

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ**  
**CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E**  
**ENGENHARIA DE PESCA**

**MARIA CECÍLIA DE LIMA RORIG**

Propofol, morfina e metadona como moduladores da dor em lambaris  
submetidos a estímulo nociceptivo

Toledo  
2022

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

de Lima Rorig, Maria Cecília

Propofol, morfina e metadona como moduladores da dor em lambaris submetidos a estímulo nociceptivo / Maria Cecília de Lima Rorig; orientador Robie Allan Bombardelli; coorientador Marcos Ferrante. -- Toledo, 2022.

57 p.

Tese (Doutorado Campus de Toledo) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais, 2022.

1. anestesiologia. 2. farmacologia. 3. bem-estar animal. 4. analgesia. I. Bombardelli, Robie Allan, orient. II. Ferrante, Marcos, coorient. III. Título.

**MARIA CECÍLIA DE LIMA RORIG**

Propofol, morfina e metadona como moduladores da dor em lambaris  
submetidos a estímulo nociceptivo

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Área de concentração: Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Orientador: Prof. Dr. Robie Allan Bombardelli

Toledo

2022

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**MARIA CECÍLIA DE LIMA RORIG**

Propofol, morfina e metadona como moduladores da dor em lambaris  
submetidos a estímulo nociceptivo

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, avaliado pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

---

Prof. Dr. Robie Allan Bombardelli  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

---

Prof. Dr. Gilmar Baumgartner  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Thaís Souto Bignotto  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

---

Prof. Dra. Camila Bizarro  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná

---

Prof. Dra. Vanessa Yuri de Lima  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Aprovada em:  
Local de defesa:

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos os animais  
usados na experimentação.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a Nossa Senhora Aparecida por me guiarem sempre pelo melhor caminho.

À minha família pelo apoio, paciência e compreensão neste período em que muitas vezes não pude lhes dar a atenção necessária.

Agradeço aos meus colegas da pós-graduação pelo auxílio na execução do experimento.

Ao meu orientador pela oportunidade, pela paciência e pelas contribuições sempre muito bem-vindas.

Agradeço à banca pela disponibilidade e pelas grandes contribuições.

Aos meus amigos da Pontifícia Universidade Católica do Paraná pelo apoio de sempre.

Agradeço aos animais que participaram deste experimento.

# Propofol, morfina e metadona como moduladores da dor em lambaris submetidos a estímulo nociceptivo

## RESUMO

Nas últimas décadas, as informações sobre dor e nocicepção em peixes se intensificaram por meio de pesquisas envolvendo testes nociceptivos com diferentes espécies, contribuindo para a compreensão dos processos envolvendo a pesquisa da existência da dor. O lambari (*Astyanax lacustris*) tem sido utilizado como modelo experimental em diferentes áreas de pesquisa e atualmente, os estímulos químicos são os mais empregados para o estudo da nocicepção em peixes. Dentre os fármacos analgésicos, sabe-se que os opioides são os mais indicados para o tratamento de dor moderada a severa de curta duração e durante eventos dolorosos agudos. Além disso, a modificação da resposta a estímulos nocivos por analgésicos é um dos critérios usados para fundamentar a capacidade de percepção de dor pelos animais. Assim, o presente estudo testou três diferentes concentrações de propofol (2mg/Litro; 5 mg/Litro e 10 mg/Litro) e avaliou as alterações fisiológicas e comportamentais em lambaris (*Astyanax lacustris*) submetidos à injeção de ácido acético na boca para identificar comportamentos relacionados à dor. Também avaliou os efeitos da morfina e da metadona, sob diferentes doses (5, 10, 25, 50 e 100 mg/Kg) nos peixes com e sem estímulo doloroso. Como resultados a concentração de 5 mg/litro de propofol demonstrou características relevantes como ação e recuperação rápidas, segurança e menor ocorrência de hiperatividade nos animais testados. A injeção de ácido acético evidenciou alterações fisiológicas e comportamentais como aumento da frequência respiratória, ausência de comportamento alimentar, hiperatividade, lesões no local da injeção entre outros. Já as doses testadas de morfina (10 e 25 mg/Kg) metadona (10 e 25 mg/Kg) mostram-se seguras e capazes de modular alterações fisiológicas e comportamentais relacionadas à dor em peixes. No entanto, mais pesquisas são necessárias para a investigação de protocolos de analgesia, uma vez que há importante variação nas respostas comportamentais e fisiológicas em diferentes pesquisas que avaliaram o controle da dor nestes animais.

**Palavras-chave:** Senciência; Peixes; Nocicepção; Modelo experimental; Anestesia.

# Propofol, morphine and methadone as pain modulators in lambaris submitted to a nociceptive stimulus

## ***ABSTRACT***

In the decades, as recent investigations into different and nociceptive processes have intensified through research into non-scientific research, research to investigate the existence of different processes. The lambari (*Astyanax lacustris*) has been used as an experimental model in different areas of research and currently, chemical stimuli are the most used for the study of nociception in fish. Among the observed opioids, it is known that opioids are more indicated for the treatment of moderate pain to several acute events and during the acute duration. Furthermore, the possibility of a noxious stimulus for fundamental responses is one of the criteria used for the animals' ability to perceive. Thus, the present tested three behavioral changes of propofol (2mg/Liter; 5 mg/Liter and 10 mg/Liter) and the logical change in lambaris (*Astyanax lacustris*) studies to identify behavioral and acetic differences in the mouth related to pain. It also evaluated the effects of morphine and methadone at different doses (5, 10, 25, 50 and 100 mg/kg) in fish with and without stimulation. As a concentration of 5 mg/liter of relevant results properties such as fast safety, lower occurrence of hyperactivity and action in the animals tested. Acetic acid injection showed physical and behavioral changes such as increased breathing, lack of eating behavior, hyperactivity at the injection site, among others. The tested doses of morphine (10 and 25 mg/Kg) and methadone (10 and 25 mg/Kg) are shown to be safe and capable of modulating physiological and behavioral changes to pain in fish. However, more research is found to investigate protocols, since there are different behavioral and physiological responses in researches that evaluate pain control in animals.

**Keywords:** Sentience; Fishes; Nociception; Experimental model; Anesthesia.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Etapas da experimentação para a avaliação dos efeitos do propofol, morfina e metadona em lambaris submetidos a estímulo nociceptivo.....	15
<b>Figura 2</b> - Variável avaliada para identificação de comportamentos relacionados a dor em lambaris submetidos a estímulo nocivo: Posição na coluna de água do aquário (1 - repousando no fundo, 2 - localizado no terço inferior, 3 - localizado no terço médio, 4 - localizado no terço superior).....	19
<b>Figura 3</b> - Delineamento experimental do ensaio 4 para a avaliação dos efeitos do propofol, morfina e metadona em lambaris submetidos a estímulo nociceptivo. ....	21
<b>Figura 4</b> - Tempo de indução anestésica para o tratamento com o propofol em lambaris ( <i>A. lacustris</i> ). ....	24
<b>Figura 5</b> - Tempo de recuperação anestésica para o tratamento com o propofol em lambaris ( <i>A. lacustris</i> ). ....	25
<b>Figura 6</b> - Avaliação da diferença entre os resultados obtidos em 4 diferentes tempos para o parâmetro de batimentos operculares/ minuto para os tratamentos com ácido acético, solução fisiológica e grupo controle em lambaris. (A - primeiro minuto, B - 5 minutos, C - 15 minutos, D - 30 minutos).....	27
<b>Figura 7</b> - Avaliação da diferença entre os resultados obtidos em 4 diferentes tempos para o parâmetro de movimentos da nadadeira peitoral/minuto para os tratamentos com ácido acético, solução fisiológica e grupo controle em lambaris. (A - primeiro minuto, B - 5 minutos, C - 15 minutos, D - 30 minutos). ....	28
<b>Figura 8</b> - 1 – Posição no fundo (menor nível de bem-estar). 2 -Pairando ou nadando na coluna de água (maior nível de bem-estar). Adaptado de Saraiva et al., 2021. ....	29
<b>Figura 9</b> - Lesões teciduais causadas pelo ácido acético (seta amarela) (A - mudança de coloração na região da aplicação; B - protrusão do globo ocular esquerdo; C - opacidade de córnea). ....	31
<b>Figura 10</b> - Resultados obtidos da variável localização na coluna de água no ensaio 3, para os tratamentos com 5 doses crescentes de metadona (5, 10, 25, 50 e 100 mg/Kg) e o grupo controle (0 mg/Kg). ....	33
<b>Figura 11</b> - Resultados obtidos da variável localização na coluna de água no ensaio 3, para os tratamentos com 5 doses crescentes de morfina (5, 10, 25, 50 e 100 mg/Kg) e o grupo controle (0 mg/Kg). ....	35

**Figura 12** - Resultados obtidos para a variável atividade natatória em um minuto ( morfina).

..... **Erro! Indicador não definido.**

**Figura 13** - Mudanças na coloração observada nos lambaris testados. A- Hiperemia e mudança na coloração da pele (escurecimento da pele) nos peixes que receberam injeção de ácido acético.

B- Coloração da pele clara observada nos demais grupos.....42

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Estágios da anestesia em peixes. ....	16
<b>Tabela 2</b> - Variáveis avaliadas para identificação de comportamentos relacionados a dor em lambaris submetidos a estímulo nocivo.....	18
<b>Tabela 3</b> - Resultados obtidos para as variáveis avaliadas em lambaris submetidos a três diferentes concentrações do propofol a 1%.....	25
<b>Tabela 4</b> - Avaliação da diferença entre os resultados obtidos em 4 diferentes tempos para o parâmetro de localização na coluna de água para os tratamentos com ácido acético, solução fisiológica e grupo controle em lambaris (posição 1, 2, 3 e 4).....	29
<b>Tabela 5</b> - Avaliação da diferença entre os resultados obtidos em 4 diferentes tempos para todos os parâmetros avaliados nos tratamentos com ácido acético, solução fisiológica e grupo controle em lambaris. ....	30
<b>Tabela 6</b> - Resultados obtidos no ensaio 3 para a avaliação das variáveis nos tratamentos com 5 doses crescentes de metadona (5, 10, 25, 50 e 100 mg/Kg) e o grupo controle (0 mg/Kg). .	32
<b>Tabela 7</b> - Resultados obtidos no ensaio 3 para a avaliação das variáveis nos tratamentos com 5 doses crescentes de morfina (5, 10, 25, 50 e 100 mg/Kg) e o grupo controle (0 mg/Kg).....	34
<b>Tabela 8</b> - Resultados obtidos no ensaio com 5 doses crescentes de morfina e metadona em lambaris, referente ao comportamento alimentar, mortalidade, comportamentos anômalos e ocorrência de efeitos adversos.....	36
<b>Tabela 9</b> - Resultados obtidos das variáveis avaliadas nos tratamentos do ensaio 4, com duas diferentes doses de morfina e de metadona. ....	39
<b>Tabela 10</b> - Resultados obtidos no ensaio 4, com duas diferentes doses de morfina e metadona em lambaris, referente ao comportamento alimentar, mortalidade, comportamentos anômalos, ocorrência de efeitos adversos e de outros efeitos observados.....	40

## SUMÁRIO

<b>1 Introdução .....</b>	<b>10</b>
<b>2 Objetivos.....</b>	<b>13</b>
<b>3 Material e Métodos.....</b>	<b>14</b>
3.1 Local de estudo e origem dos peixes .....	14
3.2 Instalações, preparo e manejo dos animais.....	14
3.3 Ensaio 1 – Determinação da dose-resposta da concentração do propofol em lambaris ( <i>A. lacustris</i> ).....	15
3.4 Ensaio 2 - Determinação do modelo de dor aguda em lambaris ( <i>A. lacustris</i> ) .....	17
3.5 Ensaio 3 – Determinação da dose-resposta da morfina e da metadona em lambaris ( <i>A. lacustris</i> ).....	19
3.6 Ensaio 4 – Avaliação dos efeitos do propofol, morfina e metadona em lambaris ( <i>A. lacustris</i> ) submetidos a estímulo nociceptivo.....	20
<b>4 Análise Estatística.....</b>	<b>23</b>
<b>5 Resultados e Discussão .....</b>	<b>24</b>
5.1 Ensaio 1 – Determinação da dose-resposta da concentração do propofol em lambaris ( <i>A. lacustris</i> ) .....	24
5.2 Ensaio 2 - Determinação do modelo de dor aguda em lambaris ( <i>A. lacustris</i> ) .....	26
5.3 Ensaio 3 – Determinação da dose-resposta da morfina e da metadona em lambaris ( <i>A. lacustris</i> ) .....	32
5.4 Ensaio 4 – Avaliação dos efeitos do propofol, morfina e metadona em lambaris ( <i>A. lacustris</i> ) submetidos a estímulo nociceptivo.....	38
<b>6 Conclusão .....</b>	<b>43</b>
<b>Referências .....</b>	<b>44</b>

## 1 Introdução

Nas últimas décadas, as informações sobre dor e nocicepção em peixes se intensificaram por meio de pesquisas envolvendo testes nociceptivos com diferentes espécies, contribuindo para a compreensão dos processos envolvendo a pesquisa da existência da dor dentro deste grupo (Almeida, 2018; Chatigny, 2019; Roques et al., 2012).

Tanto na aquicultura quanto nas pesquisas, diferentes procedimentos considerados invasivos como coleta de sangue, marcação de barbatanas, testes toxicológicos, manejo reprodutivo e procedimentos cirúrgicos são rotineiramente realizados em peixes (Braithwaite & Ebbesson, 2014; Wolkers & Hoffmann, 2014; Nordgreen et al., 2009). Recomenda-se que peixes submetidos a procedimentos que causem lesão tecidual devem receber tratamento humanitário pelo uso de anestésicos e analgésicos com o objetivo de reduzir o estresse, a dor e o desconforto (Sneddon, 2009a; Ross, L. & Ross, B., 2008). Da mesma forma, Pedrazani et al. (2007) inferem que tanto na experimentação quanto na criação de peixes, procedimentos considerados invasivos devem ser realizadas de modo a não causar dor ou qualquer sofrimento visando respeitar questões éticas relacionadas ao sofrimento.

A utilização de peixes como modelo experimental em pesquisas médicas tem como objetivo buscar modelos experimentais mais simples, porém com perfil farmacológico e genético semelhante aos dos seres humanos, fato que impulsiona a busca por protocolos de analgesia em peixes (Harms & Lewbart, 2011; MacRae & Peterson, 2015). O lambari (*Astyanax lacustris*) tem sido utilizado como modelo experimental em diferentes áreas de pesquisa e apresenta algumas características marcantes para uso em laboratório, como fácil manejo, alta prolificidade, facilidade de adaptação a alimentação comercial, além de alcançar rapidamente a fase adulta e a maturidade sexual (Gomes, 2015; Yasui et al., 2015).

O debate sobre sentiência em peixes se fortaleceu a partir do momento em que foram identificados nociceptores em peixes teleósteos (Iwama, 2007; Sneddon, 2002, 2003, 2009a). Sneddon (2003) concluiu que os nociceptores dos peixes possuem características muito semelhantes aos nociceptores encontrados nos vertebrados superiores, respondendo a estímulos mecânicos, térmicos e químicos. Além disso, pesquisadores também encontraram receptores opióides presentes no cérebro de peixes (Alvarez et al., 2006; Harms et al., 2005).

Smith & Boyd (1991) criaram um conjunto de critérios que devem ser cumpridos para estabelecer uma analogia da percepção da dor em animais em relação aos seres humanos, e concluíram que somente os mamíferos cumprem todos os critérios listados (Oliveira & Galhardo, 2007). No entanto, Sneddon, Braithwaite & Gentle (2003) e Sneddon (2003)

realizaram estudos posteriores com peixes teleósteos e constataram a existência de três destes critérios. Além disso, Bateson (1991) afirma que a modificação da resposta a estímulos nocivos por analgésicos é um dos critérios usados para fundamentar a capacidade de percepção de dor pelos animais.

Os peixes teleósteos apresentam alterações comportamentais e sinais de desconforto diante da submissão a procedimentos potencialmente dolorosos (Marques et al., 2021). Reilly et al. (2008) sugerem a existência de diferenças específicas tanto comportamentais quanto fisiológicas entre diferentes espécies de peixes frente a estímulos potencialmente dolorosos.

Os ~~estímulos~~ estímulos químicos tem sido bastante empregados para o estudo da nocicepção em peixes, sendo as pesquisas que utilizam substâncias como a formalina e o ácido acético as mais comumente realizadas (Almeida, 2018). A injeção de ácido acético estimula os nociceptores locais e tem sido usada para pesquisas que envolvem a nocicepção em peixes (Baker et al., 2013; Newby et al., 2007; Sneddon, 2003).

