

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

NOCICEPÇÃO EM PEIXES: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

Carolina Monteiro de Almeida

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

Dezembro – 2018

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

NOCICEPÇÃO EM PEIXES: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

Carolina Monteiro de Almeida

Orientador: Prof.^a Dr.^a Carla Patrícia Bejo Wolkers

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

Dezembro – 2018

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe Aparecida, pelo apoio, carinho, paciência, conselhos, suporte e por nunca ter me deixado desistir nesses longos quatro anos de curso.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Aparecida e Luís, que sempre acreditaram em mim e que a todo o momento me incentivaram a seguir nos meus estudos. Pelo apoio, carinho, amor e por sempre estarem ao meu lado acreditando nos meus sonhos, possibilitando assim realiza-los.

Aos meus irmãos, Felipe e Gabriel, pelo amor, apoio e companheirismo.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Carla Patrícia Bejo Wolkers, pela assistência, paciência, amizade e pelo olhar perspicaz essencial para o desenvolvimento do trabalho.

Às minhas amigas de curso e membros do “The Gang”, Daiane, Nayara, Lívia Maria e Thaís, pela amizade e por sempre estarem comigo tanto nos momentos bons quanto nos momentos ruins, que nossa amizade seja eterna.

À família Dias, minha madrinha Noeli, Maria Lídia, Carlos e Carlos Filho, por se tornarem minha segunda família, me acolhendo por todos esses anos que estive longe de casa.

Aos demais amigos e colegas não citados, que sempre estiveram ao meu lado quando eu precisei e que foram essenciais nessa etapa da minha vida. Em especial à Beatriz e Alex, que mesmo longe não deixaram de me apoiar.

À Universidade Federal de Uberlândia - Campus Pontal e a todos os professores que passaram pela minha graduação, que deixaram seus conhecimentos, que eu irei carregar por toda a minha vida.

“A nossa ciência, comparada à realidade, é primitiva e infantil – e, mesmo assim, é a coisa mais preciosa que temos.”

(Albert Einstein)

RESUMO

A sugestão de que os peixes podem perceber a dor e ter a capacidade de sofrer desencadeou vários debates no meio científico. Estudos acerca da dor e nocicepção em peixes são relativamente recentes na literatura e têm aumentado devido à necessidade de se compreender a evolução do sistema nociceptivo nos vertebrados, além de se ampliar a gama de modelos biológicos a serem utilizados para o estudo da dor. Assim, o trabalho foi elaborado a partir de uma revisão bibliográfica sistemática de artigos científicos das bases de dados *ScienceDirect* e *Scopus* acerca da nocicepção em peixes; 45 artigos destas bases foram utilizados para a revisão. As espécies de peixes mais utilizadas nos estudos analisados foi o *Danio rerio* e o *Oncorhynchus mykiss*, e em relação aos tipos de testes nociceptivos mais aplicados, observou-se que a maior parte dos testes utilizados são químicos, principalmente aqueles utilizando o ácido acético e o formaldeído como estímulo nocivo. Esta revisão demonstrou que o estudo da nocicepção em peixes tem ganhado força na última década, ampliando os conhecimentos acerca da evolução da dor e colocando o peixe como alternativa aos modelos biológicos mamíferos para estudo da dor e nocicepção.

Palavras-chave: Dor; Modelo biológico; *Zebrafish*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
1.1. Evolução da dor e nocicepção.....	12
1.2. Peixes no estudo da dor.....	14
2. METODOLOGIA.....	16
3. RESULTADOS.....	16
4. DISCUSSÃO.....	21
4.1. Modelos utilizados no estudo da dor e nocicepção em peixes.....	21
4.2. Testes nociceptivos.....	23
4.3. Evidências da presença de Nociceptores.....	28
4.4. Evidências de analgesia farmacológica.....	30
4.5. Evidências de analgesia endógena.....	32
4.6. Substratos neurais da nocicepção e analgesia.....	34
5. CONCLUSÃO.....	37
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
7. ANEXOS.....	48

1. INTRODUÇÃO

Os sistemas sensoriais possuem o papel importante de informar o sistema nervoso central (SNC) sobre as condições do ambiente externo e o estado do meio interno de um organismo (Le Bars et al. 2001; Alves et al. 2017). A dor é definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP 1979) como sendo “uma experiência emocional e sensorial desagradável associada com uma lesão tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal lesão”. Trata-se de uma submodalidade da sensação somática que consiste em uma cascata complexa de experiências sensoriais, emocionais e cognitivas desagradáveis provocadas por um real ou potencial dano tecidual manifestado por reações autônomas, psicológicas e comportamentais (Vitor et al. 2008; Sneddon 2009; Dubin e Patapoutian 2010).

A dor é um tipo de percepção que faz parte de um sistema complexo, o sistema nociceptivo, que compreende um conjunto geral de mecanismos responsáveis pelo controle da homeostase (Le Bars et al. 2001; Alves et al. 2017). Assim, a mesma representa um sinal de alerta, que tem como função ajudar na proteção do organismo, desencadeando reações que induzam comportamentos específicos que evitem ou reduzam os estímulos que estejam causando-a, resultando potencialmente no encerramento ou na limitação de danos consequentes. Com isso, comportamentos resultantes da dor podem facilitar outras funções biológicas, como a manutenção e regeneração de tecidos, sendo que a importância desses comportamentos é bem ilustrada em seres humanos por meio de casos patológicos de insensibilidade congênita a estímulos dolorosos, onde as experiências patológicas normalmente não percebidas pela dor podem ter consequências catastróficas (Le Bars et al. 2001; Alves et al. 2017).

No início do século XX, Sherrington (1910) desenvolveu o conceito e introduziu o termo nocicepção. Mais tarde Dennis e Melzack (1983) consideraram que a dor/nocicepção tem pelo menos três funções: (1) alertar o indivíduo sobre a existência de um dano tecidual,

(2) alertar o indivíduo sobre a probabilidade de ocorrer dano tecidual ao perceber um estímulo que pode causar esse dano, e (3) alertar um grupo social do perigo tão logo ele exista para qualquer um de seus membros (Le Bars et al. 2001). Sendo assim, a nocicepção é um mecanismo sensorial que permite que os animais percebam e também evitem potenciais danos dos tecidos, sendo de grande importância para a sobrevivência. Este processo depende de receptores especializados, os nociceptores, que são neurônios que tem como função detectar e responder a formas de energia potencialmente prejudiciais como calor, estímulos mecânicos e químicos do meio ambiente. Na nocicepção ocorre, portanto, a codificação e o processamento dos estímulos ambientais (físicos e químicos) ou patológicos, que resultam na dor, através de uma cascata complexa de eventos da periferia até as estruturas superiores do SNC (Tracey 2017).

Dessa forma, a dor pode ser considerada uma submodalidade da sensação somática, que resulta de vários eventos que tem início na ativação de terminais de neurônios sensitivos primários periféricos, a transmissão do sinal nociceptivo para o encéfalo, o processamento nociceptivo em áreas distintas do encéfalo e, por último, a conversão da informação nociceptiva em percepção da dor. Portanto, as atividades que são induzidas nos nociceptores e nas vias nociceptivas pelos estímulos prejudiciais ainda não podem ser chamados de dor, pois é a interpretação de sinais nociceptivos no encéfalo, sob a influência de fatores cognitivos e emocionais, que converte a nocicepção em dor (Basbaum e Jessel 2000; Julius e Basbaum 2001; Segner 2012; Wolkers 2014). Com isso, descrever a dor como uma experiência (IASP 1979) separa a mesma da nocicepção. A nocicepção é um processo neural que vai envolver a transdução e transmissão de um estímulo nocivo ao encéfalo em vias ascendentes, e a dor seria o conjunto complexo de interrelações entre sistemas sinalizadores, modulação de centros superiores e uma percepção individual única (Steads 2013).

A definição e o reconhecimento da dor em seres humanos dependem da capacidade de comunicar os “sentimentos” ou estados subjetivos, e são fortemente influenciadas por experiências, já que compreende aspectos afetivos sensoriais, sendo uma experiência consciente, ou seja, o indivíduo sabe que está sentindo a mesma. Porém, devido à ausência desta “comunicação”, a avaliação da dor em animais não humanos é desafiadora e frequentemente depende das definições baseadas nas usadas nos humanos, surgindo assim à questão do que a dor significa quanto transferimos este conceito aos animais (Chandroo et al. 2004; Sneddon 2009).

A capacidade dos animais em perceber estímulos que causam dor em humanos (como pressão mecânica significativa, temperaturas extremas e substâncias químicas nociceptivas) é facilmente demonstrável. Contudo, não é possível medir o componente afetivo emocional negativo promovido por este estímulo, que pode ser descrito como desconforto, sofrimento ou consciência da dor, não sendo, portanto, possível saber como um animal “sente” propriamente a dor. Neste contexto, quando nos referimos à dor animal, não podemos nos ater a definição dada pela IASP (1979), já que esta considera uma experiência difícil de ser avaliada em animais que não podem expressar verbalmente sua sensação. Ainda, no que se refere a dor em animais, a definição proposta por Molony (1997) pode ser mais apropriada, pois considera que: “a dor animal é uma experiência sensorial aversiva, representando a consciência, pelo animal, de dano ou ameaça à integridade dos tecidos. Promove mudanças na fisiologia e comportamento do animal, buscando reduzir ou evitar os danos, a probabilidade de repetição e promover recuperação” (Segner 2012). Sendo assim, as definições de dor animal baseiam-se no que pode ser observado e medido (Sneddon 2009) e a experiência sensorial do animal quando exposto a um estímulo nocivo dependerá do grau de desenvolvimento de seu SNC.

Quando estamos falando de dor em peixes, por exemplo, lidamos com uma forma qualitativamente diferente de experiência, provavelmente mais primitiva e simples (Segner

2012). Nos seres humanos, a dor, o medo e o estresse dependem de funções que são controladas e executadas pelo hipocampo, amígdala, lobos frontais e neocórtex, que são estruturas altamente desenvolvidas. Nos peixes, o telencéfalo, é menos complexo, o que levou muitos a concluir que os mesmos não podem sentir dor, medo ou estresse. Assim, um dos esforços da pesquisa sobre o bem estar dos peixes tem como princípio a avaliação da consciência, que está na base da experiência da dor e do medo. Hoje já existem evidências que os peixes podem sim experimentar estresse e dar respostas comportamentais e neuroendócrinas para lidar com o mesmo (Wendelaar Bonga 1997), e, para algumas espécies, há evidência de que podem ter a capacidade de perceber estímulos dolorosos (*Oncorhynchus mykiss*, Sneddon 2002; *Gadus morhua*, Nilsson et al. 2008; *Carassius auratus*, Nordgreen 2009b; *Oncorhynchus mykiss*, Roques et al. 2010; *Salmo salar*, Bjørge et al. 2011; *Leporinus macrocephalus*, Wolkers et al. 2013).

Já que a nocicepção é um mecanismo sensorial usado para perceber e detectar um estímulo ou dano em potencial nos tecidos, sendo à base da experiência da dor, sua percepção envolve tanto a maquinaria sensorial nociceptiva quanto também a tradução real dos estímulos nocivos para a sensação de dor (Roques et al. 2010; Malafoglia et al. 2013). Dessa forma, os peixes podem possuir um sistema nociceptivo e algumas capacidades cognitivas para experimentar, detectar e conceituar a dor em um sentido “humano” (Roques et al. 2010). E embora a dor disponha de um componente difícil de transmitir sem palavras, um indivíduo não verbal ainda pode senti-la. Nos seres humanos, os métodos que são utilizados para avaliar e quantificar a dor centraliza em habilidades cognitivas e sentimentos subjetivos e em outros mamíferos, os métodos são mais fisiológicos e comportamentais. Porém, poucos desses métodos foram empregados para demonstrar estímulos dolorosos em peixes (Roques et al. 2010).

