UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA

**Antinocicepção induzida pelo estresse de
restrição no peixe *Leporinus
macrocephalus***

Carla Patrícia Bejo Wolkers

**Ribeirão Preto
2014**

CARLA PATRICIA BEJO WOLKERS

**Antinocicepção induzida pelo estresse de
restrição no peixe *Leporinus
macrocephalus***

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia

Orientadora: Profa. Dra. Anete Hoffmann

**Ribeirão Preto
2014**

AGRADECIMENTOS

À minha família que me deu a vida, suporte e apoio para vencer esta etapa.

À minha orientadora, Dra. Anete Hoffmann, pelo apoio, carinho e incontáveis ensinamentos compartilhados em todos estes anos de trabalho conjunto.

À professora Dra. Leda Menescal-de-Oliveira, pelos ensinamentos e contribuições para o sucesso deste trabalho, tanto nas bancas de qualificação e defesa, quanto no convívio diário.

Aos demais professores presentes em minha banca de defesa, prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra, prof. Dra. Elisabeth Crisuolo Urbinati e prof. Dr. Katsumasa Hoshino, pelas contribuições imprescindíveis para a finalização deste trabalho, em especial à Beth, minha eterna “mãe científica”, pela orientação, carinho e amizade.

À Cidinha e à Mariuza, pela amizade e auxílio durante todos estes anos.

À Silvana, pela amizade, atenção e auxílio imprescindíveis todos estes anos.

Ao Rubinho, pela amizade e ajuda com a histologia, sem a qual este trabalho não teria sido realizado.

Aos amigos e companheiros de laboratório, Augusto e Fabiana, que estiveram ao meu lado durante toda a realização do trabalho. Em especial ao Augusto, com quem aprendi grande parte dos conhecimentos que levaram à realização deste trabalho.

Aos amigos que mesmo de longe não deixaram de me apoiar nesta jornada. Em especial à Adriana, que sempre me ouviu e apoiou nos momentos de dificuldades, à Mônica e Paola, sempre presentes em todos os meus momentos, à Nathy e a Nani, minhas kapiãs do coração, ao Pudendo, ajudando a dar risada na hora da dificuldade, e a Juliana e a Vanessa, minhas amigas de toda a vida e pra todas as horas.

Ao meu amor, Rafael, pela paciência, carinho e imenso apoio durante estes quatro anos.

*E nossa estória não estará pelo avesso
Assim, sem final feliz
Teremos coisas bonitas pra contar*

*E até lá, vamos viver
Temos muito ainda por fazer
Não olhe pra trás
Apenas começamos
O mundo começa agora
Apenas começamos”.*

(Renato Russo)

ÍNDICE

Resumo	1
Abstract	3
1. INTRODUÇÃO	5
1.1. Fisiologia da dor	7
1.2. Controle endógeno da dor	12
1.3. Aspectos filogenéticos da nocicepção	15
1.4. Nocicepção e dor em peixes	16
1.4.1. Nociceptores	17
1.4.2. Processamento da informação nociceptiva: medula espinal	19
1.4.3. Estruturas encefálicas	20
1.4.4. Respostas nociceptivas em peixes	24
1.4.5. Sistema opioide	26
1.4.6. Sistema canabinoide	29
1.4.7. Percepção da dor em peixes	31
2. OBJETIVOS	34
2.1. Objetivos gerais.....	34
2.2. Objetivos específicos.....	35
3. MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1. Espécie estudada e condições de manutenção laboratorial	36
3.2. Drogas utilizadas	37
3.3. Teste nociceptivo	38
3.4. Estresse de restrição	39
3.5. Análises comportamentais.....	40
3.6. Procedimentos cirúrgicos	41
3.6.1. Anestesia	41
3.6.2. Implantação da cânula-guia no telencéfalo dorsomedial.....	41
3.6.3. Microinjeção central de drogas	43
3.6.4. Histologia	44

3.7.Procedimentos experimentais	46
3.8.Análise estatística	74
4. RESULTADOS	75
5. DISCUSSÃO	100
6. CONCLUSÃO	115
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117
8. ANEXO 1	131

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1. Secção do ramo maxilar do nervo trigeminal da truta mostrando a presença de fibras do tipo Aδ e C.....	19
---	----