Dentre os fármacos analgésicos, sabe-se que os opioides são os mais indicados para o tratamento de dor moderada a severa de curta duração e durante eventos dolorosos agudos (IASP, 2018). O uso da morfina foi validado como analgésico efetivo em alguns peixes teleósteos, porém a validação de outros opioides é primordial para demonstrar que são seguros para uso em peixes e para determinar a dosagem eficaz, principalmente quando houver injúria tecidual (Sneddon, 2009b). A metadona é um opioide sintético agonista dos receptores  $\mu$ , com potência e farmacocinética semelhantes às da morfina (Lumb & Jones, 2017). Em uma pesquisa realizada por Crivelaro et al. (2019) com tilápias do Nilo submetidas à remoção do ápice cardíaco por vídeo cirurgia, testou-se a metadona como analgésico, porém os autores observaram apenas efeito sedativo do fármaco e concluíram que mais pesquisas são necessárias para melhor determinação da dose analgésica efetiva em peixes.

Dentre os anestésicos disponíveis para uso em peixes, o propofol foi definido como um agente hipnótico e sedativo agonista do receptor GABA, além de inibir o receptor N-metil-Daspartato (NMDA), mecanismo pelo qual também pode contribuir para seus efeitos sobre o sistema nervoso central (Fantoni & Cortopassi, 2016; Lumb & Jones, 2017).

Além disso, foi descrito como uma droga depressora segura e eficaz em várias espécies de peixes, além de ser considerado um composto químico com relativa solubilidade na água e de já ter sido testado em peixes teleósteos (Gholipour & Ahadzadeh, 2013; Martins et al., 2018; Valença-Silva et al., 2014; Valentim et al., 2016).

O propofol tem como características: ação e recuperação rápidas, segurança e mínimos efeitos adversos (Gomulka; Wlasow & Miroslaw, 2014). Gholipour & Ahadzadeh (2013)

afirmam que a eficácia e a segurança de qualquer agente anestésico podem variar de acordo com a espécie e apontam que apenas um número limitado de estudos avaliou a eficácia do propofol em peixes. Assim, sugerem que estudos adicionais devem ser realizados para estabelecer as condições operacionais apropriadas e as vantagens comparativas do uso deste anestésico em relação a outros anestésicos usados em peixes.

Diferentes pesquisas realizadas com fármacos anestésicos e analgésicos propõem a investigação de novas drogas ou de associações farmacológicas mais efetivas para uso em peixes porém, com menor ocorrência de efeitos adversos (Mettan et al., 2011; Montandon & Slutsky, 2019). Uma pesquisa realizada por Barbas et al. (2021) com peixes anestesiados com eugenol demonstrou que, apesar dos animais terem apresentado imobilidade, também apresentaram excitabilidade neuronal intensa semelhante a convulsão, sugerindo então uma toxicidade neuronal com o uso deste anestésico. Com isso o autor recomenda cautela com o uso deste anestésico em peixes, o que vem a reforçar a busca por anestésicos mais seguros.

Assim, o presente estudo utilizou o ácido acético como ferramenta para investigar propofol, morfina e metadona como fármacos moduladores da dor em lambaris (*A. lacustris*).

## 2 Objetivos

- Avaliar as alterações fisiológicas e comportamentais em lambaris (*A. lacustris*) submetidos a um estímulo com potencial de dano (injeção de ácido acético na boca).
- Identificar comportamentos relacionados à dor desencadeada por estímulo nociceptivo.
- Avaliar os efeitos do propofol, da morfina e da metadona em lambaris submetidos a injeção de ácido acético na boca.
- Contribuir para as pesquisas que utilizam peixes como modelo experimental e com a discussão atual sobre sensibilidade em peixes.



### 3 Material e Métodos

#### 3.1 Local de estudo e origem dos peixes

O experimento foi iniciado após a devida aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Protocolo nº 23-20) e foi desenvolvido no Laboratório de Tecnologia da Reprodução dos Animais Aquáticos, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *Campus* de Toledo no período de agosto de 2021 a janeiro de 2022. Neste estudo, foram avaliados 156 lambaris com peso médio de 15 gramas, provenientes do plantel de reprodutores do Laboratório de Tecnologia da Reprodução dos Animais Aquáticos.

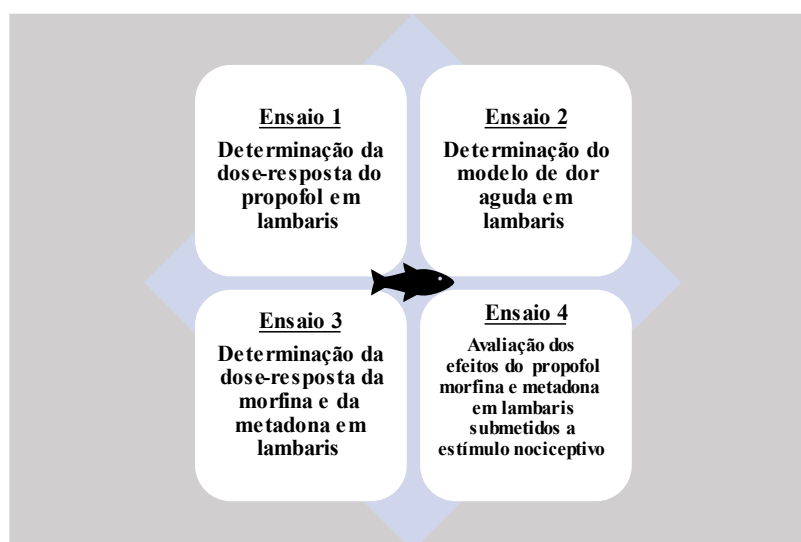
#### 3.2 Instalações, preparo e manejo dos animais

Previamente ao início do experimento, os animais permaneceram alojados em viveiros escavados de 200 m<sup>2</sup> com abastecimento constante de água para reposição da evaporação e infiltração e foram alimentados com ração comercial contendo 32% de proteína bruta (PB), quatro vezes ao dia. Em seguida, 156 animais foram transferidos e igualmente divididos entre três aquários de PVC na cor preta com volume útil de 60 litros, equipados de aeração e circulação de água constantes, aquecimento elétrico e filtro mecânico e biológico. Desta forma, a densidade foi de 52 animais por aquário. A renovação de água de 50% do volume total foi realizada diariamente, sendo metade pela manhã e metade no final da tarde, quando foi realizada a sifonagem para a retirada de fezes e alimentos não ingeridos.

Os animais permaneceram nos aquários de PVC durante 7 dias antes do início das observações, para aclimatação. Dois dias antes do início das observações, 30 peixes foram transferidos para um aquário de vidro com volume útil de 40 litros de água e com aeração realizada por filtro mecânico. Os peixes foram mantidos nesse aquário para aclimatação frente à presença e movimentação dos observadores. Manteve-se a alimentação com ração extrusada comercial (32% de proteína bruta), três vezes ao dia. A renovação de água de 50% do volume total também foi realizada diariamente, assim como a sifonagem para a retirada de fezes e alimentos não ingeridos.

Para a execução do experimento, e durante a realização das observações, os animais testados foram transferidos individualmente para aquários de vidro com volume útil de 20 litros, seguindo as mesmas condições de aeração e renovação de água citadas acima. Todos os animais

testados foram alimentados com ração extrusada comercial com 32% de PB, três vezes ao dia. Considerou-se como unidade experimental um aquário contendo um peixe. A partir disso, a realização do experimento foi executada em quatro ensaios. O primeiro ensaio buscou determinar a dose-resposta da concentração do propofol para lambaris, em 3 diferentes diluições (2, 5 e 10 miligramas/litro de água). O segundo ensaio avaliou a injeção de ácido acético no lábio superior como modelo de dor aguda nos peixes testados. O terceiro ensaio avaliou a dose-resposta da morfina e da metadona sob 5 diferentes doses (5, 10, 25, 50 e 100 mg/Kg) e o quarto ensaio avaliou os efeitos do anestésico propofol e de duas diferentes doses de morfina e metadona (10 e 25 mg/Kg) em lambaris submetidos a estímulo nociceptivo (Figura 1).



**Figura 1** - Etapas da experimentação para a avaliação dos efeitos do propofol, morfina e metadona em lambaris submetidos a estímulo nociceptivo.

### 3.3 Ensaio 1 – Determinação da dose-resposta da concentração do propofol em lambaris (*A. lacustris*)

Neste ensaio, o objetivo foi padronizar a concentração adequada do propofol para anestesia de lambaris. Foram testadas três diferentes doses de propofol 1%, para a obtenção do estágio de anestesia profunda. Para cada dose testada, houve oito repetições. As seguintes concentrações do anestésico foram testadas: 2mg /litro de água, 5 mg/litro de água e 10 mg/litro de água, respectivamente, 0,25 ml de propofol 1% por litro de água, 0,5 ml de propofol 1% por litro de água e 1 ml de propofol 1% por litro de água. No total, foram avaliados 24 animais e o tempo de observação foi de 120 minutos.

Nesta etapa, para cada repetição o peixe foi retirado do aquário de vidro de 40 litros com auxílio de um puçá e imediatamente inserido em um becker contendo 1 litro de água com a respectiva diluição do anestésico para a determinação do tempo de indução anestésica, até a obtenção do estágio de anestesia profunda. Sob acompanhamento de dois observadores, assim que o estágio de anestesia profunda foi alcançado e cronometrado, o peixe foi imediatamente retirado do becker com auxílio do puçá e então inserido no aquário de 20 litros para observação individual e determinação do tempo de recuperação anestésica.

As variáveis observadas compreenderam os tempos de indução (período compreendido desde o início da anestesia até atingir o estágio de anestesia profunda) e de recuperação anestésicas. O reconhecimento dos estágios da anestesia baseou-se nas respostas comportamentais observadas na tabela adaptada dos estágios da anestesia em peixes (Tabela 1). A recuperação anestésica foi avaliada pela resposta a estímulo externo leve (reflexo de endireitamento quando empurrado para uma posição lateral) e pelo desvio de obstáculo (objeto posicionado na frente do animal) (Balko et al., 2017) (Tabela 1).

**Tabela 1** - Estágios da anestesia em peixes.

<b>Estágio</b>	<b>Descrição</b>	<b>Parâmetro avaliado (Resposta fisiológica e comportamental)</b>
1	Sedação leve	Leve perda da resposta a estímulos externos, batimentos operculares mais lentos, equilíbrio normal.
2	Sedação profunda	Perda da resposta a estímulos externos, exceto aos mais fortes, leve queda do movimento opercular, equilíbrio normal.
3	Narcole	Resposta apenas a estímulos táteis fortes, elevação na taxa de movimentos operculares, perda do tônus muscular, nado errático.
4	Anestesia profunda	Perda dos reflexos medulares, movimentos operculares lentos e regulares, perda do tônus muscular e do equilíbrio.
5	Anestesia cirúrgica	Perda total da resposta a estímulos, movimentos operculares lentos e irregulares, perda total dos reflexos.
6	Colapso medular	Ausência de movimentos operculares, parada cardíaca e morte.
	Recuperação anestésica	Resposta a estímulos externos leves, batimentos operculares regulares, equilíbrio normal, desvio de obstáculo*.

Fonte: Adaptado de Bowser, 2001; \*Balko et al., 2017.

Também foram avaliados comportamento alimentar, ocorrência de comportamentos anômalos (natação errática, hiperatividade e perda do equilíbrio), além da ocorrência de mortalidade até 48 horas após o início do ensaio. O consumo de alimento foi registrado após a última avaliação (120 minutos), quando então o alimento foi oferecido. Considerou-se como natação errática quando foram observadas as seguintes alterações: natação em círculos ou girando ao redor do próprio eixo. A hiperatividade foi considerada quando foram observados episódios súbitos e intermitentes de aumento de atividade de natação. Já a perda de equilíbrio foi constatada nas observações em que os animais apresentavam dificuldade em se manter na coluna de água durante a natação ou em repouso.

A mensuração dos tempos foi cronometrada pelo pesquisador e em seguida os dados obtidos foram anotados em uma planilha. Os registros das atividades também foram realizados por vídeo-filmagem.

Ao final das avaliações, os peixes retornaram às caixas de polietileno, separados em grupos de acordo com o tratamento a que foram submetidos, onde então permaneceram sob as mesmas condições anteriormente citadas até 48 horas após o início da anestesia para a avaliação da ocorrência de mortalidade.

#### 3.4 Ensaio 2 - Determinação do modelo de dor aguda em lambaris (*A. lacustris*)

Este ensaio teve como objetivos determinar o ácido acético a 5% como modelo de dor aguda e identificar comportamentos relacionados a dor quando injetado no lábio superior dos animais testados. Nesta etapa, foram avaliados três tratamentos com 5 repetições cada. Os animais permaneceram nos aquários de PVC na cor preta com volume útil de 60 litros, equipados de aeração e circulação de água constantes, aquecimento elétrico e filtro mecânico e biológico durante 7 dias do início do ensaio.

O primeiro tratamento foi realizado com a injeção de 0,05 mililitros (ml) de ácido acético a 5 % no lábio frontal superior dos animais testados. O segundo tratamento foi realizado com a injeção de 0,05 ml de solução fisiológica (NaCl 0,9%) no lábio frontal superior do grupo testado e o terceiro tratamento foi composto por animais sem nenhuma aplicação de injeção. Para as injeções, foram utilizadas seringas de 0,3 ml com agulha de calibre 8 X 0,30 milímetros (mm). Todos os animais testados foram cuidadosamente retirados do aquário de vidro de 40 litros com auxílio de um puçá e imediatamente colocados sobre uma superfície macia para contenção e aplicação da injeção. Imediatamente após a injeção, o animal foi inserido no aquário de 20 litros para as observações individuais.

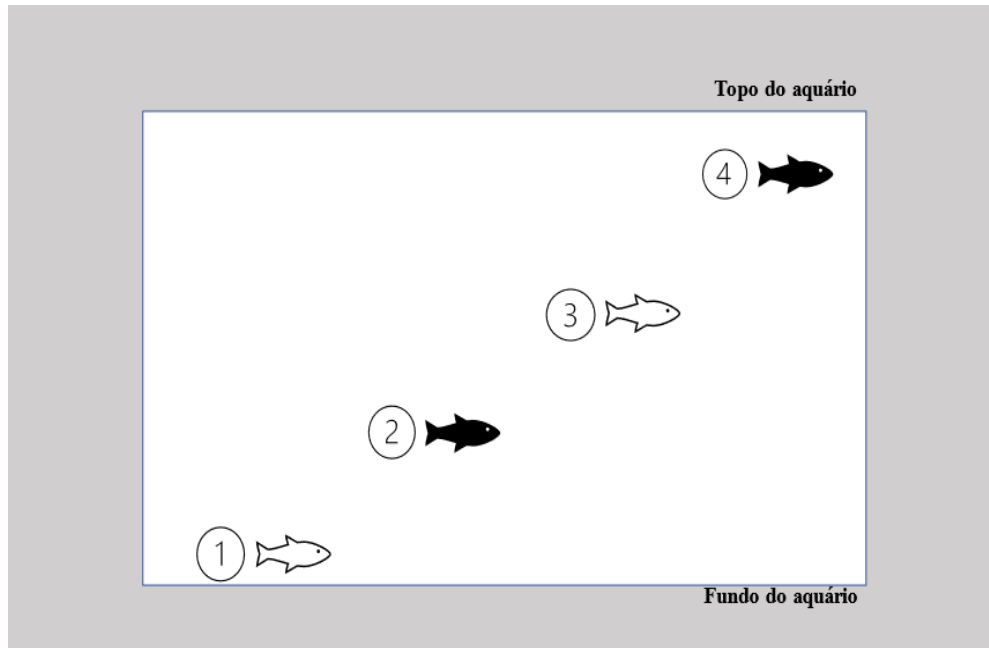
O registro de todas as atividades foi realizado por dois observadores e por vídeo-filmagem e os tempos foram cronometrados pelo pesquisador. Os registros foram realizados a 1 minuto, 5 minutos, 15 minutos e 30 minutos após a injeção do ácido acético ou da solução fisiológica, totalizando 4 avaliações. O grupo que não recebeu injeção também foi avaliado seguindo a mesma metodologia. Nesse ensaio, foram avaliadas as alterações comportamentais e fisiológicas observadas para cada tratamento. Os dados obtidos nas etapas de observação foram agrupados em cinco categorias seguindo uma adaptação da escala de Baker et al. (2013) (Tabela 2).

**Tabela 2** - Variáveis avaliadas para identificação de comportamentos relacionados a dor em lambaris submetidos a estímulo nocivo.

Variável	Descrição
Frequência respiratória (batimentos operculares / minuto)	Quantidade de batimentos operculares em um minuto.
Frequência de batimentos da nadadeira peitoral /minuto	Quantidade de batimentos da nadadeira peitoral em um minuto.
Posição na coluna de água do aquário	1= repousando no fundo 2 = localizado no terço inferior 3 = localizado no terço médio 4 = localizado no terço superior
Atividade natatória em um minuto (%)	Porcentagem de tempo de natação espontânea avaliada em um minuto.
Comportamento alimentar (ao término do ensaio).	Alimentou-se ao final ensaio. Não se alimentou ao final do ensaio.