1.1. Evolução da dor e nocicepção

Os animais possuem três tarefas básicas que são essenciais para a sobrevivência: (1) encontrar recursos (alimentos) para manter sua demanda energética, (2) reproduzir-se com sucesso e (3) evitar e ou minimizar danos corporais graves (Burrell 2017). Os mesmos são suscetíveis a uma variedade de riscos naturais que podem causar danos aos tecidos como objetos pontiagudos, dentes ou mandíbulas de predadores, espinhos defensivos em plantas ou animais, substâncias químicas e extremos térmicos. No entanto, os animais possuem mecanismos que aumentam sua capacidade de manter a integridade de seus tecidos por meio da detecção de estímulos nocivos e ação para fugir deles ou minimizar seus efeitos prejudiciais. A habilidade de um animal em reagir e detectar adequadamente a um estímulo aversivo é de fundamental importância para a sobrevivência, sendo essa capacidade importante tanto para os invertebrados (locomção para longe de estímulos nocivos observados nos animais considerados mais “simples”, incluindo protozoários, platelmintos e águas-vivas) quanto para os vertebrados (Clatworthy 1999; Elwood 2011; Burrell 2017).

A nocicepção fornece, portanto, um meio para se perceber e escapar de um estímulo que pode continuar a causar danos na ausência da ação, existindo, desta forma, claros benefícios na nocicepção. Uma resposta nociceptiva pode ser organizada como um reflexo, mas pode não estar associada a uma memória duradoura e mudança motivacional. A dor, por outro lado, pode induzir uma memória de longo prazo e ser associada à aprendizagem para evitar situações que deram origem à experiência original de dor. Quanto maior o dano tecidual na experiência original, maior a resposta emocional desagradável e maior a motivação para evitá-lo no futuro. Assim, a experiência da dor tem um efeito mais duradouro e protege o animal de danos futuros de uma maneira mais eficaz do que a nocicepção sozinha (Elwood 2011). As habilidades nociceptivas são encontradas na maioria dos principais filos animais e, portanto, é presumivelmente um produto de evolução muito primitiva. Elas claramente

antecederam na "explosão" cambriana, um período de aproximadamente 530 a 550 milhões de anos atrás, durante o qual os principais filos modernos evoluíram. O próximo passo no desenvolvimento da dor provavelmente foi um elo entre a nocicepção (com a resposta reflexa associada) e uma mudança motivacional de longo prazo (com processamento central e memória). Alguns pesquisadores acreditam o surgimento da dor só ocorreu nos vertebrados e que é evidente em peixes e, talvez, na lampreia mais primitiva. Neste contexto, surge o questionamento se a dor teria sido um atributo novo surgido com os vertebrados ou se a capacidade de sentir dor antecedeu a divisão dos vertebrados dos ancestrais de alguns outros filos, podendo, neste caso, estar presente em alguns grupos de invertebrados existentes. Alternativamente a esta teoria e considerando a vantagem em sentir dor, pode ser que ela tenha evoluído em mais de uma ocasião (Elwood 2011).

Estudos entre filos incluindo Chordata, Mollusca, Annelida, Nematoda e Arthropoda revelaram características conservadas e distintas da biologia nociceptiva, incluindo fatores moleculares e mecanismos de sinalização, destacando a utilidade de investigações em vertebrados e invertebrados na descoberta de potenciais mecanismos subjacentes à nocicepção humana à dor (Himmel et al. 2017). As anêmonas-do-mar respondem a estímulos mecânicos e a picadas de outras anêmonas, mas não a estímulos térmicos (Mather 2011), os anelídeos têm nociceptores que respondem ao ácido, à capsaicina e ao calor (embora a sensibilidade ao ácido seja menor do que a observada nos vertebrados; Smith e Lewin 2009). Tanto a presença de nociceptores quanto do comportamento nociceptivo foram descritos em moluscos; por exemplo, o caramujo (*Cepaea nemoralis*) responde a uma placa quente a $> 40^{\circ}\text{C}$ levantando a porção anterior de seu pé (Kavaliers et al. 1983) e na *Aplysia californica*, quando atingido o limiar do estímulo, os nociceptores aumentam o disparo de acordo com o aumento subsequente na intensidade do estímulo e mostram atividade máxima com o esmagamento ou a ruptura dos tecidos (Castellucci et al. 1970; Smith e Lewin 2009). Sistemas nociceptivos

foram também descritos em particular detalhe em um nematoide (*Caenorhabditis elegans*) e na mosca-da-fruta (*Drosophila melanogaster*) (Smith e Lewin 2009; Elwood 2011).

Sendo assim, a nocicepção aparenta ter surgido cedo na escala evolutiva, e a habilidade de responder a um estímulo nocivo pode estar presente em todos os animais (León-Olea 1993). Contudo o grau de mobilização do organismo ao estímulo é variável e também depende da evolução do sistema nervoso, que pode se manifestar como um reflexo guiado pela medula espinal ou por um sistema de glândulas, no caso dos invertebrados, ou por uma experiência emocional, no caso dos humanos. E a dor, se referindo a uma experiência emocional mais complexa, é experimentada pelo SNC, que através da informação nociceptiva forma respostas e sensações que variam em função da diferenciação do sistema em cada espécie, sendo assim, animais que apresentam um SNC mais complexo são, provavelmente, dotadas de componente subjetivo (Hoffmann 2008).

1.2. Peixes no estudo da dor

A sugestão de que os peixes podem perceber a dor e ter a capacidade de sofrer (experimentar estados emocionais ou mentais negativos) desencadeou vários debates no meio científico. Alguns autores argumentam que há evidências de que os peixes possuem os mesmos tipos de receptores especializados que aves e mamíferos permitindo assim a detecção de estímulos nocivos (Ashley et al. 2007; Sneddon 2003c), e que o sistema nervoso e o encéfalo de várias espécies de peixes parecem suficientemente complexos, o que permite concluir que eles teriam a capacidade de sentir medo e sofrimento (Wolkers et al. 2017). Porém outros autores propõem que os peixes são meramente responsivos, reagindo passivamente aos estímulos quando os encontram com pouca ou nenhuma capacidade de cognição ou autoconhecimento (Rose 2002; Rose 2007). Há um interesse crescente em resolver esse debate e em determinar se nossas interações com peixes causam respostas

negativas que geram sofrimento (Braithwaite e Boulcott 2007). Na última década, a pesquisa sobre o bem-estar dos peixes concentrou-se cada vez mais na possibilidade de que o bem estar mental seja uma preocupação legítima, particularmente a questão de saber se os peixes sentem dor e/ou sofrem (Rose et al. 2014).

Quando se estuda dor em animais, uma das principais dificuldades é que não se possui um acesso direto à experiência e seus sentimentos subjetivos. Embora seja possível registrar a sensação de estímulos ambientais, os sentimentos e emoções possivelmente associados à sensação dos estímulos devem ser deduzidos a partir da presença e/ou resposta de indicadores operacionais dos estados emocionais. Tipicamente, os parâmetros que se conectam de forma identificável e definida com a percepção da dor no homem, são utilizados como indicadores e são estudados em animais para inferir, a partir de sua presença ou ausência, a capacidade de percepção da dor (Segner 2012). Descobertas recentes no estudo da dor em animais demonstram potencial para a percepção da dor em uma variedade de espécies totalmente aquáticas, como os moluscos, crustáceos e os peixes. Assim, é possível entender como as pressões ecológicas e a história diferencial de vida de um meio aquoso podem gerar novos dados que informam a fisiologia comparativa e a evolução da dor (Sneddon 2015).

O estudo da nocicepção em peixes é recente na literatura e tem se ampliado devido à necessidade de se compreender a evolução do sistema nociceptivo no filo dos vertebrados, além da possibilidade de se ampliar a gama de modelos biológicos a serem utilizados para o estudo da dor. Há relatos na literatura de estudos utilizando várias espécies diferentes de peixes e testes nociceptivos de todas as categorias (químicos, térmicos, elétricos e mecânicos). Embora nas últimas décadas (com maior frequência após os anos 2000) os estudos acerca da dor e nocicepção tenham sido aplicados a diferentes grupos animais, incluindo os peixes, não existem muitos testes nociceptivos padronizados utilizando estes organismos como modelo biológico, sendo observada uma ampla variedade de testes, em uma

série de diferentes espécies, desenvolvidos por diferentes pesquisadores, o que dificulta a comparação entre resultados e, conseqüentemente, a compreensão dos processos nociceptivos estudados. Assim, a definição de modelos biológicos padronizados a serem aplicados em peixes é essencial para permitir o desenvolvimento da pesquisa neste campo. Neste contexto, o presente estudo objetivou realizar uma revisão bibliográfica sistemática acerca do estado da arte sobre a nocicepção em peixes, visando uma compreensão mais ampla dos conhecimentos obtidos até o momento.

2. METODOLOGIA

Este trabalho foi elaborado a partir de uma revisão bibliográfica sistemática utilizando as bases de dados internacionais *ScienceDirect* (<https://www.sciencedirect.com/>) e *Scopus* (<https://www.scopus.com/>). Foram realizadas buscas sistemáticas utilizando as palavras-chaves “*fish AND nociception*”, em artigos publicados no período de 2000 a 2018, sendo selecionados apenas artigos da categoria *Research article*. Os artigos selecionados na pesquisa foram avaliados a partir da leitura dos resumos e aqueles que não apresentavam relação direta com o tema foram excluídos. O período das pesquisas nas bases de dados se deu entre os dias 4 a 17 de Outubro de 2018.

A partir da análise dos artigos científicos selecionados foram avaliadas as espécies de peixes utilizadas nos estudos de dor e nocicepção e os testes nociceptivos aplicados nestes artigos.

3. RESULTADOS

Somando-se as duas bases de dados (Tabela 1), foram encontrados 199 artigos (49 artigos no *ScienceDirect* e 150 artigos no *Scopus*). Após a leitura dos títulos e resumos, foram selecionados os que tinham relação com o tema e retiraram-se os que não preenchiam os critérios. Foram selecionados 65 artigos que tinham relação com o tema em ambas as bases

(22 artigos no *ScienceDirect* e 43 artigos no *Scopus*), sendo que 20 destes artigos apareceram repetidamente em ambas as bases de dados. Sendo assim, foram utilizados 45 artigos (22 artigos no *ScienceDirect* e 23 artigos no *Scopus*) para a revisão bibliográfica sistemática acerca da nocicepção em peixes.

Tabela 1 – Resultados das buscas nas bases de dados.