MATERIAL E MÉTODOS

Figura 2. Região onde foi aplicada a injeção subcutânea de formalina a 3%	38
Figura 3. Juvenil de <i>Leporinus macrocephalus</i> sendo submetido ao estresse de restrição.	39
Figura 4. Caixa cirúrgica confeccionada em acrílico com o prendedor de cabeça e o micromanipulador para a realização dos procedimentos estereotáxicos	43
Figura 5. Corte coronal (esquerda) e representação esquemática (direita) do telencéfalo de <i>L.macrocephalus</i> demonstrando o local onde a cânula guia foi inserida e a droga foi aplicada.....	45
Figura 6. Corte coronal do telencéfalo de <i>L.macrocephalus</i> demonstrando o local da lesão eletrolítica no telencéfalo dorsomedial.....	45
Figura 7. Desenho esquemático da sequência experimental do Experimento 1.....	47
Figura 8. Desenho esquemático da sequência experimental do Experimento 2.....	49
Figura 9. Desenho esquemático da sequência experimental do Experimento 3 – Sistema opioide.....	51
Figura 10. Desenho esquemático da sequência experimental do Experimento 3 – Sistema canabinoide.....	54
Figura 11. Desenho esquemático da sequência experimental do Experimento 4 – Sistema opioide.....	57
Figura 12. Desenho esquemático da sequência experimental do Experimento 4 – Sistema canabinoide.....	60

Figura 13. Desenho esquemático da sequência experimental do Experimento 5 - Midazolan.....	63
Figura 14. Desenho esquemático da sequência experimental do Experimento 5 – Flumazenil + Midazolan.	66
Figura 15. Desenho esquemático da sequência experimental do Experimento 6 - Midazolan.	69
Figura 16. Desenho esquemático da sequência experimental do Experimento 6 – Flumazenil + Midazolan.	72

RESULTADOS

Figura 17. Concentração de cortisol sérico (ng.mL^{-1}) em piauçu (<i>Leporinus macrocephalus</i>) submetidos ao estresse de restrição de 3 e 5 minutos.....	76
Figura 18. Efeito de diferentes tempos de estresse de restrição sobre a atividade locomotora do piauçu (<i>Leporinus macrocephalus</i>) submetido a um estímulo nocivo (formalina a 3% subcutaneamente).....	79
Figura 19. Análise temporal do efeito do estresse de restrição de 3 minutos sobre a atividade locomotora de <i>L. macrocephalus</i> submetido a injeção subcutânea de formalina a 3%.....	82
Figura 20. Análise temporal do efeito do estresse de restrição de 5 minutos sobre a atividade locomotora de <i>L. macrocephalus</i> submetido a injeção subcutânea de formalina a 3%.....	83
Figura 21. Efeito da injeção sistêmica de naloxona (30 mg.kg^{-1}) sobre a atividade locomotora do piauçu (<i>Leporinus macrocephalus</i>) submetido ao estresse de restrição de 3 minutos seguido de um estímulo nocivo (formalina a 3% subcutaneamente).....	85
Figura 22. Efeito da injeção sistêmica de AM251 (3 mg.kg^{-1}) sobre a atividade locomotora do piauçu (<i>Leporinus macrocephalus</i>) submetido ao estresse de restrição de 3 minutos seguido de um estímulo nocivo (formalina a 3% subcutaneamente).....	87
Figura 23. Efeito da injeção sistêmica de naloxona (30 mg.kg^{-1}) sobre a atividade locomotora do piauçu (<i>Leporinus macrocephalus</i>) submetido ao estresse de restrição de 5 minutos seguido de um estímulo nocivo (formalina a 3% subcutaneamente).....	89

Figura 24. Efeito da injeção sistêmica de AM251 (3 mg.kg^{-1}) sobre a atividade locomotora do piauçu (*Leporinus macrocephalus*) submetido ao estresse de restrição de 5 minutos seguido de um estímulo nocivo (formalina a 3% subcutaneamente)..... 91

Figura 25. Efeito da microinjeção de midazolan (40 e 80 nmol; 0,01 μl) no telencéfalo dorsomedial sobre a atividade locomotora do piauçu (*Leporinus macrocephalus*) submetido ao estresse de restrição de 3 minutos seguido de um estímulo nocivo (formalina a 3% subcutaneamente)..... 93