Fonte: Adaptado de Baker et al., 2013.

As variáveis de interesse incluíram a frequência respiratória (quantidade de batimentos operculares em um minuto), frequência de batimentos da nadadeira peitoral /minuto (quantidade de batimentos da nadadeira peitoral em um minuto), posição na coluna de água do aquário (Figura 2), atividade natatória em um minuto (porcentagem de tempo de natação espontânea avaliada em um minuto) e comportamento alimentar (consumo de alimento oferecido ao final das avaliações) como mostra a Tabela 2.



**Figura 2** - Variável avaliada para identificação de comportamentos relacionados a dor em lambaris submetidos a estímulo nocivo: Posição na coluna de água do aquário (1 - repousando no fundo, 2 - localizado no terço inferior, 3 - localizado no terço médio, 4 - localizado no terço superior).

Além disso, comportamentos anômalos (natação errática, hiperatividade e perda do equilíbrio), também foram registradas. O comportamento alimentar foi registrado ao término das observações (30 minutos), quando o alimento foi oferecido. A avaliação realizada para verificar a porcentagem de morte, consumo e hiperatividade foi realizada de forma qualitativa, portanto, não foi possível aplicar o teste de Tukey para comparação das médias. Ainda, levantou-se a hipótese que poderia haver correlação entre a atividade natatória e os movimentos da nadadeira peitoral.

### 3.5 Ensaio 3 – Determinação da dose-resposta da morfina e da metadona em lambaris (*A. lacustris*)

Nesta etapa foram avaliadas cinco doses crescentes dos opioides injetados por via intramuscular, abaixo da nadadeira dorsal, tanto para a morfina 1% (5, 10, 25, 50 e 100 mg/Kg) quanto para a metadona 1% (5, 10, 25, 50 e 100 mg/Kg). As doses de morfina e metadona foram determinadas pela extrapolação de dosagens encontradas em pesquisas com outras espécies de peixes (Fowler & Miller, 2003; Tennant, 2005). Para cada ensaio, houve três repetições. Além dos tratamentos com cinco doses crescentes de morfina e metadona houve o grupo controle que recebeu a injeção de 0,05 ml de solução fisiológica (NaCl 0,9%) também abaixo da nadadeira dorsal e por via intramuscular. Os animais foram avaliados nos tempos 10, 30, 60, 90 e 120

minutos após a injeção. O registro de todas as atividades foi realizado por dois observadores e por vídeo-filmagem e os tempos foram cronometrados pelo pesquisador. A partir dos resultados obtidos nesta avaliação, duas doses de cada opioide testado foram selecionadas para a execução da etapa seguinte que compreendeu a avaliação de duas diferentes doses de morfina e de metadona em peixes submetidos a estímulo nociceptivo e anestesiados com propofol.

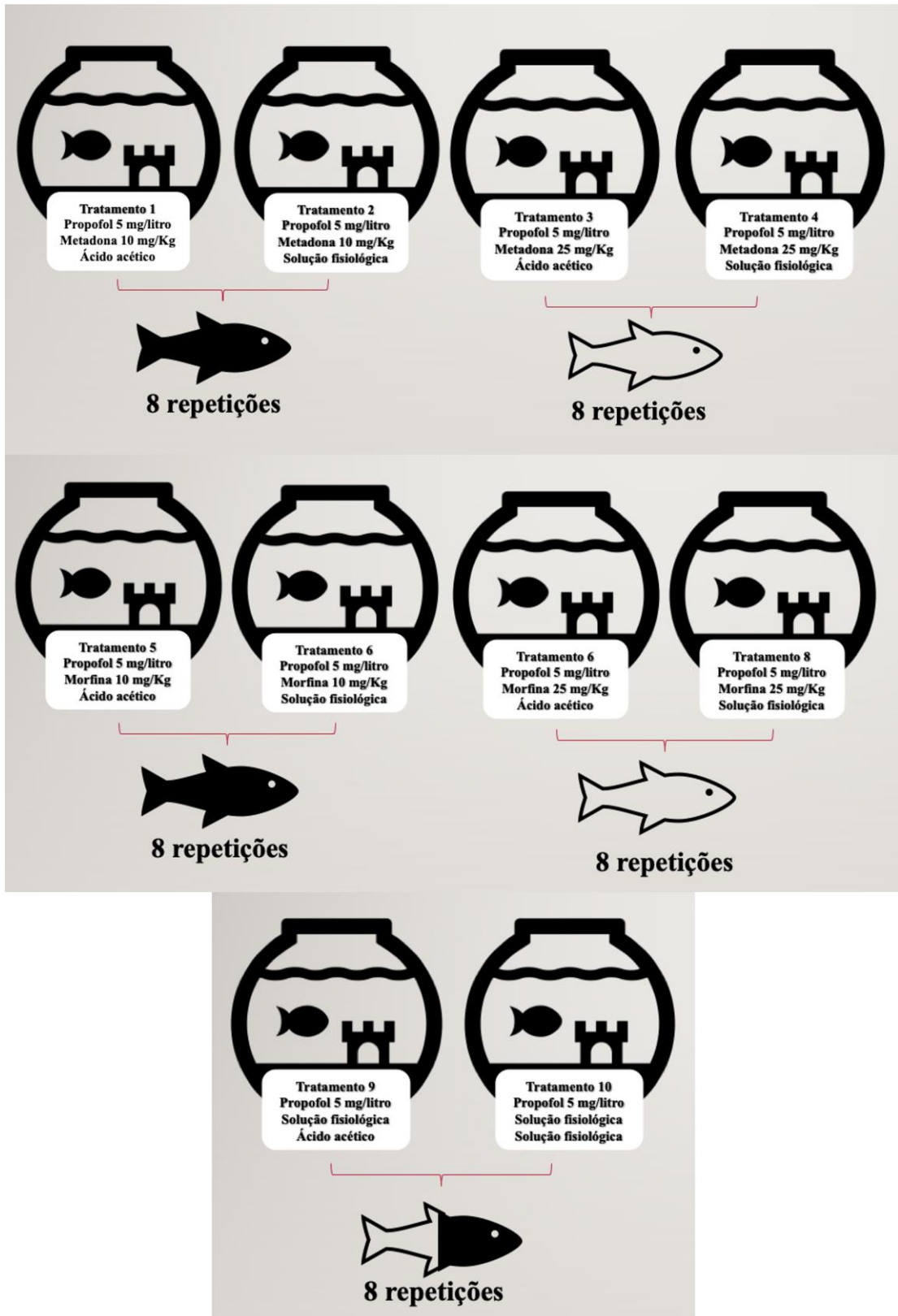
Neste ensaio, todos os animais testados foram cuidadosamente retirados do aquário de 40 litros com auxílio de um puçá e imediatamente colocados sobre uma superfície macia para contenção e aplicação da injeção. Para as injeções tanto da morfina quanto da metadona e da solução fisiológica foram utilizadas seringas de 0,3 ml com agulha de calibre 8 X 0,30 mm e o local da aplicação foi abaixo da nadadeira dorsal, por via intramuscular. Em seguida à aplicação, o animal foi inserido no aquário de vidro de 20 litros para a observação individual.

As variáveis de interesse incluíram a frequência respiratória (quantidade de batimentos operculares em um minuto), frequência de batimentos da nadadeira peitoral/minuto (quantidade de batimentos da nadadeira peitoral em um minuto), posição na coluna de água do aquário, atividade natatória em um minuto (porcentagem de tempo de natação espontânea avaliada em um minuto) e comportamento alimentar (consumo de alimento oferecido ao final das avaliações) seguindo uma adaptação da escala de Baker et al. (2013) (Tabela 2).

Além disso, avaliou-se a ocorrência de mortalidade e de comportamentos anômalos (natação errática, hiperatividade e perda do equilíbrio). O consumo alimentar foi registrado 120 minutos após a aplicação do fármaco quando então o alimento foi oferecido. Diante dos efeitos adversos reconhecidos dos opioides, também foram registrados quaisquer efeitos similares como vômito, depressão respiratória, entre outros observados com o uso de opioides, inclusive aqueles relatados em outras espécies.

### 3.6 Ensaio 4 – Avaliação dos efeitos do propofol, morfina e metadona em lambaris (*A. lacustris*) submetidos a estímulo nociceptivo

Neste ensaio realizou-se a avaliação dos efeitos do propofol associado à morfina ou metadona sob duas diferentes doses em lambaris submetidos a estímulo nociceptivo pela injeção de ácido acético no lábio frontal superior. Para isso, foram testados 80 lambaris pesando em média 15 gramas compreendendo 10 tratamentos e 8 repetições como mostra a figura 3.



**Figura 3** - Delineamento experimental do ensaio 4 para a avaliação dos efeitos do propofol, morfina e metadona em lambaris submetidos a estímulo nociceptivo.



**O tratamento 9 (solução fisiológica + ácido acético) foi considerado como controle positivo e o tratamento 10 (solução fisiológica + solução fisiológica) foi considerado como controle negativo.**

Para cada tratamento o animal testado foi cuidadosamente retirado do aquário de vidro de 40 litros, com auxílio de um puçá e imediatamente inserido em um becker com capacidade para 1 litro de água contendo a diluição de propofol na proporção de 5 mg/litro (1 ml de propofol a 1% por litro de água). Ao atingir o quarto estágio de anestesia o peixe foi retirado do becker com anestésico e colocado sobre uma superfície macia para a injeção de morfina, metadona ou de solução fisiológica por via intramuscular, abaixo da nadadeira dorsal. O volume aplicado foi calculado de acordo com a dose testada de morfina ou metadona. O volume injetado de solução fisiológica foi de 0,05 ml. Após as injeções os animais foram inseridos individualmente em aquários de vidro contendo 20 litros de água sem anestésico para a recuperação anestésica e observação. Após 30 minutos o peixe foi então retirado do aquário e novamente colocado sobre uma superfície macia para a aplicação do ácido acético ou da solução fisiológica no lábio frontal superior. O volume aplicado tanto de ácido quanto de solução fisiológica foi de 0,05 ml. Para as injeções foram utilizadas seringas de 0,3 ml com agulha de calibre 8 X 0,30 mm.

Imediatamente após as injeções os animais retornaram para o aquário de 20 litros para as observações individuais.

O registro de todas as atividades foi realizado por dois observadores e por vídeo-filmagem e os tempos foram cronometrados pelo pesquisador. Os registros foram realizados a 1 minuto, 5 minutos, 15 minutos e 30 minutos após a injeção do ácido acético ou da solução fisiológica totalizando 4 avaliações. Nesse ensaio, foram avaliadas as alterações comportamentais e fisiológicas observadas para cada grupo testado. Os dados obtidos nas etapas de observação foram agrupados em cinco categorias seguindo uma adaptação da escala de Baker et al. (2013).

As variáveis avaliadas foram a frequência respiratória (quantidade de batimentos operculares em um minuto), frequência de batimentos da nadadeira peitoral/minuto (quantidade de batimentos da nadadeira peitoral em um minuto), posição na coluna de água do aquário, atividade natatória em um minuto (porcentagem de tempo de natação espontânea avaliada em um minuto) e comportamento alimentar (consumo de alimento oferecido ao final das avaliações). Além disso também foi avaliada a ocorrência de comportamentos anômalos e a ocorrência de mortalidade até 48 horas após o término das observações. Para a avaliação do comportamento alimentar, ao término das observações (30 minutos), o alimento foi oferecido.

#### **4 Análise Estatística**

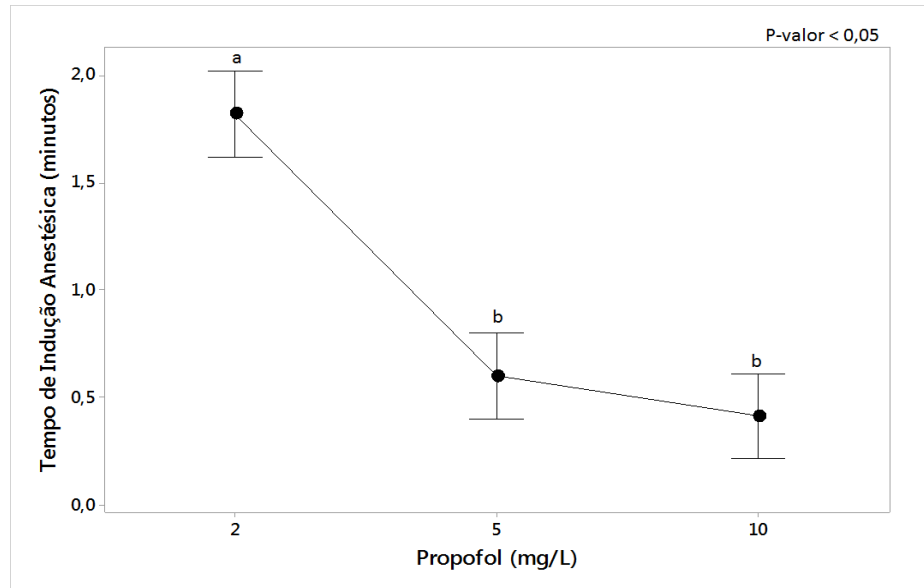
As ferramentas utilizadas nestes ensaios foram a Análise de Variância (ANOVA) e o Teste de Tukey. A ANOVA teve por objetivo comparar a média de três ou mais grupos, buscando determinar se estes possuíam médias estatisticamente iguais ou não, ao nível de 95% de confiança. Já o teste de Tukey, por se tratar de um teste paramétrico, comparou as médias, isto é, após a aplicação da ANOVA, este teste foi realizado para verificar quais grupos diferiram entre si, considerando um nível de confiança igual a 95%.

## 5 Resultados e Discussão

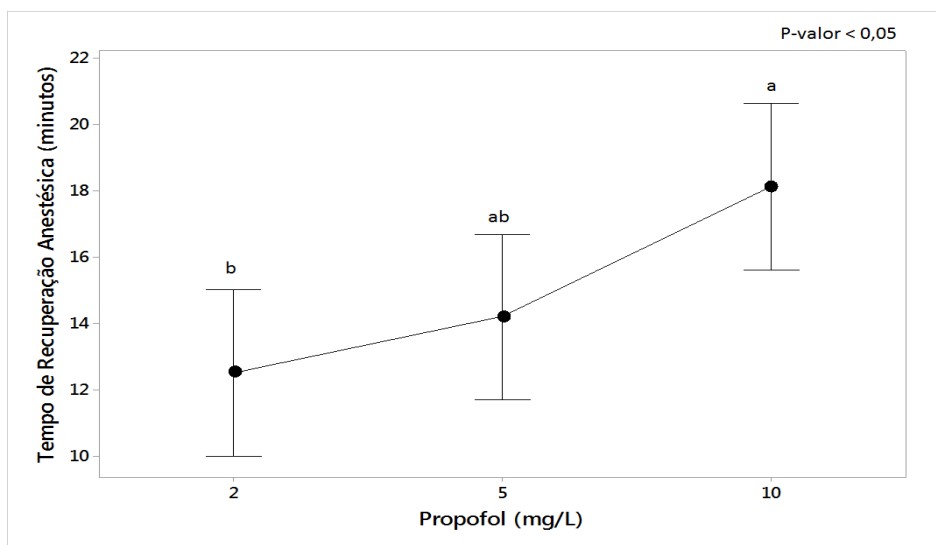
### 5.1 Ensaio 1 – Determinação da dose-resposta da concentração do propofol em lambaris (*A. lacustris*)

Pesquisas apontam o propofol como um anestésico promissor para uso em peixes, devido a estabilidade morfológica e bioquímica promovida, preservação dos níveis hematológicos, rápida metabolização, além de produzir anestesia adequada (Balko et al., 2017; Gonçalves & Giaquinto, 2020; Obirikorang et al., 2020; Prieto et al., 2017). Neste contexto, as variáveis avaliadas para determinação da dose-resposta do propofol em lambaris foram os tempos de indução e recuperação, comportamento alimentar ao final das avaliações e a ocorrência de mortalidade (Balko et al., 2017; Gomulka et al., 2015; Oda et al., 2014; Ostrensky; Pedrazzani & Vicente, 2016).

A concentração de 2 mg/litro apresentou maior ( $p < 0,05$ ) tempo de indução anestésica, em comparação com as demais (Figura 4), enquanto, a concentração de 10 mg/litro apresentou maior ( $p < 0,05$ ) tempo de recuperação anestésica (Figura 5).



**Figura 4** - Tempo de indução anestésica para o tratamento com o propofol em lambaris (*A. lacustris*).



**Figura 5** - Tempo de recuperação anestésica para o tratamento com o propofol em lambaris (*A. lacustris*).

Em contrapartida, a concentração de 5 mg/litro quando comparada às outras concentrações testadas mostrou tempos de indução e recuperação menores ( $p < 0,05$ ), portanto, foi possível observar que todas as concentrações testadas apresentaram efeito. Assim, a concentração de 5 mg/litro demonstrou características relevantes como ação e recuperação rápidas, segurança e menor ocorrência de hiperatividade nos animais testados, demonstrando ser a mais adequada dentre as concentrações testadas, pois corrobora com as recomendações de Roubach & Gomes (2001) que propõem que tanto a indução quanto a recuperação anestésica devem ocorrer de forma rápida, visando a redução de reações de hiperatividade e estresse.