Base de Dados	Artigos		
	Total	Aceitos	Iguais
<i>ScienceDirect</i>	49	22	-
<i>Scopus</i>	150	43	20
Total	199	65	45

A partir das análises dos artigos científicos fez-se o levantamento de quais tipos de peixes são mais utilizados para os testes de dor e nocicepção (tabela 2). Nove espécies de peixes foram observadas, sendo elas: *zebrafish* ou paulistinha (*Danio rerio*), que foi o mais utilizado nos trabalhos analisados, estando presente em 15 artigos (31,91%), em seguida, truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) em 14 (29,79%), piaçu (*Leporinus macrocephalus*) e carpa comum (*Cyprinus carpio*) aparecendo em 5 artigos cada, totalizando 10,64%; *goldfish* (*Carassius auratus*), salmão-do-Atlântico (*Salmo salar*) e bacalhau-do-Atlântico (*Gadus morhua*) em 2 cada (4,25%) e tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) e tilápia-de-Moçambique (*Oreochromis mossambicus*) em 1 cada (2,13%).

Tabela 2 - Espécies de peixes utilizadas nos artigos analisados.

ESPÉCIES	Nº de Artigos	%
<i>Zebrafish (D. rerio)</i> ¹	15	31,91
Truta arco-íris (<i>O. mykiss</i>) ³	14	29,79
Piauçu (<i>L. macrocephalus</i>) ²	5	10,64
Carpa comum (<i>C. carpio</i>) ⁵	5	10,64
<i>Goldfish (C. auratus)</i> ⁶	2	4,25
Salmão-do-Atlântico (<i>S. salar</i>) ⁹	2	4,25
Bacalhau-do-Atlântico (<i>G. morhua</i>) ⁷	2	4,25
Tilápia-do-Nilo (<i>O. niloticus</i>) ⁴	1	2,13
Tilápia-de-Moçambique (<i>O. mossambicus</i>) ⁸	1	2,13

COSTA et al, 2018¹; NASCIMENTO et al, 2018¹; BATISTA et al, 2018¹; ELLIS et al, 2018¹; WOLKERS et al, 2017²; LOPEZ-LUNA et al, 2017a¹; LOPEZ-LUNA et al, 2017b¹; LOPEZ-LUNA et al, 2017c¹; LOPEZ-LUNA et al, 2017d¹; TAYLOR et al, 2017¹; CURTRIGHT et al, 2015¹; ECKROTH et al, 2014⁷; LUDVIGSEN et al, 2014⁷; WOLKERS et al, 2015a²; WOLKERS et al, 2015b²; MALAFOGLIA et al, 2014¹; ALVES et al, 2013²; WOLKERS et al, 2013²; METTAM et al, 2012³; ROQUES et al, 2012⁸; CHERVOVA & LAPSHIN, 2011⁵; CORREIA et al, 2011¹; MAXIMINO, 2011¹; BJØRGE et al, 2011⁹; METTAM et al, 2011³; ROQUES et al, 2010^{4,5}; REILLY et al, 2009⁵; ASHLEY et al, 2009³; NORDGREEN et al, 2009a⁶; PROBER et al, 2008¹; REILLY et al, 2008a^{3,5}; REILLY et al, 2008b^{1,3,5}; NEWBY & STEVENS, 2008³; NORDGREEN et al, 2007⁹; ASHLEY et al, 2007³; ASHLEY et al, 2006³; DUNLOP & LAMING, 2005^{3,6}; SNEDDON, 2003a³; SNEDDON et al, 2003b³; SNEDDON, 2003c³; SNEDDON et al, 2003d; SNEDDON, 2002³.

Em relação aos tipos de testes nociceptivos mais aplicados nos artigos analisados (tabela 3), pode-se observar que a maioria dos testes utilizados para o estudo da dor e nocicepção são químicos, sendo utilizados em 32 artigos (71,11%). Em seguida, apareceram os testes utilizando estímulos térmicos, com 10 artigos (22,22%). Testes mecânicos foram utilizados em 6 artigos (13,33%) e os testes menos utilizados foram os que aplicavam estímulos elétricos, observados em 4 artigos (8,89%). Em alguns dos artigos foram aplicados mais de um tipo de teste, assim, os mesmos apareceram em mais de uma categoria, portanto que a soma da porcentagem ultrapassa os 100%.

Tabela 3 – Testes nociceptivos aplicados.

Testes		Total	%
Nociceptivos	Artigos		
Químicos	COSTA et al, 2018; NASCIMENTO et al, 2018; WOLKERS et al, 2017; LOPEZ-LUNA et al, 2017b; WOLKERS et al, 2015a; WOLKERS et al, 2015b; METTAN et al, 2011; REILLY et al, 2009; ASHLEY et al, 2009; REILLY et al, 2008a; REILLY et al, 2008b; NEWBY & STEVENS, 2008; SNEDDON, 2003a; SNEDDON, 2003b; BATISTA et al, 2018; ELLIS et al, 2018; LOPEZ-LUNA et al, 2017d; LOPEZ-LUNA et al, 2017c; TAYLOR et al, 2017; ALVES et al, 2013; WOLKERS et al, 2013; METTAM et al, 2012; CORREIA et al, 2011; MAXIMINO, 2011; BJØRGE et al, 2011; ASHLEY et al, 2007; SNEDDON, 2003c; ECKROTH et al, 2014; PROBER et al, 2008; ASHLEY et al, 2006; SNEDDON et al, 2003d; SNEDDON, 2002.	32	71,11
Térmicos	LOPEZ-LUNA et al, 2017a; NORDGREEN et al, 2009a; CURTRIGHT et al, 2015; MALAFOGLIA et al, 2014; ASHLEY et al, 2007; SNEDDON, 2003c; PROBER et al, 2008; ASHLEY et al, 2006; SNEDDON et al, 2003d; SNEDDON, 2002.	10	22,22
Mecânicos	ROQUES et al, 2010; DUNLOP & LAMING, 2005; ASHLEY et al, 2007; ECKROTH et al, 2014; ASHLEY et al, 2006; SNEDDON, 2002.	6	13,33
Elétricos	LUDVIGSEN et al, 2014; ROQUES et al, 2012; CHERVOVA & LAPSHIN, 2011; NORDGREEN et al, 2007.	4	8,89

Os estudos que utilizavam estímulos químicos foram categorizados de acordo com o tipo de substância química utilizada (Tabela 4). Foi observado que as duas substâncias mais usadas como estímulo químico nocivo para estudos da dor e nocicepção foram o ácido acético, presente em 22 artigos (68,75%) e o formaldeído (8; 25,0%). Em relação aos estudos utilizando o ácido acético como estímulo nocivo, a maior parte dos testes utilizou como metodologia a aplicação subcutânea do mesmo, nos lábios frontais superiores e inferiores dos peixes. Aplicação na linha média, entre as nadadeiras pélvicas e cauda, também foi observada. Já as concentrações da solução de ácido acético utilizadas variaram consideravelmente entre os estudos, sendo observados valores entre 0,01 a 15%.

Com relação aos estudos utilizando o formaldeído, as aplicações nos animais se deram por via intramuscular nos lábios e cauda, ou subcutaneamente na região da nadadeira adiposa, e as concentrações usadas nos artigos foram de 0,1; 1,0 e 3 % de formaldeído. Em alguns dos artigos encontrados os pesquisadores aplicavam mais de um tipo de substância, assim, os mesmos apareceram em mais de uma categoria.

Tabela 4 – Tipos de estímulos nocivos químicos aplicados

Estímulos nocivos	Artigos	Total	%
Ácido acético	COSTA et al, 2018; METTAN et al, 2011; REILLY et al, 2009; ASHLEY et al, 2009; REILLY et al, 2008a; REILLY et al, 2008b; NEWBY & STEVENS , 2008; ASHLEY et al, 2007; SNEDDON , 2003a; SNEDDON , 2003b; SNEDDON , 2003c; ELLIS et al, 2018; LOPEZ-LUNA et al, 2017d; LOPEZ-LUNA et al, 2017c; TAYLOR et al, 2017; ECKROTH et al, 2014; METTAM et al, 2012; CORREIA et al, 2011; MAXIMINO , 2011; ASHLEY et al, 2006; SNEDDON et al, 2003d; SNEDDON , 2002.	22	68,75
Formaldeído	NASCIMENTO et al, 2018; WOLKERS et al, 2017; WOLKERS et al, 2015a; WOLKERS et al, 2015b; ASHLEY et al, 2007; BATISTA et al, 2018; ALVES et al, 2013; WOLKERS et al, 2013.	8	25,0
Cinamaldeído	NASCIMENTO et al, 2018; BATISTA et al, 2018; TAYLOR et al, 2017.	3	9,38
Capsaicina	NASCIMENTO et al, 2018; BATISTA et al, 2018; ECKROTH et al, 2014.	3	9,38
Glutamato	NASCIMENTO et al, 2018; BATISTA et al, 2018.	2	6,25
Salina ácida	NASCIMENTO et al, 2018; BATISTA et al, 2018.	2	6,25
Mentol	BATISTA et al, 2018.	1	3,12
Ácido cítrico	LOPEZ-LUNA et al, 2017c; METTAM et al, 2012.	2	6,25
Histamina	TAYLOR et al, 2017.	1	3,12
Óleo de mostarda	TAYLOR et al, 2017; PROBER et al, 2008.	2	6,25
Complete Freund's adjuvant (CFA)	TAYLOR et al, 2017.	1	3,12
Feromônio de alarme	METTAM et al, 2012.	1	3,12
Cloreto de amônio	METTAM et al, 2012.	1	3,12
Bile	METTAM et al, 2012.	1	3,12
Água mineral	METTAM et al, 2012.	1	3,12

carbonatada			
<i>Citric acid phosphate buffer</i>	METTAM et al, 2012.	1	3,12
<i>CO² water</i>	METTAM et al, 2012.	1	3,12
<i>Freshwater</i>	METTAM et al, 2012.	1	3,12
<i>Soda water</i>	METTAM et al, 2012; LOPEZ-LUNA et al, 2017b.	2	6,25
Bicarbonato de sódio	METTAM et al, 2012.	1	3,12
Cloreto de sódio	METTAM et al, 2012.	1	3,12
Vacina	BJØRGE et al, 2011.	1	3,12
DMSO	PROBER et al, 2008.	1	3,12
Óleo de canela	PROBER et al, 2008.	1	3,12
Disulfeto de dialilo (DADS)	PROBER et al, 2008.	1	3,12
Acroleína	PROBER et al, 2008.	1	3,12
4-HNE	PROBER et al, 2008.	1	3,12

4. DISCUSSÃO

4.1. Modelos utilizados no estudo da dor e nocicepção em peixes

Na revisão bibliográfica sistemática acerca da nocicepção em peixes foi observado que na maior parte das pesquisas o peixe utilizado como modelo biológico foi o *zebrafish* (*D. rerio*), tanto em formas larvais como em formas adultas. Esta espécie, também conhecida como peixe-zebra ou paulistinha no Brasil, tornou-se um organismo modelo popular para

pesquisas biomédicas, principalmente em genética, biologia do desenvolvimento, biomedicina e neurofisiologia (Spence et al. 2008; Sant’Anna 2009; Silveira 2012; Kalueff et al. 2014).

Trata-se de um pequeno teleósteo, pertencente à família de peixes de água doce Cyprinidae. Sua popularidade como modelo biológico na comunidade acadêmica se deve a algumas características que lhe conferem vantagem frente a outros modelos, incluindo o tamanho pequeno (3 a 4 cm), podendo ser mantido facilmente em aquários, o baixo custo de criação, a alta taxa de reprodução (reproduz-se o ano todo), prole numerosa (200 a 300 ovos a cada 2-3 dias; um casal, se mantido em um espaço favorável, pode repetir esse ciclo a cada 5-7 dias) e genoma completamente sequenciado com alta homologia com os mamíferos, incluindo humanos (Spence et al. 2008; Sant’Anna 2009; Silveira 2012; Howe et al. 2013; Kalueff et al. 2014).

