 4 times more often on average, and cited 1.7 more times on average\*.
- ▶ Easy compliance with funder and institutional mandates: Many funders require open access publishing, and some take compliance into account when assessing future grant applications.

It is easy to find funding to support open access – please see our funding and support pages for more information.

\*) Within the first three years of publication. Springer Nature hybrid journal OA impact analysis, 2018.

- 🔗 [Open Choice](#)
- 🔗 [Funding and Support pages](#)

### Copyright and license term – CC BY

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

- 🔗 [Find more about the license agreement](#)