Os peixes submetidos aos três tratamentos (2, 5 e 10 mg/litro) alimentaram-se 2 horas após o início da anestesia e, em todas as concentrações, foram observados peixes em estado de hiperatividade, porém com maior representatividade na concentração de 10 mg/litro (Tabela 3).

**Tabela 3** - Resultados obtidos para as variáveis avaliadas em lambaris submetidos a três diferentes concentrações do propofol a 1%.

Variáveis	Dose Propofol (mg/litro de água)			p-valor
	2	5	10	
Tempo de indução (min)	1,82 <sup>a</sup> ± 0,54	0,60 <sup>b</sup> ± 0,15	0,41 <sup>b</sup> ± 0,06	< 0,05
Tempo de recuperação (min)	12,52 <sup>b</sup> ± 2,38	14,19 <sup>ab</sup> ± 1,32	18,13 <sup>a</sup> ± 6,52	< 0,05
Morte (%)	0	0	0	-
Consumo de alimento (%)	100	100	100	-
Hiperatividade (%)	27,3	9,09	72,7	-

Não ocorreu mortalidade até 48 horas após o início da anestesia, bem como não houve ausência de consumo alimentar (anorexia) ao final das observações. Entretanto, apesar dos resultados aqui apresentados, é importante ressaltar que tanto a eficácia, quanto a segurança de qualquer agente anestésico, podem variar de acordo com a espécie (Gholipour & Ahadizadeh, 2013).

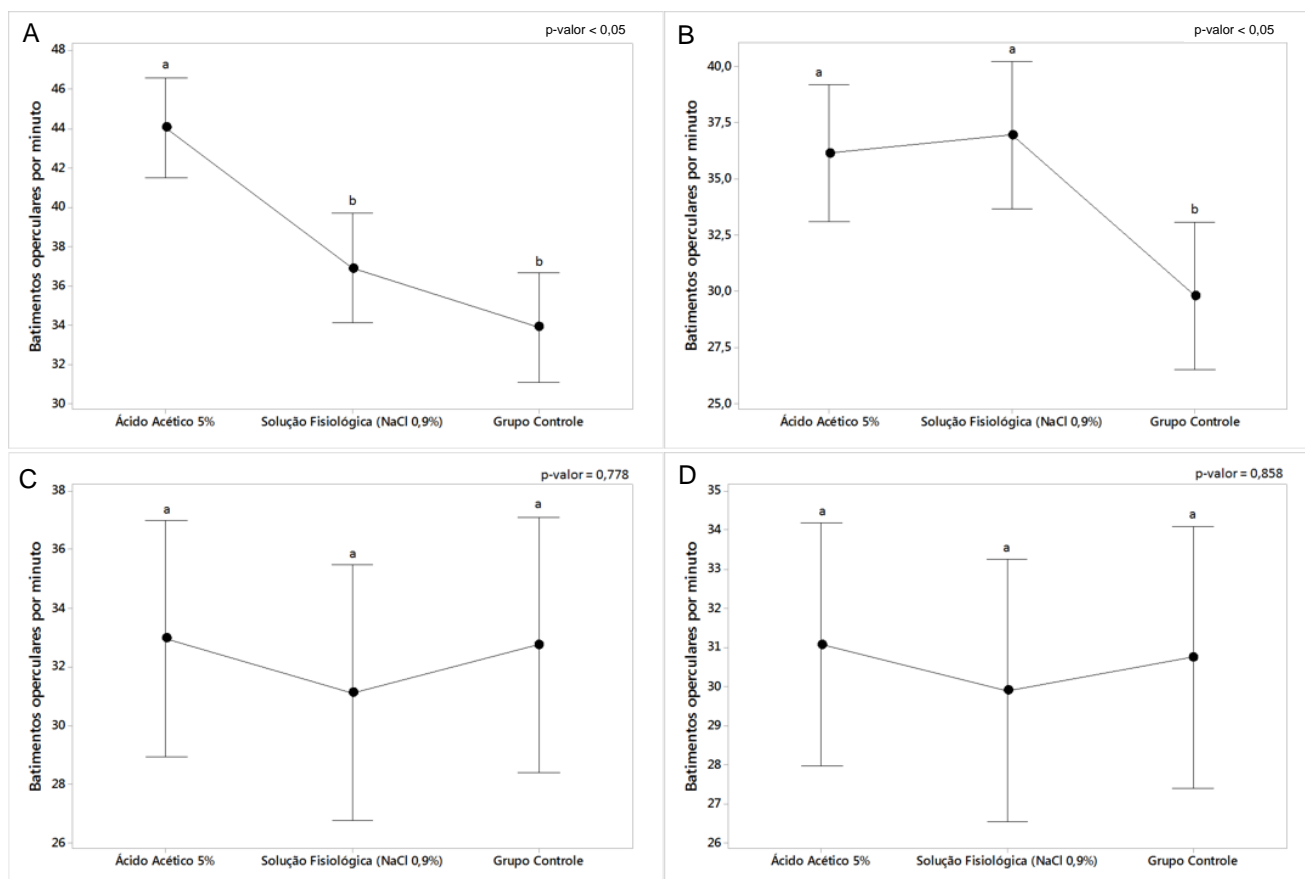
## 5.2 Ensaio 2 - Determinação do modelo de dor aguda em lambaris (*A. lacustris*)

No que se refere a metodologia para a determinação do modelo de dor aguda utilizou-se a injeção de ácido acético na concentração de 5% (Almeida, 2018; Mettan et al., 2011; Newby et al.; 2007; Wilkie & Stevens, 2009; Reilly et al., 2008). Já as variáveis avaliadas (frequência respiratória, quantidade de batimentos de nadadeira por minuto, consumo alimentar, posição na coluna de água do aquário de observação e taxa de atividade de natação em um minuto) foram fundamentadas de acordo com a escala proposta por Baker et al. (2013).

A nocicepção depende da ativação de receptores periféricos de dor de alto limiar (nociceptores) que incluem substâncias químicas irritantes como o ácido acético (Almeida, 2018; Gaynor & Muir, 2009). A primeira fase (dor neurogênica ou aguda) inicia-se imediatamente após a injeção e se estende pelos primeiros 5 minutos (3-5 min). A segunda fase (inflamatória) começa cerca de 15-20 minutos depois da injeção e dura em média 30 minutos (Magalhães et al., 2017).

Diante do estímulo químico testado nesse ensaio e sua relação aos tempos definidos para as avaliações (primeiro minuto, cinco minutos, quinze minutos e trinta minutos após a injeção) ressalta-se a importância de que a dor aguda tem início súbito e término rápido (Carrol, 2012; Fantoni, 2011; Otero, 2005). Assim, Nordgreen et al. (2009) indicam testar os animais submetidos a injeção em intervalos curtos, como foi preconizado nesse estudo, onde a primeira avaliação ocorreu no primeiro minuto e mostrou efeito nos animais testados.

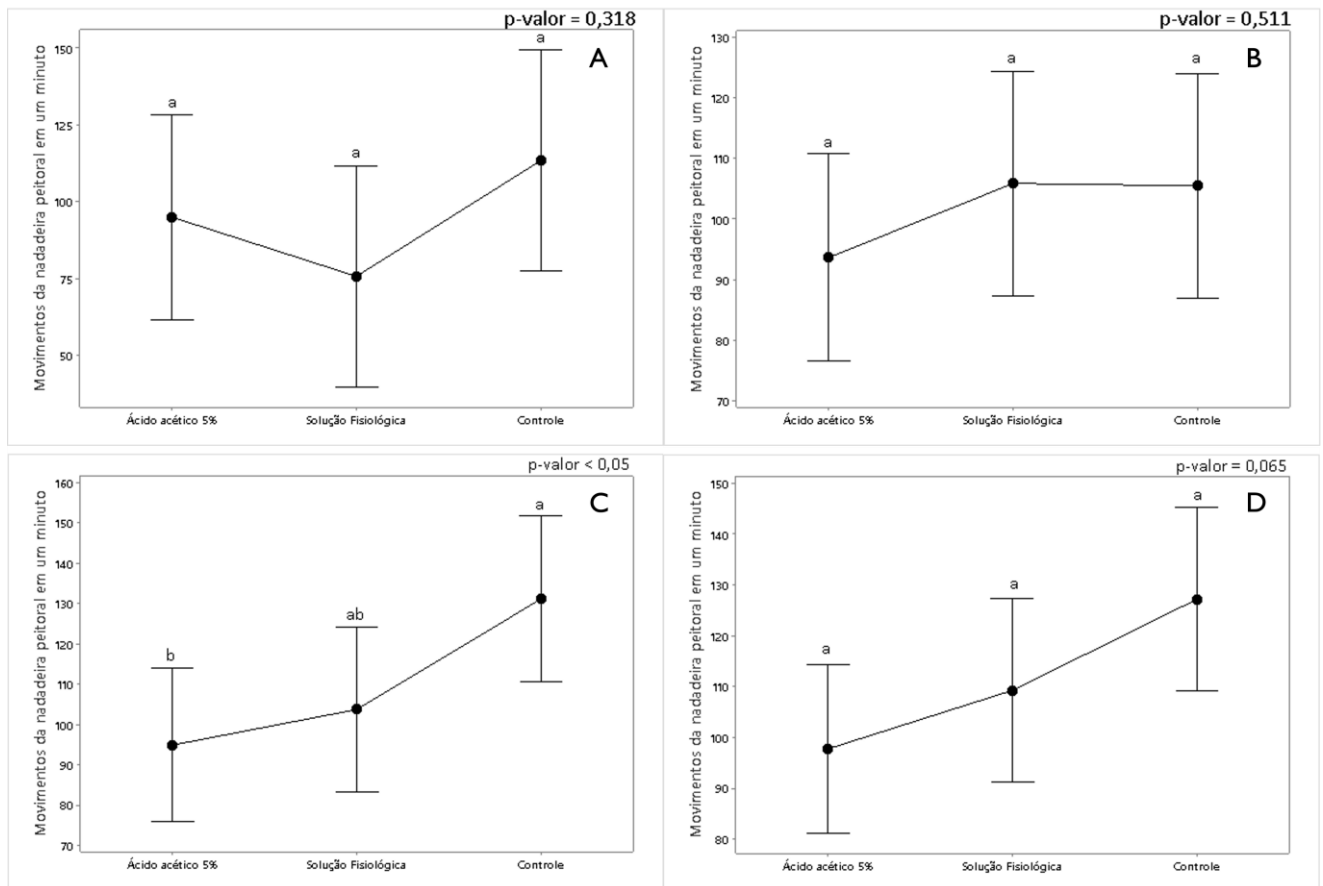
O grupo tratado com ácido acético apresentou maior ( $p < 0,05$ ) quantidade de batimentos operculares por minuto, no primeiro minuto de teste (Figura 6). No tempo referente a 5 minutos o tratamento com ácido acético apresentou a maior ( $p < 0,05$ ) média de batimentos operculares por minuto em relação ao grupo controle, porém não houve diferença quando comparado ao grupo solução fisiológica (Figura 6). Nos tempos 15 e 30 minutos não houve diferença estatística na comparação dos três tratamentos.



**Figura 6** - Avaliação da diferença entre os resultados obtidos em 4 diferentes tempos para o parâmetro de batimentos operculares/ minuto para os tratamentos com ácido acético, solução fisiológica e grupo controle em lambaris. (A - primeiro minuto, B - 5 minutos, C - 15 minutos, D - 30 minutos).

A injeção de ácido acético como estímulo nociceptivo evidenciou nos animais testados o aumento na taxa de batimentos operculares por minuto. Estes resultados são semelhantes aos de pesquisas realizadas com peixes teleósteos que demonstraram aumento da taxa de batimentos operculares imediatamente após estimulação nociceptiva com injeção de ácido acético, sugerindo que a taxa de ventilação é um indicador útil de nocicepção ou percepção de dor em peixes (Ashley et al., 2009; Baker et al., 2013; Mettan et al., 2011; Newby, 2009; Reilly et al., 2008; Nordgreen et al., 2009; Sneddon, Braithwaite & Gentle, 2003; Zaig et al., 2021).

Não foi observada alteração dos movimentos da nadadeira peitoral logo após o estímulo nos peixes testados ( $p < 0,05$ ) (Figura 7), porém, avaliando o comportamento ao longo de toda a faixa de tempo, o grupo controle apresentou maior ( $p < 0,05$ ) quantidade de movimentos da nadadeira peitoral, exceto no tempo 30 minutos quando todos os tratamentos foram estatisticamente iguais (Figura 7).



**Figura 7** - Avaliação da diferença entre os resultados obtidos em 4 diferentes tempos para o parâmetro de movimentos da nadadeira peitoral/minuto para os tratamentos com ácido acético, solução fisiológica e grupo controle em lambaris. (A - primeiro minuto, B - 5 minutos, C - 15 minutos, D - 30 minutos).

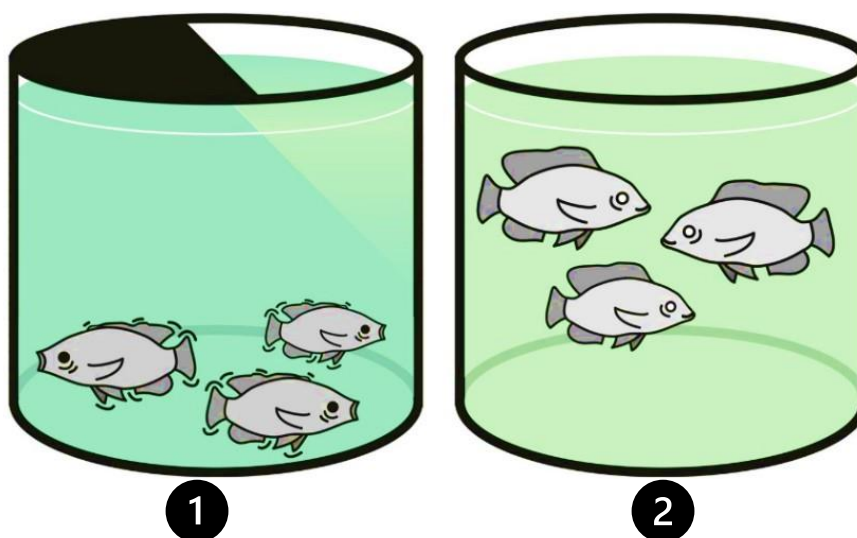
Quanto a avaliação da taxa de batimentos da nadadeira peitoral, não foi observada alteração dos movimentos logo após o estímulo nos peixes testados, porém, avaliando o comportamento ao longo de toda a faixa de tempo, o grupo controle apresentou maior quantidade de movimentos da nadadeira peitoral. Nos peixes teleósteos, as nadadeiras peitorais estão em posição lateral ao corpo e em geral controlam o equilíbrio e a sustentação (Bemvenuti & Fischer, 2010). Assim, a diminuição dos batimentos da nadadeira peitoral seria considerada como um indicativo de anormalidade como perda de equilíbrio e de sustentação, pois o contrário foi observado nos peixes sem tratamento.

Para a variável posição na coluna de água, não foram observadas diferenças entre os grupos. No entanto, conforme apresentado na Tabela 4, observa-se que grande parte dos animais avaliados permaneceram na posição 2 da coluna de água.

**Tabela 4** - Avaliação da diferença entre os resultados obtidos em 4 diferentes tempos para o parâmetro de localização na coluna de água para os tratamentos com ácido acético, solução fisiológica e grupo controle em lambaris (posição 1, 2, 3 e 4).

Tratamentos	Tempo (minutos)															
	1				5				15				30			
	Localização na coluna de água															
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
	Porcentagem de peixes na posição (%)															
Ácido acético	42,9	42,9	0	14,2	28,6	42,8	0	28,6	42,9	42,9	14,2	0	14,2	71,6	0	14,2
Solução Fisiológica	33,3	66,7	0	0	33,3	66,7	0	0	33,3	66,7	0	0	0	83,3	16,7	0
Controle	0	83,3	16,7	0	16,7	83,3	0	0	0	100,0	0	0	0	100,0	0	0
Média	25,4	64,3	5,6	4,7	26,2	64,3	0	9,5	25,4	36,5	4,7	0	4,7	85,0	5,6	4,7

Muitos ensaios sugerem alterações no comportamento dos peixes como um indicador confiável de estresse e ansiedade. Nesse contexto, dentre estas alterações, a localização no fundo do aquário é considerada como uma alteração comportamental relevante (Figura 8) e pode ser atenuada ou exacerbada dependendo do grau de estresse ou da exposição a drogas e substâncias nocivas (Cachat et al., 2010; Nahar & Deepali, 2021; Saraiva et al., 2021).