No que concerne o estudo da nocicepção, o *D. rerio* possui vários atributos que o tornam um bom modelo, sendo crescentes as evidências que sugerem que o desenvolvimento e a organização de sistemas de processamento nociceptivo periférico e central são semelhantes à de outros vertebrados, como os mamíferos. Além disso, existem estudos demonstrando que tanto adulto quanto a forma larval, apresenta respostas comportamentais a estimulação nociva e também a situações de estresse, medo ou ansiedade (Malafoglia et al. 2013; Curtright et al. 2015; Lopez-Luna et al. 2017c,d).

Apesar da ampla utilização do *D. rerio* em estudos sobre dor e nocicepção aqui evidenciada, observou-se que outras espécies aparecem de maneira significativa nos estudos dessa área, sendo que muitos dos dados hoje disponíveis a respeito do processamento da nocicepção em peixes foram obtidos por meio de estudos em outras espécies, especialmente a *O. mykiss* e o *L. macrocephalus*. Considerando que os peixes compõem o grupo de vertebrados mais numeroso, o uso de diferentes espécies, adaptadas a ambientes diversos, permite uma visão mais ampla no que concerne os processos evolutivos associados à

percepção da dor e nocicepção dentro do grupo dos vertebrados. Entretanto, também impõem uma série de dificuldades no que diz respeito à comparação entre resultados e à definição de modelos experimentais para o estudo da dor que possam ser utilizados em substituição ao uso de mamíferos, tendência observada em outras áreas do conhecimento, como no estudo do câncer, por exemplo (Tat et al. 2013). O uso de espécies endêmicas de determinadas regiões torna a padronização de métodos para o estudo da nocicepção e dor nestas espécies um desafio difícil de transpor. De fato, para a definição de um modelo biológico é essencial que a escolha da espécie de peixe leve em consideração sua disponibilidade em diferentes regiões, para que possa ser utilizada por pesquisadores em todo mundo. Neste contexto, é possível concluir que o *D. rerio* é a espécie que apresenta maior potencial para ser utilizado como modelo biológico na padronização destes testes, considerando as inúmeras vantagens já mencionadas e a facilidade de seu uso ao redor do mundo.

4.2. Testes nociceptivos

Existem vários tipos de testes nociceptivos que permitem o estudo e a avaliação da nocicepção, utilizando uma série de modelos animais. Os testes comportamentais que são utilizados para se estudar a nocicepção (testes nociceptivos), constituem-se de sistemas de “input-output”, entrada (estímulo aplicado pelo cientista) e a saída (a reação do animal). Portanto, para descrever esse tipo de teste, primeiro é necessário compreender a natureza do estímulo (químico, mecânico, térmico ou elétrico) e depois descrever os parâmetros comportamentais que serão utilizados. Os estímulos em humanos e nos animais, para os estudos dos mecanismos da dor exigem que os mesmos sejam apropriados para provocar a sensação (Le Bars et al. 2001). Mudanças comportamentais que indicam uma função protetora em resposta a um evento potencialmente doloroso são indicadores importantes de um componente afetivo negativo associado a uma experiência sensorial (Sneddon 2009).

O presente estudo indicou que estímulos químicos são os mais utilizados para o estudo da nocicepção em peixes, sendo os testes que utilizam substâncias como a formalina e o ácido acético os mais comuns. O teste da formalina é um método de avaliação comportamental associado à lesão tecidual, no qual se quantifica a resposta comportamental desencadeada pela injeção de formalina (Le Bars et al. 2001; Silva et al. 2013). Este teste foi, inicialmente, desenvolvido para o estudo da nocicepção em roedores por Dubuisson e Dennis em 1977, sendo, mais recentemente, padronizado para o estudo da nocicepção e dor em peixes por Alves e colaboradores (2013) e Wolkers e colaboradores (2013). Estudos demonstram que, quando expostos a este estímulo químico nocivo, os peixes demonstram uma ampla variedade de respostas comportamentais e fisiológicas. As respostas comportamentais à formalina podem ser divididas em duas etapas, uma fase inicial aguda (primeira fase) e por um período mais longo (segunda fase) de atividade comportamental aumentada, que pode durar até cerca de uma hora. O período entre as fases é dito como intervalo de quiescência (Dubuisson e Dennis 1977, Martins et al. 2006; Silva et al. 2013). A primeira fase (neurogênica ou aguda) inicia-se imediatamente após a injeção da formalina e se estende pelos primeiros 5 minutos (3-5 min). A segunda fase (inflamatória) começa cerca de 15-20 minutos depois da injeção da formalina e dura de 20-40 min (Hunskar e Hole 1987, Silva et al. 2013; Magalhães et al. 2017). A aplicação de injeções subcutâneas de formaldeído a 3% na região da nadadeira adiposa de *L. macrocephalus* promove um aumento significativo da frequência respiratória do animal e da atividade locomotora, que é expressa pelo aumento da distância percorrida e pela velocidade de nado dos peixes associada a um padrão irregular de nado principalmente nos 5 primeiros minutos depois da injeção, o que pode ser um indicativo de nocicepção (Wolkers et al. 2013; Alves et al. 2013; Wolkers et al. 2015a; Wolkers et al. 2015b; Wolkers et al. 2017). Os resultados apresentados por estes estudos evidenciam, portanto, a resposta aguda à injeção subcutânea de formalina (neurogênica), não tendo sido analisada a existência de uma segunda

fase de resposta (inflamatória) que está presente em mamíferos submetidos ao mesmo teste. Outro estudo aplicando este teste por meio da injeção intramuscular de solução de formalina 0,1% na cauda ou lábios do *D. rerio* observou-se a presença de uma resposta comportamental caracterizada pela redução da atividade locomotora (Magalhães et al. 2017).

O uso do ácido acético como estímulo nocivo também é baseado em estudos com mamíferos. Entretanto, neste grupo de animais, o teste do ácido acético, desenvolvido por Vander Wende e Margolin, em 1956, é utilizado, principalmente, em testes que avaliam contorções abdominais após a injeção intraperitoneal, simulando um quadro de dor visceral. Um correlato deste teste foi aplicado por Costa e colaboradores (2018), em *D. rerio*, onde a aplicação intraperitoneal deste ácido diminuiu a locomoção, aumentou o comportamento de congelamento e induziu um fenótipo característico de constrição abdominal (medido como índice de curvatura do corpo), análogo à resposta de contorções em roedores. Entretanto, outros estudos em peixes utilizaram o ácido acético em injeções subcutâneas, teste raramente utilizado em estudos com mamíferos. *O. mykiss* quando injetadas com ácido acético subcutaneamente nos lábios tiveram taxas de ventilação significativamente mais altas e redução no tempo gasto ativo, além de demorarem mais tempo para retornar a alimentação (Mettam et al. 2011). Em *C. carpio*, *D. rerio* e *O. mykiss*, Reilly e colaboradores (2008b) investigaram a resposta comportamental e respiratória ao ácido acético e demonstraram que embora não tenham sido observadas diferenças na resposta comportamental ou na taxa de ventilação da carpa, comportamentos anormais de balançar de um lado para o outro e fricção dos lábios contra as paredes do tanque foram observados em *O. mykiss*. Em contraste, o *D. rerio* apresentou uma redução significativa na frequência de natação e um aumento na taxa de ventilação, que foi semelhante aos resultados obtidos da *O. mykiss*, não apresentando qualquer comportamento anômalo. De fato, os comportamentos anômalos descritos em *O. mykiss* em resposta a injeção subcutânea de ácido acético não foram observadas em nenhuma

outra espécie de peixe submetidas a testes nociceptivos químicos, evidenciando, mais uma vez, a natureza espécie-específica destas respostas. Estes comportamentos anômalos observados em *O. mykiss* foram descritos, pela primeira vez, por Sneddon (2003a). De acordo com os resultados deste estudo, a injeção de ácido acético nos lábios induz a realização de comportamentos atípicos, como o “*rubbing*”, que consiste no animal esfregando o lábio (onde a substância foi injetada) na parede do aquário e o “*rocking*”, em que o animal fica se movimentando de um lado a outro raspando a região da injeção no cascalho. Entretanto, estudo realizado com a mesma espécie por outros pesquisadores falhou em demonstrar a realização destes comportamentos, demonstrando, apenas, a perda de equilíbrio e o aumento da frequência respiratória em resposta à injeção de ácido acético nos lábios (Newby e Stevens 2008).

Dentre estes estudos utilizando substâncias químicas como estímulo nocivo, foi observada uma ampla variação nas concentrações aplicadas, tanto para o ácido acético (0,01 a 15%), quanto para o formaldeído (1 a 5%), sendo que as respostas comportamentais desencadeadas por estes estímulos também diferiram em função desta variação. Foram observados respostas de constrição abdominal (2,5 e 5%), redução de atividade locomotora (0,5 - 5,0%) e comportamento de congelamento (5,0%) (Costa et al. 2018) após injeção intraperitoneal de ácido acético. Já a injeção subcutânea dos lábios promoveu aumento na taxa de batimentos operculares e diminuição da locomoção (5,0%) (Reilly et al. 2008b), além de comportamentos atípicos como o *rubbing* e *rocking* (0,1%) (Sneddon 2003a). Em larvas, a colocação de ácido na água promoveu redução (0,1 e 0,25%) ou aumento de atividade (0,01%) dependendo da concentração aplicada (Lopez-Luna et al. 2017c). Já nos testes utilizando formaldeído, foi observado aumento da atividade locomotora e taxa de batimentos operculares (3%) (Alves et al. 2013; Wolkers et al. 2013) após injeção subcutânea na nadadeira e redução na atividade locomotora (0,1%) após injeção subcutânea na nadadeira e

lábios (Magalhães et al. 2017). Esta ampla variedade de respostas comportamentais evidencia que os comportamentos nociceptivos em peixes variam de acordo com a substância química, concentração e local de injeção utilizados.

Embora menos utilizados, os estímulos mecânicos aparecem em estudos de dor e nocicepção em peixes. Em *O. niloticus*, que tiveram a nadadeira caudal cortada (*tailfin clipping*) houve um aumento na atividade natatória do animal, associado a um gasto maior do tempo nas partes iluminadas do aquário, liberação de muco pelas células das brânquias e alterações nos transportadores de íons da membrana das brânquias (Roques et al. 2010). Em outro estudo feito por Eckroth e colaboradores (2014) um anzol foi colocado na boca do *G. morhua*, sendo que o único efeito observado foi breves movimentos de sacudida lateral da cabeça. Entretanto, as respostas desencadeadas por este estímulo são de difícil interpretação, já que as alterações observadas podem estar associadas à presença do anzol e/ou clipe, que é detectada pelo peixe e induz uma mudança de comportamento, possivelmente buscando se livrar dele sem, contudo, estar diretamente relacionado à nocicepção.

Estímulos térmicos também foram descritos em estudos de dor e nocicepção em peixes, especialmente utilizando animais em estado larval. Estudo com *D. rerio* indicam que tanto o frio quanto o calor excessivos estimulam um aumento da atividade locomotora (Prober et al. 2008). Entretanto, devido à natureza aquática do habitat dos peixes, estímulos térmicos são mais difíceis de ser aplicados, o que pode explicar a pequena quantidade de estudos utilizando esta categoria de estímulo. Além disso, por se tratarem de organismos ectotérmicos, estímulos térmicos podem promover alterações comportamentais associadas a mudanças na taxa metabólica dos animais, dificultando a interpretação dos resultados.