**Figura 8** - 1 – Posição no fundo (menor nível de bem-estar). 2 -Pairando ou nadando na coluna de água (maior nível de bem-estar). Adaptado de Saraiva et al., 2021



Para a variável atividade natatória, os tratamentos utilizados impactaram na atividade natatória dos peixes, uma vez que o ácido acético diferiu dos demais grupos, apresentando maior ( $p < 0,05$ ) atividade natatória em um minuto (Tabela 5). Observou-se também a ocorrência de hiperatividade somente no grupo tratado com ácido acético. Para nenhum dos tratamentos a correlação entre movimentos da nadadeira peitoral e atividade natatória se confirmou, uma vez que o coeficiente de correlação para o ácido ( $r=-0,302$ ), para a solução fisiológica ( $r=0,175$ ) e para o controle ( $r=-0,081$ ) foram muito baixos. Vários estudos utilizaram a atividade de natação como parâmetro para a avaliação da nocicepção em peixes (Correia et al., 2011; Curtright et al., 2015; Reilly et al., 2008; Taylor et al., 2017).

**Tabela 5** - Avaliação da diferença entre os resultados obtidos em 4 diferentes tempos para todos os parâmetros avaliados nos tratamentos com ácido acético, solução fisiológica e grupo controle em lambaris.

Parâmetro Avaliado	Tratamento (considerando todos os tempos)			p-valor
	Ácido Acético 5%	Solução Fisiológica (NaCl 0,9%)	Grupo Controle	
Batimentos operculares por minuto	36,1 <sup>a</sup> ± 6,95	33,7 <sup>ab</sup> ± 4,95	31,8 <sup>b</sup> ± 2,73	< 0,05
Movimentos da nadadeira peitoral por minuto	23,8 <sup>b</sup> ± 6,80	24,7 <sup>b</sup> ± 8,40	29,8 <sup>a</sup> ± 5,65	< 0,05
Localização na coluna de água	2,00 <sup>a</sup> ± 0,98	1,79 <sup>a</sup> ± 0,51	2,00 <sup>a</sup> ± 0,29	0,47
Atividade natatória em um minuto (%)	60,0 <sup>a</sup> ± 35,6	33,6 <sup>b</sup> ± 27,8	30,7 <sup>b</sup> ± 28,7	< 0,05
Morte (%)	0	0	0	-
Consumo (%)	0	85,7	100	-
Hiperatividade (%)	14,3	0	0	-

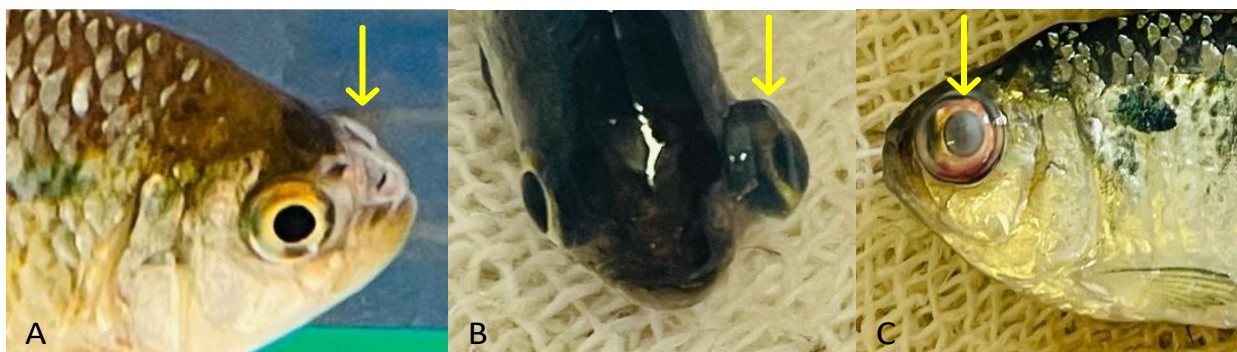
Diante dos resultados sugere-se que a atividade natatória é um bom parâmetro para avaliação da resposta a estímulo nocivo em peixes. Esse dado difere do que foi proposto por Correia et al. (2011) que constataram diminuição na atividade natatória após aplicação do ácido e de outros estudos que demonstraram redução da atividade natatória em resposta a diferentes

estímulos nocivos em peixes (Harms et al., 2005; Reilly et al., 2008), bem como em outras espécies, mas corrobora resultados obtidos por Zaig et al. (2021), que demonstrou aumento na atividade de natação em larvas de peixe expostas a formalina.

Nordgreen et al. (2014) referem que a redução na atividade natatória diante de um estímulo nocivo pode ser interpretada como uma resposta protetora para evitar mais lesões. No entanto, supõe-se que essa reação possa ser esperada em estímulos nocivos térmicos ou de contato com o agente irritante, diferente do estímulo aplicado nesse ensaio.

Além disso, a suspensão do comportamento alimentar também é considerada como parâmetro indicador de dor em peixes (Ashley et al., 2009; Baker et al., 2013; Mettan et al., 2011; Newby, 2009; Newby et al., 2007; Wilkie & Stevens, 2009; Reilly et al., 2008; Nordgreen et al., 2009; Sneddon, Braithwaite & Gentle, 2003; Zaig et al., 2021) o que corrobora com os resultados deste ensaio onde no tratamento com ácido acético o consumo alimentar foi suspenso em todos os tempos avaliados.

Todos os animais que foram tratados com injeção de ácido acético apresentaram alterações teciduais que ocorreram no local da injeção e/ou próximo do ponto de injeção (mudança de coloração no local da injeção, protrusão do globo ocular e opacidade de córnea) como mostra a figura 9.



**Figura 9** - Lesões teciduais causadas pelo ácido acético (seta amarela) (A - mudança de coloração na região da aplicação; B - protrusão do globo ocular esquerdo; C - opacidade de córnea).

A protrusão do globo ocular e a opacidade de córnea ocorreram somente no tratamento com ácido acético, demonstrando que o ácido atingiu tecidos adjacentes como a região retrobulbar. Sabe-se que o ácido induz a inflamação tecidual e apoptose celular (Sneddon, 2003; Sneddon, Braithwaite & Gentle, 2003; Xiong et al., 2018).

### 5.3 Ensaio 3 – Determinação da dose-resposta da morfina e da metadona em lambaris (*A. lacustris*)

A investigação de drogas analgésicas para peixes possui grande relevância, pois entende-se que a modificação da resposta a estímulos nocivos pelos analgésicos constitui um dos critérios para fundamentar a capacidade de percepção da dor pelos peixes (Bateson, 1991; Mettan et al., 2011; Zaig et al., 2021). Neste ensaio, buscou-se a dose-resposta das concentrações de morfina e metadona. Além disso, avaliou-se a ocorrência de comportamentos anômalos, efeitos adversos e mortalidade.

De acordo com os resultados da tabela 6, a variável batimentos operculares por minuto na dose de 50 mg/kg de metadona apresentou maior média, porém devido ao desvio padrão amostral relativamente alto os tratamentos apresentaram-se iguais. O mesmo ocorreu com a variável movimentos da nadadeira peitoral por minuto na mesma dose.

**Tabela 6** - Resultados obtidos no ensaio 3 para a avaliação das variáveis nos tratamentos com 5 doses crescentes de metadona (5, 10, 25, 50 e 100 mg/Kg) e o grupo controle (0 mg/Kg).

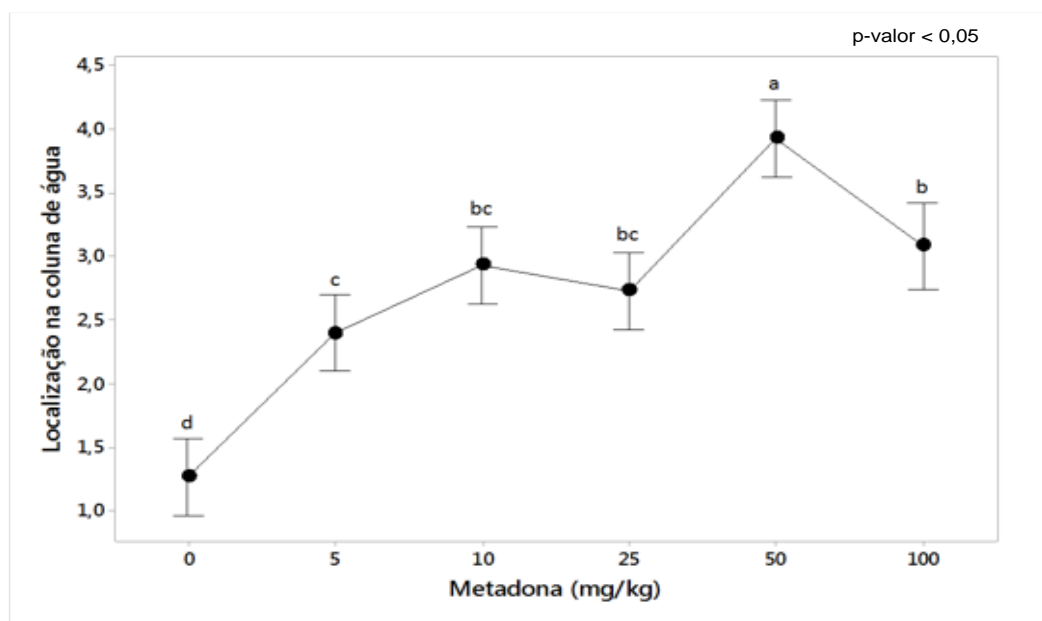
Parâmetro Avaliado	Metadona (mg/Kg)						p-valor
	0	5	10	25	50	100	
Batimentos operculares por minuto	105,4 <sup>b</sup> ± 14,7	104,3 <sup>b</sup> ± 17,4	116,6 <sup>b</sup> ± 7,7	118,9 <sup>b</sup> ± 14,2	141,7 <sup>a</sup> ± 22,6	122,3 <sup>ab</sup> ± 28,6	0,08
Movimentos da nadadeira peitoral por minuto	114,8 <sup>a</sup> ± 21,2	109,3 <sup>a</sup> ± 16,0	110,3 <sup>a</sup> ± 14,4	107,4 <sup>a</sup> ± 14,4	120,4 <sup>a</sup> ± 19,5	98,5 <sup>a</sup> ± 35,7	0,15
Localização na coluna de água	1,3 <sup>d</sup> ± 0,5	2,4 <sup>c</sup> ± 0,5	2,9 <sup>bc</sup> ± 0,6	2,7 <sup>bc</sup> ± 0,5	3,9 <sup>a</sup> ± 0,3	3,1 <sup>b</sup> ± 1,1	< 0,05
Atividade natatória em um minuto (%)	17,7 <sup>b</sup> ± 20,6	89,4 <sup>a</sup> ± 13,2	82,7 <sup>a</sup> ± 13,3	92,7 <sup>a</sup> ± 11,4	75,8 <sup>a</sup> ± 25,3	84,7 <sup>a</sup> ± 27,7	< 0,05

Para a variável localização na coluna de água a concentração de 0 mg/kg (controle) apresentou a posição mais baixa ( $p < 0,05$ ) e a concentração de 50 mg/kg de metadona apresentou a maior ( $p < 0,05$ ) posição na coluna de água (Figura 10).

Uma pesquisa realizada por Giacomini et al. (2016), demonstrou que o estresse aumentou o tempo de permanência dos peixes testados na área inferior do aquário, porém, naqueles submetidos a tratamento com fluoxetina e diazepam esse comportamento não ocorreu,

assim os autores concluíram que estas drogas causaram a diminuição da ansiedade nos animais testados.

Sabe-se que os agentes pré-anestésicos são úteis para a redução do estresse e da ansiedade e que atualmente os opióides representam uma das categorias de medicamentos pré-anestésicos e analgésicos mais comuns na medicina veterinária (Delgado, Silva & Nunes, 2021). Assim, diante dos resultados obtidos nesse ensaio com a metadona e com a variável posição na coluna de água pode-se sugerir que o mesmo efeito tenha ocorrido com o uso da metadona nos animais testados.



**Figura 10** - Resultados obtidos da variável localização na coluna de água no ensaio 3, para os tratamentos com 5 doses crescentes de metadona (5, 10, 25, 50 e 100 mg/Kg) e o grupo controle (0 mg/Kg).

Ainda de acordo com a tabela 6, observa-se que com exceção do grupo controle (0 mg/kg) todas as concentrações de metadona apresentaram-se estatisticamente iguais ( $p < 0,05$ ) frente ao parâmetro de atividade natatória em um minuto.

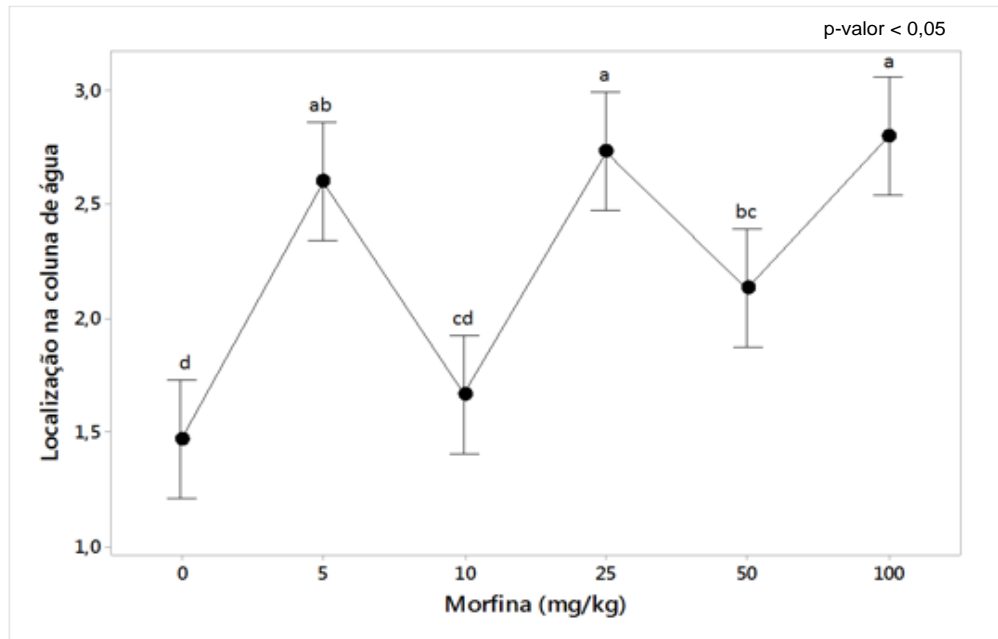
Diante dos resultados expostos na tabela 7, em relação aos tratamentos com morfina, todas as doses testadas (5, 10, 25, 50 e 100 mg/Kg) apresentaram o mesmo comportamento que o grupo controle ( $p=0,08$ ) para a quantidade de batimentos operculares, considerando todos os tempos (Tabela 7). Portanto, nesse ensaio não foi observado efeito de depressão respiratória com as doses testadas de morfina.

**Tabela 7** - Resultados obtidos no ensaio 3 para a avaliação das variáveis nos tratamentos com 5 doses crescentes de morfina (5, 10, 25, 50 e 100 mg/Kg) e o grupo controle (0 mg/Kg).

Parâmetro Avaliado	Morfina (mg/Kg)						p-valor
	0	5	10	25	50	100	
Batimentos operculares por minuto	124,0 <sup>a</sup> ± 20,5	128,2 <sup>a</sup> ± 15,0	117,8 <sup>a</sup> ± 21,2	128,2 <sup>a</sup> ± 25,9	125,7 <sup>a</sup> ± 18,5	109,9 <sup>a</sup> ± 13,2	0,08
Movimentos da nadadeira peitoral por minuto	101,9 <sup>bc</sup> ± 37,8	111,8 <sup>abc</sup> ± 20,6	91,1 <sup>bc</sup> ± 23,1	135,0 <sup>a</sup> ± 32,5	113,8 <sup>ab</sup> ± 24,0	84,2 <sup>c</sup> ± 20,4	< 0,05
Localização na coluna de água	1,5 <sup>d</sup> ± 0,6	2,6 <sup>ab</sup> ± 0,5	1,7 <sup>cd</sup> ± 0,5	2,7 <sup>a</sup> ± 0,6	2,1 <sup>bc</sup> ± 0,4	2,8 <sup>a</sup> ± 0,4	< 0,05
Atividade natatória em um minuto (%)	16,9 <sup>c</sup> ± 20,2	60,7 <sup>ab</sup> ± 24,4	39,0 <sup>bc</sup> ± 28,1	61,5 <sup>ab</sup> ± 38,1	66,9 <sup>a</sup> ± 18,5	81,9 <sup>a</sup> ± 17,1	< 0,05

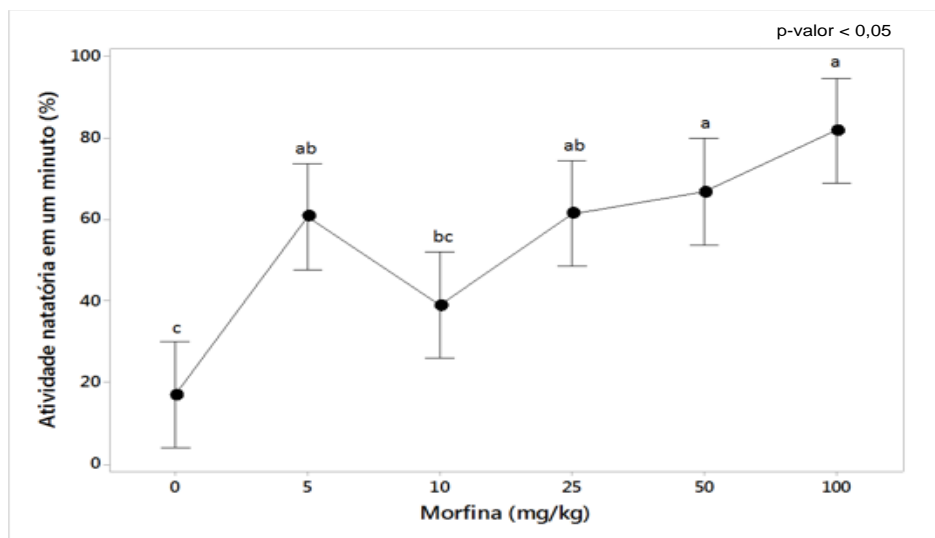
Ainda de acordo com a tabela 7, os animais que receberam a dose de 25 mg/Kg de morfina apresentaram maior ( $p < 0,05$ ) quantidade de movimentos da nadadeira peitoral por minuto e no tratamento com 100 mg/Kg de morfina observou-se o menor ( $p < 0,05$ ) quantidade de movimentos da nadadeira peitoral por minuto. A diminuição dos batimentos da nadadeira peitoral pode ser considerada como um indicativo de anormalidade uma vez que segundo Bemvenuti e Fischer (2010) estas nadadeiras controlam o equilíbrio do corpo e a sustentação.

Observa-se na figura 11 que as concentrações de 25 e 100 mg/kg de morfina apresentaram maior ( $p < 0,05$ ) posição na coluna de água comparada com os demais tratamentos. Em relação ao grupo controle, assim como no ensaio com a metadona, os peixes ocuparam a posição mais baixa ( $p < 0,05$ ) na coluna de água (posição 1), frente às demais concentrações avaliadas. Esses resultados demonstram que os animais do grupo controle tanto do ensaio com metadona quanto do ensaio com morfina, com base nessa variável avaliada, demonstraram maior estresse/desconforto quando comparados aos animais tratados com opioides, reforçando as propriedades sedativas e analgésicas destes fármacos.



**Figura 11** - Resultados obtidos da variável localização na coluna de água no ensaio 3, para os tratamentos com 5 doses crescentes de morfina (5, 10, 25, 50 e 100 mg/Kg) e o grupo controle (0 mg/Kg).

No que se refere a variável atividade natatória em um minuto, as concentrações de 50 e 100 mg/kg de morfina apresentaram maior ( $p < 0,05$ ) tempo de natação durante o tempo estipulado ao comparar com as demais concentrações de morfina. Além disso, o grupo controle (0 mg/Kg) apresentou o menor ( $p < 0,05$ ) tempo de natação (Figura 12).



**Figura 12** - Resultados obtidos para a variável atividade natatória em um minuto (morfina).

Pesquisas que utilizaram o ácido acético como estímulo nociceptivo demonstraram importantes mudanças no comportamento de peixes como redução na atividade de natação, perda de equilíbrio, e permanência no fundo do aquário (Lopez-Luna et al., 2017; Eckroth et al., 2014). Tais alterações de comportamento foram reduzidas pelo uso da morfina

demonstrando efeito analgésico eficaz em peixes (Mettam et al., 2011, Newby et al., 2009, Schroeder & Sneddon, 2016).

Estudos preliminares demonstraram que a morfina foi associada à hiperatividade intermitente, semelhante à hiperatividade induzida pelos opióides em outras espécies, como gatos, camundongos, cavalos e seres humanos. Esses pesquisadores descreveram o comportamento como hiperativo, maníaco e errático com "movimentos extremamente rápidos e intensos, em zigue-zague sem orientação" (Baker et al., 2013; Csanyi et al., 1984). Ainda segundo Epstein (2015), estas manifestações tendem a ocorrer com dosagens mais altas de morfina em diferentes espécies de animais.

Zafarlman et al. (2018) afirmam que os efeitos adversos relacionados aos opioides (náuseas, vômito, depressão respiratória), representam um desafio no tratamento da dor grave, tornando necessário uma melhor compreensão dos seus mecanismos celulares e moleculares. Nesse ensaio, as doses de morfina e metadona foram determinadas pela extrapolação de dosagens encontradas em pesquisas com outras espécies de peixes (Fowler & Miller, 2003; Tennant, 2005) e foram constatados diferentes efeitos adversos.

Para a comparação da taxa de alimentação, efeitos adversos e taxa de mortalidade entre as 5 doses testadas de morfina e metadona observa-se na tabela 8 que com a dose de 100 mg/Kg de metadona, dois animais apresentaram vômito/regurgitação de conteúdo alimentar, além de óbito em uma das repetições. Todos os animais testados com a dose de 5 mg/Kg de metadona apresentaram hiperatividade e para a metadona nas doses de 50 e 100 mg/Kg os animais apresentaram natação errática e perda do equilíbrio (comportamentos anômalos).

**Tabela 8** - Resultados obtidos no ensaio com 5 doses crescentes de morfina e metadona em lambaris, referente ao comportamento alimentar, mortalidade, comportamentos anômalos e ocorrência de efeitos adversos.

Dose (mg/Kg)	MORFINA				METADONA			
	Taxa de alimentação (%)	Taxa de mortalidade (%)	Efeitos adversos (%)	Comportamentos anômalos (%)	Taxa de alimentação (%)	Taxa de mortalidade (%)	Efeitos adversos (%)	Comportamentos anômalos (%)
5	66,7	-	-	-	100	-	33,3	100
10	66,7	-	-	-	100	-	-	-
25	66,7	-	-	-	100	-	-	-
50	66,7	-	-	100	66,7	-	100	66,7
100	100	-	-	100	0	33,3	100	100

A depressão respiratória é considerada como efeito adverso dos opióides especialmente quando utilizados em altas doses e pode evoluir para apnéia seguida de óbito. Isso se deve à ação depressora destes fármacos sobre o centro respiratório (Lumb & Jones, 2017; Montandon & Slutsky, 2019; Zaig et al., 2021). Além disso, com a dose de 100 mg/Kg de metadona foi possível constatar a ocorrência de vômito/regurgitação de conteúdo alimentar também citado como efeito adverso de opióides em mamíferos.

Ainda conforme a tabela 8, observa-se que com as doses mais elevadas de morfina (50 e 100mg/Kg), ocorreu hiperatividade, assim como nos resultados encontrados por Zaig et al. (2021). Baker et al. (2013) referem episódios de hiperatividade com dose de 5 mg/Kg de morfina, porém, nesse ensaio isso não foi constatado. Uma das hipóteses pode ser justificada pelas diferenças na farmacocinética da morfina de acordo com as espécies de peixes (Newby et al., 2009). A hiperatividade psicomotora foi induzida após a administração de morfina em doses baixas apenas após a retirada da droga por um período superior a 7 dias seguida de nova exposição ao fármaco (Bian et al., 2022).

Na mesma concentração de morfina (100 mg/Kg) não foi observada mortalidade, uma vez que em comparação com outros opioides ela causa menor depressão respiratória (Gutstein, 2001). Além disso, os efeitos adversos dos opioides tendem a variar de acordo com a espécie (Mathews et al., 2014). Fantoni & Mastrocinque (2010) afirmam que a ocorrência desses efeitos pode também variar de acordo com o momento da aplicação. No entanto, neste ensaio, para todos os tratamentos, a aplicação ocorreu no mesmo momento.

Diante das diferenças observadas entre as doses e efeitos na comparação entre morfina e metadona em lambaris, pode-se justificar que, apesar dos dois fármacos possuírem alta afinidade pelo receptor  $\mu$ , a metadona possui maior afinidade pelo receptor quando comparado a morfina, além de interagir com o receptor N-Metil-D-Aspartato (NMDA) (Duke-Novakovski 2014; Mathews et al., 2014; Selley et al., 2001). Importante ainda ressaltar que a metadona foi recentemente introduzida na rotina da medicina veterinária (Cardozo et al., 2014), havendo ainda poucos relatos de sua aplicação em peixes (Crivelaro et al., 2019). Frente aos dados obtidos com a metadona, sugere-se investigar a presença de receptores NMDA em peixes, assim como realizar estudos direcionados a investigação da farmacocinética e da farmacodinâmica da metadona na espécie.

Diante dos efeitos adversos observados para morfina e metadona sugere-se a utilização das doses de 10 e 25 mg/Kg tanto para a morfina quanto para a metadona para a realização de outras pesquisas.



#### 5.4 Ensaio 4 – Avaliação dos efeitos do propofol, morfina e metadona em lambaris (*A. lacustris*) submetidos a estímulo nociceptivo

O uso da anestesia para manuseio dos peixes em experimentos com estímulos nociceptivos possui prós e contras, pois uma prática amplamente adotada é aguardar 30 minutos após a anestesia para iniciar as observações comportamentais. Porém, informações sobre efeitos imediatos após o estímulo nocivo são perdidas, o que é relevante para respostas a estressores agudos, como nesse ensaio com a injeção de ácido acético (Nordgreen et al., 2014).

No entanto, a omissão da anestesia pode afetar o bem-estar do animal de pesquisa além de contribuir para mudanças nos parâmetros fisiológicos e comportamentais avaliados, induzidos pelo estresse. Diante dessa questão, o uso ou não de anestésico e por quanto tempo adiar as observações do comportamento em pesquisas com estímulo nociceptivo pode tornar-se escolha pessoal de cada pesquisador (Brydges et al., 2009).

Nesse ensaio, seguiu-se a recomendação de Nordgreen et al. (2014), uma vez que os animais foram previamente anestesiados com propofol e posteriormente, 30 minutos após a anestesia, iniciaram-se as observações. Assim buscou-se aumentar o bem-estar dos animais testados e diminuir a perda de informações a partir das avaliações realizadas.

Para a avaliação da variável batimentos operculares por minuto, considerando-se todos os tratamentos realizados ao longo dos trinta minutos, constatou-se diferença entre os tratamentos, uma vez que o tratamento com solução fisiológica e ácido acético apresentou a maior ( $p < 0,05$ ) quantidade de batimentos operculares por minuto. Além disso todos os demais tratamentos apresentaram-se estatisticamente iguais (Tabela 9). O aumento da frequência respiratória em peixes submetidos a estímulo nociceptivo foi descrito em diferentes pesquisas com peixes, especialmente quando estímulos químicos foram empregados (Sneddon, 2003; Sneddon et al., 2003, Newby e Stevens, 2008; Zaig et al., 2021).

**Tabela 9** - Resultados obtidos das variáveis avaliadas nos tratamentos do ensaio 4, com duas diferentes doses de morfina e de metadona.

Variável avaliada	Tratamento										P-valor
	Solução fisiológica	Solução fisiológica	Metadona 10 mg/kg	Metadona 10 mg/kg	Morfina 10mg/kg	Morfina 10mg/kg	Metadona 25 mg/kg	Metadona 25 mg/kg	Morfina 25mg/kg	Morfina 25mg/kg	
	+ Solução fisiológica	+ Ácido Acético	+ Solução fisiológica	+ Ácido acético	+ Solução fisiológica	+ Ácido acético	+ Solução fisiológica	+ Ácido acético	+ Solução fisiológica	+ Ácido acético	
<b>Batimentos operculares por minuto</b>	127,4 <sup>b</sup> ± 14,5	155,9 <sup>a</sup> ± 15,0	121,4 <sup>b</sup> ± 8,2	119,6 <sup>b</sup> ± 15,4	122,0 <sup>b</sup> ± 6,4	117,1 <sup>b</sup> ± 7,9	123,1 <sup>b</sup> ± 10,8	120,5 <sup>b</sup> ± 13,1	122,3 <sup>b</sup> ± 17,7	125,8 <sup>b</sup> ± 17,4	< 0,05
<b>Localização na coluna de água</b>	1,3 <sup>c</sup> ± 0,6	1,8 <sup>bc</sup> ± 1,1	2,5 <sup>ab</sup> ± 1,1	2,4 <sup>abc</sup> ± 0,7	1,4 <sup>bc</sup> ± 0,5	2,6 <sup>ab</sup> ± 1,2	2,5 <sup>ab</sup> ± 0,9	3,1 <sup>a</sup> ± 0,4	1,5 <sup>bc</sup> ± 0,5	1,5 <sup>bc</sup> ± 0,5	< 0,05
<b>Movimentos da nadadeira peitoral por minuto</b>	118,6 <sup>a</sup> ± 21,0	113,2 <sup>a</sup> ± 15,1	95,3 <sup>a</sup> ± 14,3	94,6 <sup>a</sup> ± 22,6	105,5 <sup>a</sup> ± 23,7	104,3 <sup>a</sup> ± 16,8	98,9 <sup>a</sup> ± 12,9	95,6 <sup>a</sup> ± 6,1	107,5 <sup>a</sup> ± 36,9	101,5 <sup>a</sup> ± 10,2	0,051
<b>Tempo de atividade natatória (%)</b>	66,3 <sup>b</sup> ± 23,4	59,9 <sup>b</sup> ± 24,8	98,0 <sup>a</sup> ± 2,5	97,0 <sup>a</sup> ± 3,5	80,0 <sup>ab</sup> ± 13,1	67,9 <sup>ab</sup> ± 16,4	99,8 <sup>a</sup> ± 0,7	78,1 <sup>ab</sup> ± 12,2	52,5 <sup>b</sup> ± 36,5	71,0 <sup>ab</sup> ± 20,6	< 0,05

Para a variável localização na coluna de água, conforme os resultados apresentados na tabela 9, observa-se que após 30 minutos de observações confirmou-se diferença entre os tratamentos, pois o tratamento com metadona 25 mg/kg + ácido acético apresentou média de posição mais alta ( $p < 0,05$ ) na coluna de água (topo do aquário). Em contrapartida, o tratamento com solução fisiológica + solução fisiológica apresentou média de localização mais baixa ( $p < 0,05$ ) na coluna de água (fundo do aquário). A localização no fundo do aquário é considerada como uma alteração comportamental compatível com estresse e pode ser atenuada pela exposição a drogas (Saraiva et al., 2021). Assim, a metadona pode ser considerada como uma droga moduladora de estresse e dor pela avaliação da variável posição na coluna de água.

Crivelaro et al. (2019) pesquisaram o efeito da metadona na dose de 30 mg/kg em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e diante das variáveis comportamentais e fisiológicas avaliadas não puderam afirmar que a metadona causou efeito analgésico, mas sim que causou efeitos comportamentais como sedação. No entanto, estes autores atribuíram os resultados ao baixo tamanho amostral e afirmaram que os resultados podem variar entre as espécies de peixes uma vez que outros opioides mostraram resultados variáveis em diferentes espécies de peixes.

Quanto a variável quantidade de batimentos da nadadeira peitoral por minuto, considerando todos os tratamentos ao longo dos 30 minutos de avaliação, não houve diferença entre os tratamentos ( $p = 0,051$ ).

No que se refere a avaliação da variável taxa de atividade natatória por minuto (%), observa-se na tabela 9 que houve diferença entre os tratamentos evidenciando que três

tratamentos com metadona apresentaram maior ( $p < 0,05$ ) taxa de atividade natatória quando comparado aos demais tratamentos.

Um aumento na atividade locomotora também foi associado à nocicepção em peixes usando estímulos nocivos químicos e mecânicos (Alves; Barbosa Junior & Hoffmann, 2013; Roques et al., 2010).

De acordo com a tabela 10, considerando o comportamento alimentar (taxa de alimentação), observou-se anorexia em todos os animais testados ao final das avaliações (30 minutos após a injeção do ácido acético ou da solução fisiológica). Contrariando os resultados dos ensaios anteriores em que apenas os animais que receberam injeção de ácido apresentaram anorexia ao final das avaliações.

Muitos estudos pré-clínicos sobre opioides são conduzidos em animais saudáveis, sem estímulo nociceptivo e ocorrência de dor, no entanto, efeitos adversos desencadeados em pacientes submetidos a estímulo nocivo poderão diferir entre si (Kukanich & Wiese, 2015).

Além disso, a anorexia é um achado comum em peixes acometidos por diferentes doenças, porém pode ser uma complicação após anestesia, procedimentos diagnósticos e cirúrgicos (Weber, 2011).

Nesse ensaio não houve mortalidade até 48 horas depois do término das observações demonstrando que propofol, morfina e metadona nas doses administradas mostraram-se seguras para a espécie testada.

**Tabela 10** - Resultados obtidos no ensaio 4, com duas diferentes doses de morfina e metadona em lambaris, referente ao comportamento alimentar, mortalidade, comportamentos anômalos, ocorrência de efeitos adversos e de outros efeitos observados.