Mamíferos podem demonstrar respostas comportamentais muito diferentes à dor entre espécies (Flecknell et al. 2007; Sneddon 2015) e estas respostas específicas da espécie foram mostradas em peixes (Sneddon 2015). Foram observadas respostas locomotoras como o

aumento da atividade natatória em resposta à injeção subcutânea de formalina em *L. macrocephalus* e em *O. niloticus* que tiveram a aplicação de um *tailfin clipping* na nadadeira caudal (Roques et al. 2010; Alves et al. 2013). Em contraste, *T. mossambicus* submetida a choque elétrico, *S. salar* experimentando peritonite abdominal devido à vacinação e *D. rerio* recebendo nos lábios a administração de várias substâncias algógenas (histamina, cinamaldeído, óleo de mostarda, ácido acético e *complete Freund's adjuvant*) apresentaram diminuição na natação (Bjørge et al. 2011; Roques et al. 2012, Taylor et al. 2017). Esta ampla variedade de respostas, dependente tanto do estímulo quanto da espécie e da concentração utilizada, evidenciam a necessidade de padronização dos testes e modelos experimentais para o estudo da dor e nocicepção em peixes.

4.3. Evidências da presença de Nociceptores

A presença de terminações nervosas livres na pele de peixes, semelhantes aos nociceptores, foi descrita pela primeira vez na década de 1970 (Whitear 1971). Porém, a primeira evidência funcional relacionada à presença de nociceptores em peixes só foi demonstrada recentemente no início dos anos 2000. A análise estrutural da nadadeira caudal de *Cyprinus carpio* indicou a presença de axônios do tipo A- δ e do tipo C, que são típicos para a transmissão de sinais nociceptivos em vertebrados (mais derivados). Na nadadeira caudal, foram encontrados feixes nervosos, tanto no segmento da lepidotriquia quanto no tecido mole (hipoderme) entre os raios da nadadeira, sendo os nervos distribuídos simetricamente. Análises morfométricas revelaram quatro categorias de fibras, três tipos de fibras A mielinizadas e um tipo de fibra C não mielinizada. Fibras em cinco nervos foram analisadas quanto ao diâmetro para pontuá-los como C e A- δ , A- β e tipo A- α (Roques et al. 2010).

No estudo anatômico e morfológico do nervo trigêmeo de *O. mykiss*, os registros eletrofisiológicos da atividade evocada do gânglio confirmaram a presença de fibras A- β que

foram mais comuns, seguidas pelas fibras A- δ , fibras A- α e fibras C, sendo o menor número de fibras encontradas. Nos vertebrados superiores, as fibras A- δ e C no nervo trigêmeo transmitem informações cerebrais e somatossensoriais ao cérebro. Fibras C foram encontradas em todos os três ramos do nervo trigêmeo e foram encontradas em feixes discretos frequentemente associados à célula de *Schwann*, compreendendo, aproximadamente, 4% do total dos tipos de fibras (nos mamíferos elas compreendem aproximadamente 50% das fibras), fibras A- β foram as mais comuns (53%) seguidas pelas fibras A- δ (33%) e A- α (9%). O número reduzido de fibras C nos peixes em relação aos mamíferos pode ser explicado evolutivamente pela transição do ambiente de vida aquático para o terrestre. Já que os vertebrados terrestres possuem um maior risco de injúrias devido à força da gravidade, variações de temperatura, gases e substâncias nocivas e no ambiente aquático essas mudanças não ocorrem em grandes variações (Sneddon 2002; Sneddon 2004).

Sneddon (2003c) examinou também o nervo trigêmeo de *O. mykiss* para determinar que tipos de receptores somatossensoriais estavam presentes na cabeça da truta, principalmente nociceptores. No estudo, cinco tipos diferentes de receptores foram encontrados, sendo eles, receptores de adaptação rápida e receptores de adaptação lenta, que respondem a estímulos mecânicos; nociceptores polimodais que respondem a estimulação térmica, química e mecânica; nociceptores mecanotérmicos que respondem à estimulação mecânica e ao calor nocivo; e receptores mecanoquímicos responsivos à estimulação mecânica e química. Registros eletrofisiológicos de nervos trigêmeos identificaram nociceptores polimodais na cabeça de *O. mykiss* com propriedades fisiológicas semelhantes às descritas em vertebrados superiores. Estes receptores responderam à pressão mecânica, temperaturas na faixa nociva (mais de 40 °C) e ácido acético 1% (Sneddon et al. 2003d), trazendo evidências da presença de nociceptores em peixes teleósteos.

4.4. Evidências de analgesia farmacológica

As pesquisas recentes sugerem que os peixes são capazes de nociceção ou por possuírem nociceptores que podem detectar estímulos potencialmente nocivos, muito semelhantes aos encontrados em mamíferos, além de demonstrar respostas comportamentais e fisiológicas adversas a um evento, embora haja poucos estudos avaliando o uso de analgesia para reduzir estas respostas.

As principais classes de fármacos analgésicos são os opioides, drogas anti-inflamatórias não esteroides (NSAID), anestésicos locais e drogas diversas que têm propriedades para aliviar a dor (por exemplo, antidepressivos) (Sneddon 2012). Drogas opioides produzem analgesia agindo nos três receptores opioides (μ , δ e K) localizados nas membranas celulares neuronais. A ação pré-sináptica dos opioides inibe a liberação de neurotransmissores, bloqueando não apenas a atividade dos nociceptores, mas também a transmissão central (Sneddon 2012), sendo a morfina o principal fármaco desta categoria. Foi demonstrado que a administração de morfina em *O. mykiss* reduz os efeitos de um estímulo nocivo potencialmente doloroso (injeção de ácido acético nos lábios); como resultado, as trutas submetidas ao estímulo nocivo não apresentaram suspensão da alimentação, além de não apresentarem respostas ventilatórias e comportamentos anômalos, sugerindo que a morfina pode agir como um analgésico na truta arco-íris (Sneddon 2003a; Sneddon 2012). Em *D. rerio* a aplicação da morfina também preveniu alterações induzidas pela aplicação intraperitoneal de ácido acético 5,0% no índice de curvatura corporal (Costa et al. 2018). Em *C. auratus*, a morfina não demonstrou ter um efeito analgésico no limiar térmico e no comportamento, mas, curiosamente, neutralizou e melhorou as alterações adversas subsequentes no comportamento do peixe no tanque (Nordgreen et al. 2009a). Mettam e colaboradores (2011) testaram a eficácia de três tipos de drogas analgésicas na redução da dor em *O. mykiss* sendo uma delas a buprenorfina (um opioide), contudo, a mesma teve impacto

limitado na resposta do peixe ao estímulo doloroso. Nenhum das doses de buprenorfina teve efeito positivo sobre o reinício da alimentação e no geral, o tratamento com essa substância mostrou ações analgésicas ou antinociceptivas mínimas.

Os anti-inflamatórios não esteroides (NSAID) constituem uma classe de fármacos que atuam inibindo enzimas ciclooxigenase (COX) para reduzir a produção de tromboxanos e prostaglandinas, fornecendo propriedades anti-inflamatórias, antipiréticas e analgésicas. Poucos NSAID foram avaliados em relação à analgesia em peixes (Sneddon 2012). Costa e colaboradores (2018) testaram o potencial antinociceptivo do diclofenaco (um NSAID) no *D. rerio* após a administração de ácido acético 5,0%, obtendo como resultado redução na curvatura abdominal anormal após a administração do estímulo nocivo. O carprofeno foi investigado em *O. mykiss* e os peixes voltaram a alimentar-se mais rapidamente que os peixes sem analgesia. No entanto, quando uma dose de 5,0 mg. kg⁻¹ de carprofeno foi administrada em *O. mykiss*, os peixes demonstraram depressão na atividade, podendo este ser um efeito colateral deletério da medicação (Mettam et al. 2011).

Agentes anestésicos locais inibem a propagação de potenciais de ação, bloqueando os canais de sódio e afetando a função da membrana. Assim, os anestésicos locais impedem a sensação de dor ao bloquear a transmissão nociceptiva (Sneddon 2012). A lidocaína, um anestésico local, em *O. mykiss* mostrou reduzir os indicadores de dor medidos no estudo (Mettam et al. 2011). Em outro estudo utilizando larvas com cinco dias pós-fertilização de *D. rerio* expostas a uma preparação contendo CO₂ (10% água gaseificada, 7.53 mmol/l CO₂) foi observada redução significativa na atividade locomotora larval, sendo que a administração de lidocaína melhorou o impacto potencialmente nocivo da água gaseificada (Lopez-Luna et al. 2017b).

Recentemente, estudos utilizando extratos extraídos de plantas com potencial analgésico utilizaram o *D. rerio* como modelo biológico, visando substituir o uso de roedores

para este tipo de teste. Nascimento e colaboradores (2018) avaliaram o efeito antinociceptivo orofacial do Kaempferol-3-O-rutinosídeo (KR) um composto flavonóide isolado da planta *Ouratea fieldingiana* que demonstrou atividades analgésica e anti-inflamatória no *D. rerio* adulto. O KR inibiu a nocicepção induzida com 0,1% de formalina, glutamato, capsaicina, cinamaldeído e solução salina ácida, sendo o efeito antinociceptivo semelhante ao da morfina. Batista e colaboradores (2018) analisaram a atividade antinociceptiva do extrato etanólico de *Azadirachta indica* A. Juss (Neem, Meliaceae) em *D. rerio* adulto. EtFrNeem foi testado para nocicepção aguda e inflamação abdominal, atividade locomotora e toxicidade nos peixes, reduzindo significativamente o comportamento nociceptivo induzido por formalina, glutamato e solução salina ácida, quando comparado ao grupo controle. Esses efeitos do EtFrNeem foram significativamente semelhantes aos da morfina, usados como controle positivo. Os resultados positivos obtidos nestes estudos demonstram o potencial do uso do *D. rerio* em substituição a modelos roedores no estudo de novas drogas com potencial analgésico na indústria farmacêutica.

4.5. Evidências de analgesia endógena

Um importante mecanismo utilizado pelos animais em situações de emergência é a redução endógena da capacidade de perceber a dor (Menescal-de-Oliveira e Hoffmann 1993). Em situações de confronto agonístico, em que é imprescindível a mobilização de mecanismos de defesa, dominância ou da adaptação a circunstâncias extremas e ameaçadoras detectadas no ambiente, o recrutamento de um sistema capaz de modular ou suprimir a dor pode ser necessário (Freitas 2005). Esse sistema, denominado analgésico endógeno, é de suma importância, uma vez que inibe reações comportamentais recuperativas que seguem a percepção da dor que poderiam ser extremamente desvantajosas para a sobrevivência do

indivíduo em casos de confronto agonístico ou de confronto entre presas e predadores (Wolkers 2014).

Em um ambiente natural ou em condições experimentais, o sistema analgésico endógeno pode ser ativado por diferentes formas de estresse como a presença de um predador natural, ou mesmo o odor de um coespecífico, restrição física e alimentar, rotação, desidratação, isolamento, conflito social, choque elétrico, natação forçada, estímulo auditivo intenso, dentre outros (Rodgers e Randall 1987). Assim, o sistema analgésico endógeno pode ser mobilizado em situações de estresse, medo ou durante confrontos onde há risco de injúrias para o animal.

Situações de estresse ativam sistemas neurais que inibem a nocicepção. Essa resposta adaptativa, conhecida como antinocicepção induzida por estresse, depende do recrutamento de sistemas neuroquímicos do cérebro, incluindo mecanismos opioides e não opioides (Butler e Finn 2009). Apesar do sistema antinociceptivo induzido por estresse ser bem conhecido nos mamíferos, o conhecimento em peixes ainda é limitado (Wolkers et al. 2015b). Estudos recentes tem demonstrado que diferentes tipos de estressores externos, como subordinação social (Ashley et al. 2009), substância de alarme coespecífica (Alves et al. 2013) e estresse de restrição (Wolkers et al. 2013), podem promover a inibição da resposta nociceptiva em peixes, sugerindo a ativação de um sistema endógeno antinociceptivo (Wolkers et al. 2015b).

Em estudo feito por Ashley e colaboradores (2009), *O. mykiss* submetidas à subordinação social apresentaram diminuição da resposta nociceptiva, o que pode indicar a ativação do sistema analgésico endógeno desencadeado pelo estresse da subordinação. Em *L. macrocephalus* submetidos à presença de substância de alarme de coespecíficos, foi observada inibição da resposta motora à aplicação de um estímulo nocivo, sendo esta inibição bloqueada pelo pré-tratamento com naloxona, que é um antagonista não seletivo de receptores opioides, demonstrando assim, que a analgesia endógena de origem opioide pode ter sido

induzida pelo estresse causado pela presença da substância de alarme (Alves et al. 2013). Em outro estudo com *L. macrocephalus*, também se observou que a resposta comportamental ao formaldeído foi inibida pela restrição prévia do animal, o que sugere que um efeito antinociceptivo é induzido por este estressor (Wolkers et al. 2013; Wolkers et al. 2015b). Foi observado, ainda, que este efeito antinociceptivo pode ser mediado por receptores opioides e canabinóides já que a aplicação prévia de naloxona (Wolkers et al. 2013) e AM251 (um antagonista seletivo de receptor canabinóide tipo I (CB1)) bloqueou a antinocicepção induzida pelo estresse (Wolkers et al. 2015b). A demonstração da existência de um sistema analgésico endógeno em vertebrados basais lançaram novas perspectivas no que se refere à evolução da dor e nocicepção no subfilo sugerindo que a experiência negativa associada ao estímulo nocivo pode ter surgido cedo na escala evolutiva.

4.6. Substratos neurais da nocicepção e analgesia

Vários estudos recentes mostraram que os peixes respondem fisiologicamente a muitos tipos de estímulos nocivos (Sneddon 2003a; Newby e Stevens 2008; Reilly et al. 2008b; Roques et al. 2010; Wolkers et al. 2013; Wolkers et al. 2015b). Entretanto, o conhecimento sobre antinocicepção e seus substratos neurais e neuroquímicos ainda são incipientes (Wolkers et al. 2017). A possibilidade dos peixes sentirem dor foi negada com base na ausência de substratos neurais para apoiar essa “experiência”. Com isso, a identificação de regiões cerebrais envolvidas na modulação da nocicepção pode fornecer informações importantes sobre o processamento da informação nociceptiva em peixes (Wolkers et al. 2015). Em relação à anatomia do encéfalo dos peixes, os mesmos não possuem uma estrutura neocortical e o córtex é mais primitivo se comparado ao dos mamíferos, levando assim, muitos pesquisadores a alegar a ocorrência de respostas nociceptivas, mas a rejeitar a ocorrência da percepção da dor. Contudo, apesar da ausência de estruturas neocorticais, o

telencéfalo dos peixes possui estruturas que são consideradas homólogas à amígdala e hipocampo dos mamíferos (Portavella et al. 2002; Portavella et al. 2004). Como tal, estas estruturas são potencialmente capazes de modular respostas defensivas (Rose 2002; Arlinghaus et al. 2007; Rose 2007; Rose et al. 2014; Wolkers et al. 2017).

De fato, devido às dificuldades metodológicas da aplicação de drogas em regiões específicas do encéfalo de peixes, poucos estudos se dedicaram a avaliar o papel de regiões encefálicas no processamento da nocicepção nestes animais, sendo a região do telencéfalo dorsomedial (Dm) a única estudada. O (Dm) tem sido considerado uma região palial homóloga a amígdala dos mamíferos, sendo demonstrado o seu envolvimento na modulação da nocicepção nos peixes. No estudo feito por Wolkers e colaboradores (2015) foi testada a participação do receptor GABA_A-benzodiazepínico no telencéfalo dorsomedial na antinocicepção induzida pela restrição em *L. macrocephalus* através da microinjeção do ansiolítico midazolam. A microinjeção de midazolam no Dm não alterou a resposta nociceptiva, no entanto, essa droga bloqueou antinocicepção induzida pelo estresse de restrição. Esse efeito pode refletir a ação específica do midazolam sobre os receptores benzodiazepínicos no telencéfalo dorsomedial, já que o pré-tratamento com o flumazenil, um antagonista de receptores benzodiazepínicos, inibiu os efeitos dessa droga.

Em outro estudo também feito por Wolkers e colaboradores (2017) foi avaliada a participação do sistema canabinoide do telencéfalo Dm na modulação da nocicepção, utilizando também *L. macrocephalus*. O estudo mostrou que a microinjeção do canabidiol no telencéfalo Dm inibe a resposta comportamental nociceptiva à injeção subcutânea de formaldeído a 3%, e esta antinocicepção é bloqueada pelo tratamento prévio com a microinjeção do AM251. Além disso, a microinjeção de AM251 no Dm antes do estresse de restrição também bloqueia a antinocicepção induzida pelo estresse, demonstrando, assim, que a ativação do sistema canabinóide no Dm via receptores CB1, inibe as respostas

comportamentais à estimulação nociva. Estes resultados reforçam a hipótese de que esta estrutura telencefálica palial tem um papel fundamental na modulação da nocicepção em peixes.

Apesar da demonstração do envolvimento do Dm na modulação da nocicepção, outras regiões ainda não investigadas podem ter um papel importante neste processamento. Em estudo avaliando os efeitos da estimulação nociva sobre a expressão gênica em *C. carpio*, Reilly e colaboradores (2009) demonstraram que o gene *vangl2*, que codifica uma proteína altamente conservada na evolução, foi expresso em todas as regiões do cérebro após a estimulação nociva, particularmente nos neurônios do telencéfalo e nas células endodimárias, sendo, também detectada a expressão em estruturas do mesencéfalo, que são conhecidas por estarem envolvidas no processamento da dor em mamíferos. A expressão constitutiva do *vangl2* também foi detectada no tálamo, que é uma importante estação de informação nociceptiva nos mamíferos e no hipotálamo, que coordena a resposta endócrina à nocicepção. O padrão de expressão do *vangl2* no encéfalo da carpa foi parecido com de algumas proteínas que estão envolvidas na nocicepção. Proteínas como o neuropeptídeo Y, o receptor CB1 e o receptor-opiáceo δ , que modulam a sinalização nociceptiva, são todos altamente expressos no telencéfalo de peixes Cyprinidae e salmonídeos, indicando que o telencéfalo pode estar envolvido no processamento nociceptivo em peixes (Dickenson et al. 1987; Hua et al. 1991; Park e Moon 2002; Doyon et al. 2003; Kelly et al. 2003; Dunlop e Laming 2005; Lam et al. 2006; Leite-Almeida et al. 2006; Reilly et al. 2009).

Um dos critérios apresentado quando se avalia a nocicepção e o potencial para a percepção da dor em animais é que deve haver uma via de nociceptores na periferia para regiões cerebrais superiores (Dunstan et al. 1991; Bateson 1992). Esta via pode ser avaliada a partir da avaliação da atividade elétrica no encéfalo após a estimulação dos nervos sensoriais periféricos, que é registrada como um potencial evocado somatossensitivo (SPE). E os SPEs

evocados por estimulação nociva são uma ferramenta importante na pesquisa sobre nocicepção e dor e podem ser utilizados para investigar a resposta do cérebro à estimulação nociva (Abdulla et al. 1989; Kakigi et al. 2000; Kakigi et al. 2005). Nordgreen e colaboradores (2007) investigaram se uma estimulação galvânica na base da cauda de *S. salar* provocaria um SPE no telencéfalo, já que o telencéfalo é central no aprendizado e na memória, e a atividade aqui pode ser um pré-requisito para o processamento de estímulos externos em um nível cognitivo ou emocional. No estudo, um eletrodo de registro foi inserido no telencéfalo do peixe e o mesmo recebeu estímulos de quatro intensidades (2, 5, 10 e 20 mA), tendo como resultado, que um estímulo galvânico transcutâneo aplicado na base da cauda provocou um potencial evocado somato-sensitivo na parte dorsal do hemisfério telencefálico contralateral no *S. salar*. Outro estudo feito por Ludvigsen e colaboradores (2014) também mostrou que quando aplicado estimulação elétrica (estímulos 2, 5, 10 e 20 mA) cutânea na cauda de *G. morhua*, houve a provocação de SEPs no sistema nervoso central do animal. Estes estudos evidenciam um papel importante do telencéfalo no processamento de informações nociceptivas, com especial importância do Dm, região homóloga a amígdala, sugerindo que este sistema de processamento sensorial se assemelha ao observado em mamíferos. Entretanto, novos estudos são necessários para se determinar as vias neurais relacionadas ao processamento destas informações e os substratos neurais associados às respostas comportamentais e fisiológicas desencadeadas pelo estímulo nocivo, além da origem das vias descendentes de controle da nocicepção estimuladas por situações de estresse já evidenciadas na literatura.

5. CONCLUSÃO

Os conhecimentos a respeito da dor e nocicepção em peixes se ampliaram significativamente na última década, por meio de estudos utilizando uma ampla gama de

espécies e testes nociceptivos de diversas categorias, contribuindo para a compreensão dos processos nociceptivos dentro deste grupo e do surgimento da sensibilidade à dor no subfilo dos vertebrados. Entretanto, para o uso dos peixes como modelo biológico em complementação e substituição aos modelos mamíferos no estudo da dor é necessário o desenvolvimento de modelos experimentais padronizados, utilizando espécies de ampla distribuição mundial e testes nociceptivos passíveis de reprodução em diferentes laboratórios.