Opioide/Solução fisiológica	Dose (mg/kg)	Ácido acético/Solução fisiológica	Taxa de alimentação (%)	Taxa de mortalidade (%)	Efeitos adversos (%)	Comportamentos anômalos (%)	Outras alterações (%)
<b>Morfina</b>	10	Solução Fisiológica	0	0	0	0	0
		Ácido Acético	0	0	0	87,5	50
	25	Solução Fisiológica	0	0	0	0	0
		Ácido Acético	0	0	0	25,0	50
<b>Metadona</b>	10	Solução Fisiológica	0	0	0	0	0
		Ácido Acético	0	0	12,5	37,5	60
	25	Solução Fisiológica	0	0	12,5	0	0
		Ácido Acético	0	0	12,5	25,0	0
<b>Solução fisiológica</b>	0	Solução fisiológica	0	0	0	0	0
<b>Solução fisiológica</b>	0	Ácido acético	0	0	0	50,0	100

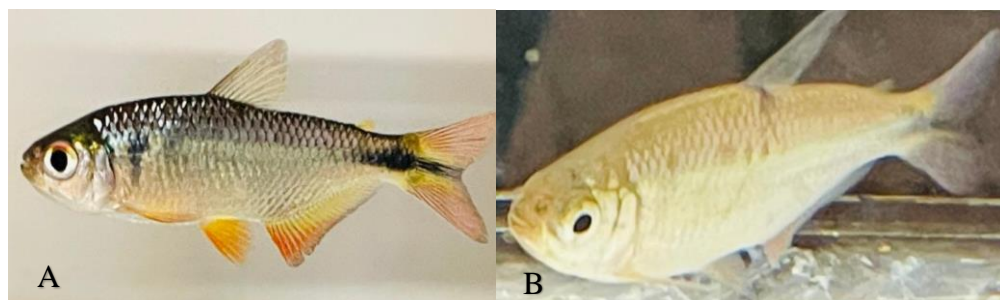
Dentre os efeitos adversos foi constatado vômito/regurgitação apenas no tratamento com metadona. Ressalta-se que no ensaio 3 esse efeito adverso foi observado também apenas no tratamento com metadona. Uma pesquisa realizada por Crivelaro et al. (2019), concluiu que a metadona influenciou na taxa de alimentação de tilápias do Nilo (*O. niloticus*) pelo efeito de supressão do comportamento alimentar e sugeriu que a metadona poderia ter causado náuseas, como ocorre em mamíferos, e que esse efeito pode ser espécie-específico ou droga-específico. Assim, pode-se inferir diante dos resultados desse ensaio que a metadona apresenta efeito emético em peixes de acordo com a dose administrada.

A morfina é um opióide amplamente utilizado em peixes e tem menor risco de causar depressão respiratória quando comparada a opioides mais potentes como fentanil e metadona (Gutstein, 2001). Uma pesquisa com zebrafish mostrou que a morfina deprimiu a frequência respiratória em baixas concentrações, mas que em concentrações mais altas, a morfina induziu um efeito excitatório (Zaig et al., 2021), porém nesse ensaio com as menores doses testadas de morfina e metadona não foi observado depressão respiratória e óbito.

Os comportamentos anômalos (nado errático, hiperatividade e perda de equilíbrio) foram observados nos tratamentos em que houve aplicação de ácido acético, porém em menor porcentagem nos tratamentos com as doses mais altas de morfina e metadona (25 mg/kg). Em estudo realizado por Newby & Stevens (2008), com trutas submetidas a injeção de ácido acético no lábio, a perda de equilíbrio foi observada e considerada como um comportamento relacionado a dor. Sugere-se então que neste ensaio a morfina e a metadona na dose de 25 mg/kg possam ter atenuado esse comportamento causado pelo estímulo nociceptivo decorrente da aplicação do ácido acético. Chervova & Lapshin (2000) em estudo realizado com uso de opioide em peixes concluíram que os efeitos destes fármacos são dose-dependentes e que quanto maior a dose mais rápido ocorre a ação analgésica.

Além disso dois animais testados no tratamento solução fisiológica + ácido acético, apresentaram movimentos de balançar a cabeça imediatamente após a injeção do ácido no lábio. Essa manifestação foi relatada em pesquisa realizada com trutas que receberam injeção de ácido acético no lábio (Sneddon, 2003), em pesquisa com bacalhau do Atlântico após inserção de anzol na boca (Eckroth et al., 2014) e em carpas que receberam injeção de ácido acético no lábio (Reilly et al., 2008).

Mudanças na cor da pele, hiperemia e protrusão do globo ocular (outras alterações) foram observadas apenas nos tratamentos com o ácido acético (figura 13).



**Figura 13** - Mudanças na coloração observada nos lambaris testados. A- Hiperemia e mudança na coloração da pele (escurecimento da pele) nos peixes que receberam injeção de ácido acético. B- Coloração da pele clara observada nos demais grupos.

As mudanças de cor nos peixes estão frequentemente relacionadas ao estresse. Os principais hormônios que controlam a pigmentação são o  $\alpha$ -hormônio estimulador de melanócitos ( $\alpha$ MSH) e o hormônio concentrador de melanina (MCH). Estes hormônios não apenas controlam a pigmentação da pele, mas também regulam a resposta aos estressores (Arends et al., 2000, Burton & Vokey, 2000). A mudança de cor foi relatada em outras espécies de peixes quando expostas ao estresse e podem atuar como um potencial indicador de dor (Van der Salm et al., 2004).

Com relação a hiperemia, sabe-se que a dor aguda leva à ativação do sistema nervoso simpático resultando assim em quadros de ansiedade, taquicardia, taquipnéia e aumento da pressão arterial, sendo o endotélio o maior órgão-alvo da hipertensão arterial (Vitorino et al., 2021). As alterações na função do endotélio em resposta a ações mecânicas, imunológicas e químicas refletem a hiperemia reativa que é baseada na resposta vascular à estimulação física do endotélio ou à administração aguda de substâncias doadoras de óxido nítrico (Melo et al., 2007).

Uma variedade de indicadores de bem-estar em peixes foi sugerida, incluindo mudanças na cor, taxa de ventilação, comportamento de natação, ingestão de alimentos reduzida, crescimento lento e surtos de doenças (Sneddon et al., 2016; van der Salm et al., 2004). Diante disso, infere-se que nesse ensaio a administração do ácido demonstrou alguns destes indicadores. Ademais, movimentos operculares normais e coloração clara, geralmente com movimentos normais e dinâmicos das barbatanas dorsal e peitoral são considerados indicadores de bem-estar (Saraiva et al., 2021) sendo alguns destes também verificados nesse ensaio.

## 6 Conclusão

Os resultados apresentados nesta pesquisa demonstraram que os peixes testados mostraram alterações comportamentais e fisiológicas diante do estímulo nociceptivo (injeção de ácido acético), como aumento na taxa de batimentos operculares, ocorrência de comportamentos anômalos, ausência de comportamento alimentar e mudanças na coloração. Além disso, a ocorrência dos diferentes efeitos desencadeados pela aplicação dos opioides morfina e metadona apontam para a existência de receptores no lambari, os quais já foram relatados em pesquisas realizadas com outras espécies de peixes.

No que diz respeito à ação do propofol, morfina e metadona frente ao estímulo nociceptivo estes mostraram-se capazes de modular alterações fisiológicas e comportamentais relacionadas à dor nos peixes tratados, como a taxa de batimento opercular e a supressão de alguns comportamentos relacionados à dor. Também pode-se inferir que o propofol demonstrou ser seguro e eficaz para a obtenção do estágio de anestesia profunda nos animais testados e dessa forma, pode ser considerado como um anestésico promissor para uso em outras espécies de peixes.

Ainda é importante ressaltar que as alterações comportamentais e fisiológicas frente ao estímulo nocivo evidenciam que estas variam de acordo com a substância química, concentração e local de injeção. No entanto, cada indivíduo pode manifestar a dor de maneira única e a não demonstração de um comportamento relacionado à dor não significa a inexistência da mesma.

Conclui-se que apesar de as doses testadas de morfina (10 e 25 mg/Kg), metadona (10 e 25 mg/kg) e propofol (5 mg/Litro de água) terem se mostrado seguras e capazes de modular alterações fisiológicas e comportamentais relacionadas à dor em peixes, mais pesquisas são necessárias para a investigação de protocolos de analgesia, uma vez que há importante variação nas respostas comportamentais e fisiológicas em diferentes pesquisas que avaliaram o controle da dor nestes animais.

## Referências

Almeida, C. M. (2018). Nocicepção em peixes: uma revisão sistemática. (Trabalho de Conclusão de Curso) - Universidade Federal de Uberlândia, Ituiutaba.

Alvarez, F. A.; Rodriguez-Martin, I.; Gonzalez-Nunez, V.; Fernández de Velasco, E. M.; Sarmiento, R. G. & Rodríguez, R. E. (2006). New kappa opioid receptor from zebrafish *Danio rerio*. *Neuroscience Letters*, 405(1-2), 94-99. doi: 10.1016/j.neulet.2006.06.028

Alves, F. L.; Barbosa Junior, A. & Hoffmann, A. (2013). Antinociception in piauçu fish induced by exposure to the conspecific alarm substance. *Physiology & Behavior*, 110–111, 58–62, Feb. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.12.003>.

Arends, R.J.; Rotllant, J.; Metz, J. R.; Mancera, J. M.; Se, W. B. & Flik, J. (2000). Alpha-MSH acetylation in the pituitary gland of the sea bream (*Sparus aurata* L.) in response to different backgrounds, confinement and air exposure. *Journal of Endocrinology*, 166(2), 427-435. doi: 10.1677/joe.0.1660427.

Ashley, P. J.; Ringrose, S.; Edwards, K. L.; Wallington, E.; Mccrohan, C. R. & Sneddon, L. U. (2009). Effect of noxious stimulation upon antipredator responses and dominance status in rainbow trout. *Animal Behaviour*, 77(2), 403-410. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2008.10.015>

Baker, T. R.; Baker, B. B.; Johnson, S. M. & Sladky, K. K. (2013). Comparative analgesic efficacy of morphine sulfate and butorphanol tartrate in koi (*Cyprinus carpio*) undergoing unilateral gonadectomy. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 243(6), 882-890. doi: 10.2460/javma.243.6.882

Balko, J. A.; Wilson, S. K.; Lewbart, G. A.; Brian, R. G. & Posner, L. P. (2017). Propofol as an immersion anesthetic and in a minimum anesthetic concentration (MAC) reduction Model in Goldfish (*Carassius auratus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 48(1), 48-54. <https://doi.org/10.1638/2016-0079.1>

Barbas, L. A. L.; Torres, M. F.; Costa, B. M. P. A. da; Feitosa, M. J. M. et al. (2021). Eugenol induces body immobilization yet evoking an increased neuronal excitability in fish during short-term baths. *Aquatic Toxicology*, 231, Feb. doi: 10.1016/j.aquatox.2020.105734.

Bateson, P. (1991). Assessment of pain in animals. *Animal Behavior*, London, 42(5), 827- 839. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(05\)80127-7](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(05)80127-7).

Bemvenuti, M. A. & Fischer, L. G. (2010). Peixes: Morfologia e Adaptações. *Cadernos de Ecologia Aquática*, 5(2), 31-54, ago./dez. Disponível em: [https://demersais.furg.br/images/producao/2010\\_bemvenuti\\_peixes\\_morfologia\\_caderno\\_ecol\\_aquat.pdf](https://demersais.furg.br/images/producao/2010_bemvenuti_peixes_morfologia_caderno_ecol_aquat.pdf).

Bian, Y.; Wang, X.; Liang, J.; Li, L.; Wu, X.; Tang, B.; Leung, G. P. & Lee, S. M. (2022). The development of behavioral sensitization induced by a single morphine exposure in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 113, Mar. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2021.110456>.

Braithwaite, V.A. & Ebbesson, L.O.E. (2014). Pain and stress responses in farmed fish. *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)*, 33(1), 245-253. doi:10.20506/rst.33.1.2285.

Brydges, N. M.; Boulcott, P.; Ellis, T. & Braithwaite, V. A. (2009). Quantifying stress responses induced by different handling methods in three species of fish. *Applied Animal Behaviour Science*, 116(2-4), 295–301, Jan. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2008.09.003>

Burton, D. & Vokey, J. E. (2000). The relative in vitro responsiveness of melanophores of winter flounder to  $\alpha$ -MSH and MCH. *Journal of Fish Biology*, 56(5), 1192-1200. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2000.tb02133>.

Cachat, J.; Stewart, A.; Grossman, L.; Gaikwad, S. et al. (2010). Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish. *Nature Protocol*, 5, 1786–1799 (2010). <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.140>.



Cardozo, L. B.; Cotes, L. C.; Kahvegian, M. A.; Rizzo, M. F.; Otsuki, D. A.; Ferrigno, C. R. & Fantoni, D. T. (2014). Evaluation of the effects of methadone and tramadol on postoperative analgesia and sérum interleukin-6 in dogs undergoing orthopaedic surgery. *BMC Veterinary Research*, 10(194), 1-7. doi:10.1186/s12917-014-0194-7.

Carrol, G. L. (2012). *Anestesia e Analgesia de Pequenos Animais*. 1.ed. São Paulo: Manole, 336p.

Chatigny, F. (2019). The Controversy on Fish Pain: A Veterinarian's Perspective. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, 22(4), 400–410, Oct./Dec. doi:10.1080/10888705.2018.1530596.

Chervova, L. S. & Lapshin, D. N. (2000). Opioid modulation of pain threshold in fish. *Doklady Biological Sciences*, 375, 590–591. doi: 10.1023/a:1026681519613.

Correia, A. D.; Cunha, S. R.; Scholze, M. & Stevens, E. D. (2011). A Novel Behavioral Fish Model of Nociception for Testing Analgesics. *Pharmaceuticals*, 4(4), 665-680. doi:10.3390/ph4040665.

Crivelaro, R. M.; Thiesen, R.; Aldrovani, M.; Silva, P. E. S.; Sobrinho, A. A. F. B. & Moraes, P. C. (2019). Behavioural and physiological effects of methadone in the perioperative period on the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Journal of Fish Biology*, 94(5), 823-827, May. <https://doi.org/10.1111/jfb.13959>.

Csanyi, V.; Doka, A.; Castellano, C.; Puglisi-Allegra, S. & Oliverio, A. (1984). An ethopharmacological analysis of morphine effects in fish (*Macropodus opercularis*). *Behavioural Processes*, 9(4), 315–321, July. doi: 10.1016/0376-6357(84)90017-2.

Curtright, A.; Rosser, M.; Goh, S.; Keown, B. et al. (2015). Modeling nociception in zebrafish: a way forward for unbiased analgesic Discovery. *PLoS One*, 10(1), e0116766.

Delgado, E.; Silva, A. D. da & Nunes, M. P. (2021). The effects of premedication with methadone on intraocular pressure in dogs and cats. *Research Square*, 1, Apr. doi: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-420673/v1>.

Duke-Novakovski, T. (2014). Opioids. In: Egger, C. M.; Love, L. & Doherty T. (Eds). Pain management in veterinary practice (p.41-67). Ames: Wiley Blackwell.

Eckroth, J. R.; Aas-Hansen, O.; Sneddon, L. U.; Bichão, H. & Doving, K. B. (2014). Physiological and behavioural responses to noxious stimuli in the Atlantic cod (*Gadus morhua*). Plos One, 9(6), e-100150. doi: 10.1371/journal.pone.0100150.

Epstein, M. E. Opioids. (2015). In: Gaynor, J. S. & Muir, III W. W. (Eds). Handbook of Veterinary Pain Management. Cap. 9, p.161-195. St Louis: Elsevier. Recurso eletrônico. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-08935-7.00009-0>.

Fantoni, D. T. & Cortopassi, S. G. (2016). Anestesia em cães e gatos. 2.ed. São Paulo: Roca.

Fantoni, D. T. & Mastrocinque, S. (2010). Fisiopatologia e controle da dor agud. In: Fantoni D. T. & Cortopassi, S. R. G. (Eds). Anestesia em Cães e Gatos. (p.522-544). São Paulo: Roca.

Fantoni, D. T. (2011). Tratamento da Dor Clínica de Pequenos Animais. 1.ed. Rio de Janeiro: Elsevier.

Fowler, M. E.; Miller, R. E. (Eds.) (2003). Zoo and Wild Animal Medicine. (5th ed.) Philadelphia: W.B. Saunders Co.

Gaynor, J. S. & Muir, W. W. (2009). Manual de controle da dor em medicina veterinária. 2.ed. São Paulo: MedVet.

Giacomini, A. C. V. V.; Abreu, M. S.; Giacomini, L. V.; Siebel, A. M.; et al. (2016). Fluoxetine and Diazepam acutely modulate stress induced-behavior. Behavioural Brain Research, 296 (1), 301-310, Jan. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.09.027>.