6. REFERÊNCIAS

Abdulla F, Aneja IS, Bhargava KP (1989) Effect on morphine on far Field somatosensory evoked potentials in the rat. *Neuropharmacology* 28: 69–73

Alves FB, Junior AB, Hoffmann A (2013) Antinociception in piauçu fish induced by exposure to the conspecific alarm substance. *Physiol Behav* 110–111: 58–62

Alves JEO, Silveira MD, Vieira EMP, Vidal LWM (2017) Mecanismos fisiopatológicos da nocicepção e bases da analgesia Perioperatória em pequenos animais. *Acta Biomed Bras* 8: 56-68

Arlinghaus R, Cooke SJ, Schwab A, Cowx IG (2007) Fish welfare: a challenge to the feelings-based approach, with implications to recreational fisheries. *Fish Fish* 8: 57-71

Ashley PJ, Sneddon LU, McCrohan CR (2006) Properties of corneal receptors in a teleost fish. *Neurosci Lett* 410: 165–168

Ashley PJ, Sneddon LU, McCrohan CR (2007) Nociception in fish: stimulus–response properties of receptors on the head of trout *Oncorhynchus mykiss*. *Brain Res* 1166: 47–54

Ashley PJ, Ringrose S, Edwards KL, Wallington E, McCrohan CR, Sneddon LU (2009) Effect of noxious stimulation upon antipredator responses and dominance status in rainbow trout. *Anim Behav* 77: 403–410

Basbaum AI, Jessell T (2000) The Perception of Pain. In: Kandel ER, Schwartz J, Jessell T, editors. *Principles of Neuroscience*, New York: Appleton and Lange, pp 472–491

- Batista FLA, Lima LMG, Abrante IA et al (2018) Antinociceptive activity of ethanolic extract of *Azadirachta indica* A. Juss (Neem, Meliaceae) fruit through opioid, glutamatergic and acid-sensitive ion pathways in adult Zebrafish (*Danio rerio*). Biomed Pharmacother 108: 408–416
- Bateson P (1992) Do animals feel pain?. New Sci 134: 30–33
- Bjørge MH, Nordgreen J, Janczak AM, Poppe T, Ranheim B, Horsberg TE (2011) Behavioural changes following intraperitoneal vaccination in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Appl Anim Behav Sc 133: 127–135
- Braithwaite VA, Boulcott P (2007) Pain perception, aversion and fear in fish. Dis Aquat Org 75: 131–138
- Burrell BD (2017) Comparative biology of pain: What invertebrates can tell us about how nociception works. J Neurophysiol 117: 1461–1473
- Butler RK, Finn DP (2009) Stress-induced analgesia. Prog Neurobiol 88: 184–202
- Castellucci V, Pinsker H, Kupfermann I, Kandel ER (1970) Neuronal mechanisms of habituation and dishabituation of the gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. Science 167: 1745–1748
- Chandroo KP, Yue S, Moccia RD (2004) An evaluation of current perspectives on consciousness and pain in fishes. Fish Fish 5: 281–295
- Chervova LS, Lapshin DN (2011) Behavioral Control of the Efficiency of Pharmacological Anesthesia in Fish. J Ichthyol 51: 1126–1132
- Clatworthy AL (1999) Evolutionary perspectives of cytokines in pain. In: Watkins LR, Maier SF (eds) Cytokines and Pain. Progress in Inflammation Research, Birkhäuser, Basel, pp 21–38
- Costa FV, Rosa LV, Quadros VA, Santos ARS, Kalueff AV, Rosemberg DB (2018) Understanding nociception-related phenotypes in adult Zebrafish: behavioral and pharmacological characterization using the acetic acid model. Behav Brain Res. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.10.009>

Correia AD, Cunha SR, Scholze M, Stevens ED (2011) A Novel Behavioral Fish Model of Nociception for Testing Analgesics. *Pharmaceuticals* 4: 665-680

Curtright A, Rosser M, Goh S, Keown B, Wagner E, Sharifi J, Raible DW, Dhaka A (2015) Modeling Nociception in Zebrafish: A Way Forward for Unbiased Analgesic Discovery. *Plos One* 10: e0116766

Dennis SG, Melzack R (1983) Perspective on phylogenetic evolution of pain expression. In: *Animal Pain: Perception and Alleviation* (Kitchell RL, Erickson HH, Carstens E and Davis LE eds), American Physiological Society, Bethesda, Maryland, pp 151–160

Dickenson AH, Sullivan AF, Knox R, Zajac JM, Roques BP (1987) Opioid receptor subtypes in the rat spinal cord: electrophysiological studies with mu-and delta-opioid receptor agonists in the control of nociception. *Brain Res* 413: 36–44

Doyon C, Gilmour KM, Trudeau VL, Moon TW (2003) Corticotropin-releasing factor and neuropeptide Y mRNA levels are elevated in the preoptic area of socially subordinate rainbow trout. *Gen Comp Endocrinol* 133: 260–271

Dubin AE, Patapoutian A (2010) Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J Clin Invest* 120: 3760-3772

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* 4: 161–174

Dunlop R, Laming P (2005) Mechanoreceptive and Nociceptive Responses in the Central Nervous System of Goldfish (*Carassius auratus*) and Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Pain* 6: 561-568

Dunstan GR, Aldridge WN, Balls M, Bateson P, Bisset GW, Byrne P, Cromie BW, Dworkin G, Ewbank R, Frey RG, Harrison FA, Hollands C, Johnson ES, Morton DB, Purchase IFH, Tavernor D, Boyd KM, Smith JA (1991) *Lives in the balance. The ethics of using animals in biomedical research.* Oxford University Press, Oxford

Eckroth JR, Aas- Hansen Ø, Sneddon LU, Bichão H, Døving KB (2014) Physiological and Behavioural Responses to Noxious Stimuli in the Atlantic Cod (*Gadus morhua*). *Plos One* 9: e100150

Ellis LD, Berrue F, Morash M, Achenbach JC, Hill J, McDougall (2018) Comparison of cannabinoids with known analgesics using a novel high throughput Zebrafish larval model of nociception. *Behav Brain Res* 337: 151–159

Elwood RW (2011) Pain and Suffering in invertebrates?. *ILAR J* 52: 175-184

Flecknell P, Gledhill J, Richardson C (2007) Assessing animal health and welfare and recognising pain and distress. *Altex-Alter Tierexp* 24: 82-83

Freitas RL (2005) Estudo farmacológico e neuroanatômico das interconexões entre estrutura mesencefálicas e núcleos monoaminérgicos envolvidos no controle da dor: participação do núcleo dorsal da rafe e de receptores serotoarminérgicos na analgesia pós-ictal. Tese, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- USP

Himmel NJ, Patel AA, Cox DN (2017) Invertebrate Nociception. *Oxford Research Encyclopedia of Neuroscience*, Oxford University Press. <http://neuroscience.oxfordre.com/view/10.1093/acrefore/9780190264086.001.0001/acrefore-9780190264086-e-166>. Acessado 22 outubro 2018

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

Howe K, Clark MD, Torroja CF et al (2013) The Zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496: 498-503

Hua XY, Boublik JH, Spicer MA, Rivier JE, Brown MR, Yaksh TL (1991) The antinociceptive effects of spinally administered neuropeptide Y in the rat: systematic studies on structure–activity relationship. *J Pharmacol Exp Ther* 258: 243–248

Hunskar S, Hole K (1987) The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 30: 103–14

IASP (International Association for the Study of Pain) (1979) Pain terms: a list with definitions and notes on usage. *Pain* 6: 249-252

Julius D, Basbaum AL (2001) Molecular mechanisms of Nociception. *Nature* 413: 203-210

Kakigi R, Watanabe S, Yamasaki H (2000) Pain-related somatosensory evoked potentials. *J Clin Neurophysiol* 17: 295–308

Kakigi R, Inui K, Tamura Y (2005) Electrophysiological studies on human pain perception. *Clin Neurophysiol* 116:743–763

Kalueff AV, Stewart AD, Gerlai R (2014) Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. *Trends Pharmacol Sci* 35: 63-75

Kavaliers M, Hirst M, Tesky GC (1983) A functional role for an opiate system in snail thermal behaviour. *Science* 330: 99-103

Kelly S, Jhaveri MD, Sagar DR, Kendall DA, Chapman V (2003) Activation of Peripheral cannabinoid CB1 receptors inhibits mechanically evoked responses of spinal neurons in noninflamed rats and rats with hindpaw inflammation. *Eur J Neurosci* 18: 2239–2243

Lam CS, Rastegar S, Strahle U (2006) Distribution of cannabinoid receptor 1 in the CNS of zebrafish. *Neuroscience* 138: 83–95

Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW (2001) Animal Model of Nociception. *Pharmacol Rev* 53: 597–652

Leite-Almeida H, Valle-Fernandes A, Almeida A (2006) Brain projections from the medullary dorsal reticular nucleus: an anterograde and retrograde tracing study in the rat. *Neuroscience* 140: 577–595

Léon-Olea M (1993) Los péptidos opioides y la filogenia de la nocicepción. *Ciencias* 31:33-38

Lopez-Luna J, Al-Jubouri Q, Al- Nuaimy W, Sneddon LU (2017a) Impact of analgesic drugs on the behavioural responses of larval Zebrafish to potentially noxious temperatures. *Appl Anim Behav Sci* 188: 97–105

Lopez-Luna J, Canty MN, Al-Jubouri Q, Al- Nuaimy W, Sneddon LU (2017b) Behavioural responses of fish larvae modulated by analgesic drugs after a stress exposure. *Appl Anim Behav Sci* 195: 115–120

Lopez-Luna J, Al-Jubouri Q, Al- Nuaimy W, Sneddon LU (2017c) Reduction in activity by noxious chemical stimulation is ameliorated by immersion in analgesic drugs in zebrafish. *J Exp Biol* 220: 1451-1458

Lopez-Luna J, Al-Jubouri Q, Al- Nuaimy W, Sneddon LU (2017d) Impact of stress, fear and anxiety on the nociceptive responses of larval Zebrafish. *Plos One* 12: e0181010

Ludvigsen S, Stenklev NC, Johnsen HK, Laukli E, Matre D, Aas-Hansen Ø (2014) Evoked potentials in the Atlantic cod following putatively innocuous and putatively noxious electrical stimulation: a minimally invasive approach. *Fish Physiol Biochem* 40: 173–181

Magalhães FEA, Souza CAPB et al (2017) Adult Zebrafish (*Danio rerio*): An Alternative Behavioral Model of Formalin-Induced Nociception. *Zebrafish* 14: 422-429

Malafoglia V, Bryant B, Raffaelli W, Giordano A, Bellipanni G (2013) The Zebrafish as a Model for Nociception Studies. *J Cell Physiol* 228: 1956–1966

Malafoglia V, Colasanti M, Raffaelli W, Balciunas D, Giordano A, Bellipanni G (2014) Extreme Thermal Noxious Stimuli Induce Pain Responses in Zebrafish Larvae. *J Cell Physiol* 229: 300–308

Martins MA, de Castro Bastos L, Tonussi CR (2006) Formalin Injection Into Knee Joints of rats: Pharmacologic Characterization of a Deep Somatic Nociceptive Model. *J Pain* 7: 100-107

Mather JA (2011) Philosophical background of attitudes toward and treatment of invertebrates. *ILAR J* 52: 205-212

Maximino C (2011) Modulation of nociceptive-like behavior in zebrafish (*Danio rerio*) by environmental stressors. *Psychol Neurosci* 4: 149–155

Menescal-de-Oliveira L, Hoffmann A (1993) The parabrachial region as a possible region modulating simultaneously pain and tonic immobility. *Behav Brain Res* 56: 127-132

Mettam JJ, Oulton LJ, McCrohan CR, Sneddon LU (2011) The efficacy of three types of analgesic drugs in reducing pain in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Appl Anim Behav Sci* 133: 265–274

Mettam JJ, McCrohan CR, Sneddon LU (2012) Characterisation of chemosensory trigemial receptors in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: responses to chemical irritants and carbon dioxide. *J Exp Biol* 215: 685-693

Molony V (1997) Comments on Anand and Craig (Letter to the editor). *Pain* 70: 293