Gholipour, K. H. & Ahadizadeh, S. (2013). Use of propofol as an anesthetic and its efficacy on some hematologicavalues of ornamental fish *Carassius auratus*. SprigerPlus, v. 2, n.76, p. 2–5, Dec. doi:10.1186/2193-1801-2-76.

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

Gomułka, P.; Fornal, E.; Berecka, B.; Szmagara, A. & Ziomek, E. (2015). Pharmacokinetics of propofol in rainbow trout following bath exposure. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 18(1), 147- 152. doi:10.1515/pjvs-2015-0019.

Gomulka, P.; Wlasow, T. & Mirosław, S. (2014). The effect of propofol anaesthesia on haematological and biochemical blood profile of European whitefish. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 14(2), 331-337, June. doi:10.4194/1303-2712-v14\_2\_04.

Gonçalves, B. B. & Giaquinto, P. C. (2020). Propofol and benzocaine anesthetics responses profiles in Nile Tilapia. *International Aquatic Research*, 12(3), 219-225. <http://dx.doi.org/10.22034/iar.2020.1895923.1026>.

Gutstein, H. B. (2001). Opioid analgesics. In: Hardman, J. G.; Limbird, L. E. & Gilman, A. G. (Eds.). *Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis for Therapeutics*. (p. 569–618). New-York: McGraw-Hill.

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

Harms, C. A. & Lewbart, G. A. (2011). The veterinarian's role in surgical implantation of electronic tags in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 21, 25-33. doi:10.1007/s11160-010-9185-3.

International Association for the Study of Pain (IASP). Statement on opioids. Feb. 2018. <https://www.iasp-pain.org/Advocacy/OpioidPositionStatement>.

Iwama, G. K. (2007). The welfare of fish. *Diseases of Aquatic Organisms*, 75, 155–158. doi:10.3354/dao075155.

Kukanich, B. & Wiese, A. J. (2015). Opioids. In: Grimm, K. A.; Lamont, L. A.; Tranquili W. J.; Greene, S. A. & Robertson, S. A. (Eds). *Lumb and Jones Veterinary Anesthesia and Analgesia*. 5th ed. Blackwell: Wiley, p.207-226.

Lopéz-Luna, J.; Canty, M. N.; Al-Jubouri, Q.; Al-Nuaimy, W. & Sneddon, L. U. (2017). Behavioural responses of fish larvae modulated by analgesic drugs after a stress exposure. *Applied Animal Behaviour Science*, 195, 115-120, Oct. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2017.05.021>.

Lumb, W. V. & Jones, E. W. (2017). *Lumb's & Jones anestesiologia e analgesia veterinária*. 5.ed. Rio de Janeiro: Roca.

MacRae, C. A. & Peterson, R. T. (2015). Zebrafish as tools for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14(10), 721–731, Oct. doi: 10.1038/nrd4627.

Magalhães, F. E. A.; Sousa, C. A. P. B.; Santos, S. A. A. R.; Menezes, R. B. et al. (2017). Adult zebrafish (*Danio rerio*): an alternative behavioral model of formalin-induced nociception. *Zebrafish*, 14(5), 422-429, Oct. doi: 10.1089/zeb.2017.1436.

Marques, K. D.; Cavalcanti, L. V.; Nakagomi, C. S.; Santos, A. R. G. & Mergulhão, F. V. (2021). Anestesia e analgesia em peixes teleósteos. *Brazilian Journal of Development*, 7(8), 79603-79608, Aug. doi: 10.34117/bjdv7n8-257.

Martins, T.; Valentim, A.; Pereira, N. & Antunes, L. M. (2018). Anaesthetics and analgesics used in adult fish for research: a review. *Laboratory Animals*, 53(4), 325-341, Dec. doi: 10.1177/0023677218815199.

Mathews, K.; Kronen, P. W.; Lascelles, D.; Nolan, A. et al. (2014). Guidelines for recognition, assessment and treatment of pain. *Journal of Small Animal Practice*, 55(6), E10-E68. doi: 10.1111/jsap.12200.

Melo, S. E. S. F. C.; Yugar-Toledo, J. C.; Coca, A. P. & Moreno Júnior, H. (2004). Hipertensão arterial, aterosclerose e inflamação: o endotélio como órgão-alvo. *Revista Brasileira de Hipertensão*, 14(4), 234-238, out./dez. <http://departamentos.cardiol.br/dha/revista/14-4/06-hipertensao.pdf>.

Mettam, J. J.; Oulton, L. J.; McCrohan, C. R. & Sneddon, L. U. (2011). The efficacy of three types of analgesic drugs in reducing pain in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Applied Animal Behaviour Science*, 133(3-4), 265-274. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2011.06.009>.

Montandon, G. & Slutsky, A. S. (2019). Solving the Opioid Crisis: respiratory depression by opioids as critical end point. *Chest*, 156(4), 653-658, Oct. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chest.2019.05.015>.

Nahar, M. & Deepali, J. (2021). Long-Term Exposure of Alcohol Induced Behavioral Impairments and Oxidative Stress in the Brain Mitochondria and Synaptosomes of Adult Zebrafish. *Zebrafish*, 18(2), 110-124, Mar. <https://doi.org/10.1089/zeb.2020.1913>.

Newby, N. C.; Mendonça, P. C.; Gamperl, K. & Stevens, E. D. (2006). Pharmacokinetics of morphine in fish: winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) and seawater-acclimated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 143(3), 275-283, July. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.03.003>.

Newby, N. C.; Gamperl, A. K. & Stevens, E. D. (2007). Cardiorespiratory effects and efficacy of morphine sulfate in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *American Journal of Veterinary Research*, 68(6), 592–597. doi: <https://doi.org/10.2460/ajvr.68.6.592>.

Newby, N. C. & Stevens, E. D. (2008). The effects of the acetic acid “pain” test on feeding, swimming, and respiratory responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Applied Animal Behaviour Science*, 114(1-2), 260-269, Nov. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2007.12.006>.

Newby, N. C.; Wilkie, M. P. & Stevens, E. D. (2009). Morphine uptake, disposition, and analgesic efficacy in the common goldfish (*Carassius auratus*). *Canadian Journal of Zoology*, 87(5), 388-399, May. <https://doi.org/10.1139/Z09-023>.

Nordgreen, J.; Garner, J. P.; Janczak, A. M.; Ranheim, B.; Muir, W. M. & Horsberg, T. E. (2009). Thermoreception in fish: effects of two different doses of morphine on thermal threshold and post-test behaviour in goldfish (*Carassius auratus*). *Applied Animal Behaviour Science*, 119(1-2), 101-107. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2009.03.015>.

Nordgreen, J.; Tahamtani, F. M.; Janczak, A. M. & Horsberg, T. E. (2014). Behavioural Effects of the Commonly Used Fish Anaesthetic Tricaine Methanesulfonate (MS-222) on Zebrafish (*Danio rerio*) and Its Relevance for the Acetic Acid Pain Test. *PLoS One*, 9(3), e92116, Mar. doi: 10.1371/journal.pone.0092116.

Obirikorang, K. A.; Asante-Tuah, D. T.; Agbo, N. W.; Amponsah, A. K. & Skov, P.V. (2020). Anaesthetic potential of propofol for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Effect of anaesthetic concentration and body weight. *Scientific African*, 10, 1-12, e00595, Nov. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00595>.

Oda, A.; Bailey, K. M.; Lewbart, G. A.; Griffith, E. H. & Posner, L. P. (2014). Physiologic and biochemical assessments of koi (*Cyprinus carpio*) following immersion in propofol. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 245 (11), 1286-1291. doi: 10.2460/javma.245.11.1286.

Oliveira; R. F. & Galhardo, L. (2007). Sobre a aplicação do conceito de bem-estar a peixes teleósteos e implicações para a piscicultura. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 36, 77-86, Suplemento. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982007001000009>.

Otero, P. (2005). *Dor – Avaliação e Tratamento em Pequenos Animais*. 1.ed. São Paulo: Editora Interbook.

Ostrensky, A.; Pedrazzani, A. S. & Vicente, A. L. (2016). Use of MS-222 (tricaine methanesulfonate) and propofol (2,6-diisopropylphenol) as anaesthetics for the *tetra Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae). *Aquaculture Research*, 47, 3477–3488. doi:10.1111/are.12797.

Pedrazzani, A. S.; Castilho, M. F.; Carneiro, P. C. F. & Molento, C. F. M. (2007). Bem-estar de peixes e a questão da senciência. *Archives of Veterinary Science*, 12(3), 60-70. doi: <http://dx.doi.org/10.5380/avs.v12i3.10929>.

Reilly, S. C.; Quinn, J. P.; Cossins, A. R. & Sneddon, L. U. (2008). Behavioural analysis of a nociceptive event in fish: comparisons between three species demonstrate specific responses. *Applied Animal Behaviour Science*, 114(1-2), 248-259, Nov. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2008.01.016>.

Roques, J. A. C.; Abbink, W.; Geurds, F.; van de Vis, H. & Flik, G. (2010). Tailfin clipping, a painful procedure: Studies on Nile tilapia and common carp. *Physiology & Behavior*, 101(4), 533-540, Nov. doi: 10.1016/j.physbeh.2010.08.001.

Roques, J. A. C.; Abbink, W.; Chereau, G.; Fourneyron, A.; Spanings, T.; Burggraaf, D.; Bos, R.V.; Vis, H.V. & Flik, G. (2012). Physiological and behavioral responses to an electrical stimulus in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(4), 1019- 1028. doi: 10.1007/s10695-011-9586-9.

Ross, L. G. & Ross, B. (2008). *Anesthetic and sedative techniques for aquatic animals*. 3rd ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltda.

Roubach, R. & Gomes, L. C. (2001). Uso de anestésicos durante o manejo de peixes. *Panorama da Aquicultura*, ago. <https://panoramadaaquicultura.com.br/o-uso-de-anestesicos-durante-o-manejo-de-peixes>.

Saraiva, J. L.; Nogueirinha, M.; Teodósio, R.; Aragão, C.; Engrola, S. & Arechavala-Lopez, P. (2021). The effect of tank cover on welfare of farmed Nile tilapia. *Applied Animal Behaviour Science*, 241, Aug. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2021.105396>.

Schroeder, P. G. & Sneedon, L. (2016). Exploring the efficacy of immersion analgesics in zebrafish using an integrative approach. *Applied Animal Behaviour Science*, 187, 93-102, Feb. doi:10.1016/j.applanim.2016.12.003.

Selley, D. E.; Cao, C. C.; Sexton, T.; Schwegel, J. A.; Martin, T. J. & Childers S. R. (2001). Mu-Opioid receptor-mediated G-protein activation by heroin metabolites: evidence for greater efficacy of 6-monoacetylmorphine compared with morphine. *Biochemical Pharmacology*, 42(4), 447-455, Aug. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(01\)00689-X](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(01)00689-X).

Smith, J. A. & Boyd, K. M. (1991). *Lives in the Balance: The Ethics of using Animals in Biomedical Research*. Oxford: Oxford University Press.

Sneddon, L. U. (2002). Anatomical and electrophysiological analysis of the trigeminal nerve in a teleost fish, *Oncorhynchus mykiss*. *Neuroscience Letters*, 319(3), 167-171. doi: 10.1016/s0304-3940(01)02584-8.

Sneddon, L. U. (2003). The evidence for pain in fish: the use of morphine as an analgesic. *Applied Animal Behaviour Science*, 83(2), 153-162. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(03\)00113-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(03)00113-8).

Sneddon, L. U.; Braithwaite, V. A. & Gentle, M. J. (2003). Do fishes have nociceptors? Evidence for the evolution of a vertebrate sensory system. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1520), 1115-1121. doi:10.1098/rspb.2003.2349.

Sneddon, L. U. (2009a). Pain perception in fish: indicators and endpoints. *ILAR Journal*, 50(4), 338-342. doi: 10.1093/ilar.50.4.338.

Sneddon, L. U. (2009b). The effects of the acetic acid “pain” test on feeding, swimming, and respiratory responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): A critique on Newby and Stevens (2008). *Applied Animal Behaviour Science*, 116(1), 96–97. [https://www.wellbeingintlstudiesrepository.org/cgi/viewcontent.cgi?article=1069&context=acwp\\_arte](https://www.wellbeingintlstudiesrepository.org/cgi/viewcontent.cgi?article=1069&context=acwp_arte).



Sneddon, L. U.; Wolfenden, D. C. C. & Thomson, J. S. (2016). Stress management and welfare. In: Schreck, C. B.; Tort, L.; Farrell, A. P. & Brauner, C. J. (Eds.). *Biology of stress in fish*. Fish Physiology Series, 35 (p.463–539). New York, NY: Academic Press.

Souza, A. S. L.; Peret, A. C.; Hamoy, M.; Souza, R. A. L.; Torres, M. F. & Barbas, L. A. (2019). Propofol and essential oil of *Nepeta cataria* induce anaesthesia and marked myorelaxation in tambaqui *Colossoma macropomum*: Implications on cardiorespiratory responses. *Aquaculture*, 500(1), 160-169. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.10.017>.

Taddese, A.; Nah, S. Y. & McCleskey, E. W. (1995). Selective opioid inhibition of small nociceptive neurons. *Science*, 270 (5240), 1366–1369, Nov. doi: 10.1126/science.270.5240.1366.

Taylor, J. C.; Dewberry, L. S.; Totsch, S. K.; Yessick, L. R.; DeBerry, J. J.; Watts, S. A. & Sorge, R. E. (2017). A novel zebrafish-based model of nociception. *Physiology & Behavior*, 174, 83-88, May. doi: 10.1016/j.physbeh.2017.03.009.

Tennant, B. (2005). *BSAVA Small Animal Formulary*. (5th ed.). Gloucester: British Small Animal Veterinary Association.

Valença-Silva, G.; Brazb, M.; Barreto, R.; Salvadoric, D. & Volpatoa, G. (2014). Low dose of the anesthetic propofol does not induce genotoxic or mutagenic effects in Nile Tilapia. *Transactions of the American Fisheries Society*, 143(2), 414-419. <https://doi.org/10.1080/00028487.2013.856814>.

Valentim, A. M.; Félix, L. M.; Carvalho, L.; Diniz, E. & Antunes, L. M. (2016). A New Anaesthetic Protocol for Adult Zebrafish (*Danio rerio*): Propofol combined with Lidocaine. *PLoS One*, v. 11, p.1–12.

Van der Salm, A. L.; Martínez, M.; Flik, G. & Wendelaar Bonga, S. E. (2004). Effects of husbandry conditions on the skin colour and stress response of red porgy, *Pagrus pagrus*. *Aquaculture*, 241 (1-4), 371-386, Nov. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.08.038>.

Vitorino, A.; Monteiro, B.; Granado, M. & Esteves, M. (2021). A dor no cão e no gato: classificação e abordagem diagnóstica multifatorial. Universidade de Évora, Portugal. Obtido em: [https://www.researchgate.net/publication/350290451A\\_dor\\_no\\_cao\\_e\\_no\\_gato\\_classificacao\\_e\\_abordagem\\_diagnostica\\_multifatorial](https://www.researchgate.net/publication/350290451A_dor_no_cao_e_no_gato_classificacao_e_abordagem_diagnostica_multifatorial).

Xiong, X.; Liu, Y.; Shan, L.; Xu, Y.; Liang, J.; Lai, Y. & Hsiao, C. (2018). Evaluation of collagen mixture on promoting skin wound healing in zebrafish caused by acetic acid administration. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 505(2), 516-522, Oct. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.09.148>.

Yasui, G. S.; Senhorini, J. A.; Shimoda, E.; Pereira-Santos, M. et al. (2015). Improvement of gamete quality and its short-term storage: an approach for biotechnology in laboratory fish. *Animal*, 9(3), 464-70. doi: 10.1017/S1751731114002511.

Weber, E. S. Fish Analgesia: Pain, Stress, Fear Aversion, or Nociception? *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 14(1), 21-32, Jan. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2010.09.002>.

Wolkers, C. P. B. & Hoffmann, A. (2014). Aquaculture and fish welfare: evidences for fish nociception. *Journal of Aquaculture and Research*, 1(1), 1-2. Obtido em: [https://www.researchgate.net/publication/279930851\\_Aquaculture\\_and\\_Fish\\_welfare\\_Evidences\\_for\\_Fish\\_Nociception](https://www.researchgate.net/publication/279930851_Aquaculture_and_Fish_welfare_Evidences_for_Fish_Nociception).

Zafarlman, M.; Kuo, A.; Gassabian, S. & Smith, M. T. (2018). Progress in understanding mechanisms of opioid-induced gastrointestinal adverse effects and respiratory depression. *Neuropharmacology*, 131, 238-255, Mar. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.12.032>.

Zaig, S.; Scarpellini, C. S. & Montandon, G. (2021). Respiratory depression and analgesia by opioid drugs in freely behaving larval zebrafish. *Medicine Neuroscience*, Mar. doi: 10.7554/eLife.63407.