Nascimento JET, Morais SM, Lisboa DS et al (2018) The orofacial antinociception effect of Kaempferol-3-O-rutinoside, isolated from the plant *Ouratea fieldingiana*, on adult Zebrafish (*Danio rerio*). *Biomed & Pharmacother* 107: 1030–1036

Newby NC, Stevens ED (2008) The effects of the acetic acid “pain” test on feeding, swimming, and respiratory responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Appl Anim Behav Sci* 114: 260–269

Nilsson J, Kristiansen TS, Fosseidengen JE, Fernö A, Van den Bos R (2008) Learning in cod (*Gadus morhua*): long trace interval retention. *Anim Cogn* 11: 215–22

Nordgreen J, Horsberg TE, Ranheim B, Chen ACN (2007) somatosensory evoked potentials in the telencephalon of Atlantic salmon (*Salmo salar*) following galvanic stimulation of the tail. *J Comp Physiol A* 193: 1235–1242

Nordgreen J, Garner JP, Janczak AM, Ranheim B, Muir WM, Horsberg TE (2009a) Thermonociception in fish: Effects of two different doses of morphine on thermal threshold and post-test behaviour in goldfish (*Carassius auratus*). *Appl Anim Behav Sci* 119: 101–107

Nordgreen J (2009b) Nociception and pain in teleost fish. PhD thesis, Norwegian School of Veterinary Science

Park M, Moon RT (2002) The planar cell-polarity gene *stbm* regulates cell behaviour and cell fate in vertebrate embryos. *Nat Cell Biol* 4: 20–25

Portavella M, Vargas JP, Torres B, Salas C (2002) The effects of telencephalic pallial lesions on spatial, temporal, and emotional learning in goldfish. *Brain Res Bull* 57: 397-399

Portavella M, Torres B, Salas C (2004) Avoidance response in goldfish: emotional and temporal involvement of medial and lateral telencephalic *pallium*. *J Neurosci* 24: 2335-2342

Prober DA, Zimmerman S, Myers BR et al (2008) Zebrafish TRPA1 Channels Are Required for Chemosensation But Not for Thermosensation or Mechanosensory Hair Cell Function. *J Neurosci* 28: 10102–10110

Reilly SC, Quinn JP, Cossins AR, Sneddon LU (2008a) Novel candidate genes identified in the brain during nociception in common carp (*Cyprinus carpio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Neurosci Lett* 437: 135–138

Reilly SC, Quinn JP, Cossins AR, Sneddon LU (2008b) Behavioural analysis of a nociceptive event in fish: Comparisons between three species demonstrate specific responses. *Appl Anim Behav Sci* 114: 248–259

Reilly SC, Kipar A, Hughes DJ, Quinn JP, Cossins AR, Sneddon LU (2009) Investigation of Van Gogh-like 2 mRNA regulation and localisation in response to nociception in the brain of adult common carp (*Cyprinus carpio*). *Neurosci Lett* 465: 290–294

Rodgers RJ, Randall JL (1987) Defensive analgesia in rats and mices. *Psychol Res* 57: 335-347

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* 101: 533-540

Roques JAC, Abbink W, Chereau G et al (2012) Physiological and Behavioral responses to na electrical stimulus in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Fish Physiol Biochem* 38: 1019–1028

Rose JD (2002) The neurobehavioral nature of fishes and the question of awareness and pain. *Rev Fish Sci* 10: 1-38

Rose JD (2007) Anthropomorphism and mental welfare of fishes. *Dis Aquat Organ* 75: 139-154

Rose JD, Arlinghaus R, Cooke SJ, Diggles BK, Sawynok W, Stevens ED, Wynne CDL (2014) Can fish really feel pain? *Fish Fish* 15: 97-133

Sant'Anna MCR (2009) Zebrafish (*Danio rerio*) como modelo para estudo da toxicidade induzida pelo ferro. Dissertação, Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Segner H (2012) Fish Nociception and Pain: A Biological Perspective. Beiträge zur Ethik und Biotechnologie, Band 9

Sherrington CS (1910) Flexion-reflex of the limb, crossed extension-reflex and reflex stepping and standing. J Physiol (Lond) 40: 28–121

Silva JC, Saraiva SRGL, Júnior RGO, Almeida JRGS (2013) Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão. Rev Bras Farm 94: 18-23

Silveira TR, Schneider AC, Hammes TO (2012) *Zebrafish*: modelo consagrado para estudos de doenças humanas. Cienc Cult São Paulo 64: 4-5

Smith ES, Lewin GR (2009) Nociceptors: A phylogenetic view. J Comp Physiol A 195: 1089-1106

Sneddon LU (2002) Anatomical and electrophysiological analysis of the trigeminal nerve in a teleost fish, *Oncorhynchus mykiss*. Neurosci Lett 319: 167–171

Sneddon LU (2003a) The evidence for pain in fish: the use of morphine as an analgesic. Appl Anim Behav Sci 83: 153–162

Sneddon LU, Braithwaite VA, Gentle MJ (2003b) Novel Object Test: Examining Nociception and Fear in the Rainbow Trout. J Pain 4: 431-440

Sneddon LU (2003c) Trigeminal somatosensory innervation of the head of a teleost fish with particular reference to nociception. Brain Res 972: 44–52

Sneddon LU, Braithwaite VA, Gentle MJ (2003d) Do fishes have nociceptors? Evidence for the evolution of a vertebrate sensory system. Proc R Soc Lond B 270: 1115–1121

Sneddon LU (2004) Evolution of nociception in vertebrates: comparative analysis of lower vertebrates. Brain Res Rev 46: 123-130

Sneddon LU (2009) Pain Perception in Fish: Indicators and Endpoints. ILAR J 50: 338-342

Sneddon LU (2012) Clinical Anesthesia and Analgesia in Fish. J Exo Pet Med 21: 32–43

Sneddon LU (2015) Pain in aquatic animals. J Ex Biol 218: 967-976

- Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C (2008) The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. Biol Rev 83: 13–34
- Steeds CE (2013) The anatomy and physiology of the pain. Surgery 31: 49-53
- Tat J, Liu M, Wen XY (2013) Zebrafish cancer and metastasis models for *in vivo* drug discovery. Drug Discov Today: Technol 10 (1): e83-e-89
- Taylor JC, Dewberry LS, Totsch SK, Yessick LR, DeBerry JJ, Watts SA, Sorge RE (2017) A novel zebrafish-based model of nociception. Physiol Behav 174: 83–88
- Tracey WD Jr (2017) Primer Nociception. Curr Biol 27: 129-133
- Vander Wende C, Margolin S (1956). Analgesic tests based upon experimentally induced acute abdominal pain in rats. Fedn Proc 15: 494
- Vitor AO, Ponte EL et al (2008) Psicofisiologia da dor: uma revisão bibliográfica. R Eletr de Com Inf Inov Saúde 2: 87-96
- Wendelaar Bonga SE (1997) The Stress Response in Fish. Physiol Rev 77: 591-625
- Whitew M (1971) The free nerve endings in fish epidermis. J Zoo (London) 63: 231-236
- Wolkers CPB, Junior AB, Menescal-de-Oliveira L, Hoffmann A (2013) Stress-Induced Antinociception in Fish Reversed by Naloxone. Plos One 8: e71175
- Wolkers CPB (2014) Antinocicepção induzida pelo estresse de restrição no *peixe Leporinus macrocephalus*. Tese, Faculdade de Medicina de Ribeirão
- Wolkers CPB, Junior AB, Menescal-de-Oliveira L, Hoffmann A (2015a) GABA_A-benzodiazepine receptors in the dorsomedial (Dm) telencephalon modulate restraint-induced antinociception in the fish *Leporinus macrocephalus*. Physiol Behav 147: 175–182
- Wolkers CPB, Junior AB, Menescal-de-Oliveira L, Hoffmann A (2015b) Acute administration of a cannabinoid CB1 receptor antagonist impairs stress-induced antinociception in fish. Physiol Behav 142: 37–41

Wolkers CPB, Menescal-de-Oliveira L, Hoffmann A (2017) Cannabinoid system of dorsomedial telencephalon modulates behavioral responses to noxious stimulation in the fish *Leporinus macrocephalus*. *Physiol Behav* 179: 504–509

7. ANEXOS

Normas da Revista *Fish Physiology and Biochemistry*.



Fish Physiology and Biochemistry

Editor-in-Chief: Patrick Kestemont

ISSN: 0920-1742 (print version)

ISSN: 1573-5168 (electronic version)

Journal no. 10695



\$99.00 Personal Rate e-only for the Americas

[Get Subscription](#)

Online subscription, valid from January through December of current calendar year

Immediate access to this year's issues via SpringerLink

1 Volume(-s) with 6 issue(-s) per annual subscription

Automatic annual renewal

More information: >> [FAQs](#) // >> [Policy](#)

[ANNIVERSARY](#) [ABOUT THIS JOURNAL](#) [EDITORIAL BOARD](#) [ETHICS AND DISCLOSURES](#)
[INSTRUCTIONS FOR AUTHORS](#)

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* 341:325-329

• Article by DOI

Sifka 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)

TABLES

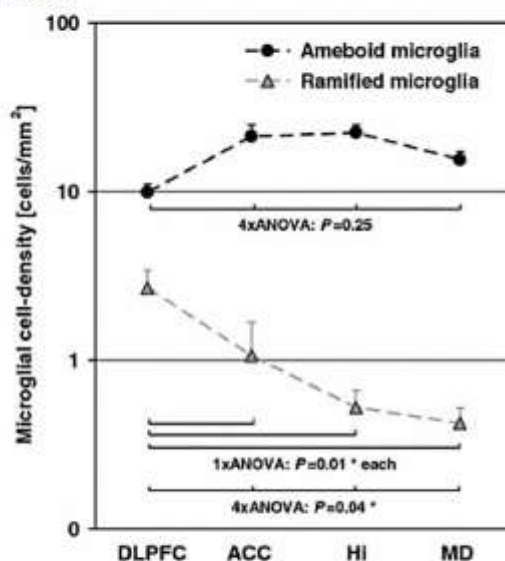
- * All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- * Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- * For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- * Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- * Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

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

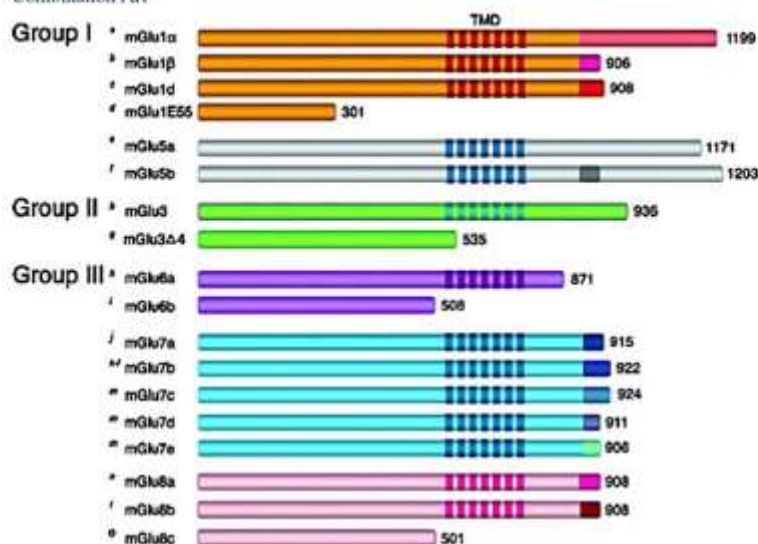
Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

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