Figura 26. Bloqueio (microinjeção de flumazenil 80 e 160 nmol, 0,01 μl) da microinjeção de midazolan (40 e 80 nmol; 0,01 μl) no telencéfalo dorsomedial sobre a atividade locomotora do piauçu (*Leporinus macrocephalus*) submetido ao estresse de restrição de 3 minutos seguido de um estímulo nocivo (formalina 3% subcutaneamente)..... 95

Figura 27. Efeito da microinjeção de midazolan (40 e 80 nmol; 0,01 μl) no telencéfalo dorsomedial sobre a atividade locomotora do piauçu (*Leporinus macrocephalus*) submetido ao estresse de restrição de 5 minutos seguido de um estímulo nocivo (formalina a 3% subcutaneamente)..... 97

Figura 28. Bloqueio (microinjeção de flumazenil 80 e 160 nmol, 0,01 μl) da microinjeção de midazolan (40 e 80 nmol; 0,01 μl) no telencéfalo dorsomedial sobre a atividade locomotora do piauçu (*Leporinus macrocephalus*) submetido ao estresse de restrição de 5 minutos seguido de um estímulo nocivo (formalina 3% subcutaneamente)..... 99

RESUMO

WOLKERS, C.P.B. **Antinociceção induzida pelo estresse de restrição no peixe *Leporinus macrocephalus***. Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2014.

A atribuição da percepção da dor pelos peixes é um assunto controverso no meio científico. Alguns autores associam a percepção da dor a estruturas neocorticais que estão ausentes em peixes. Entretanto, estudos recentes têm demonstrado que os peixes são capazes de perceber e responder a estímulos nocivos de maneira semelhante ao que é observado em mamíferos, sendo estas respostas sensíveis à administração de morfina. Além disso, estudos pioneiros de nosso laboratório demonstraram a existência de um sistema analgésico endógeno em peixes. O objetivo deste estudo foi avaliar se este sistema analgésico endógeno pode ser ativado pelo estresse. A natureza neuroquímica deste sistema e a participação de uma região telencefálica, o telencéfalo dorsomedial (Dm), na modulação da antinociceção também foram investigados.

Nossos dados demonstram que o estresse de restrição de 3 e 5 minutos de duração inibe a resposta comportamental à injeção subcutânea de formalina a 3% na região da nadadeira adiposa no peixe *Leporinus macrocephalus*, sugerindo que este procedimento é capaz de ativar um sistema antinociceptivo endógeno. Além disso, a antinociceção induzida pelo estresse de restrição de 3 e 5 min é de curta duração, sendo observada apenas por 5 min após o término da restrição.

A análise da natureza neuroquímica da antinociceção induzida pelo estresse de restrição revelou participação do sistema opióide e canabinoide na modulação desta resposta. O tratamento prévio com injeção intraperitoneal de naloxona (30 mg.kg^{-1}), um antagonista opioide não seletivo, bloqueou a antinociceção induzida pela restrição de 3 min de duração, mas não foi capaz de inibir a antinociceção induzida pela restrição de 5 min de duração. Já o tratamento prévio com injeção intraperitoneal de AM251 (3 mg.kg^{-1}), um antagonista de receptores canabinoides tipo 1, bloqueou a antinociceção induzida pelo estresse de restrição de 3 e 5 min de duração, sugerindo que o sistema canabinoide desempenha um papel fundamental na antinociceção induzida por esta modalidade de estresse na espécie estudada.

Nosso estudo também demonstrou que a região do telencéfalo dorsomedial está envolvida na modulação da antinociceção induzida pelo estresse de restrição no peixe *L. macrocephalus*. A microinjeção de midazolan (40 e 80 nmol), um agonista de receptores benzodiazepínicos, no telencéfalo Dm bloqueou a antinociceção induzida pela restrição de 3 e 5 min de duração. Além disso, o tratamento prévio com flumazenil (80 e 160 nmol), um antagonista específico de receptores benzodiazepínicos, inibiu os efeitos do tratamento com midazolan, demonstrando que o bloqueio da antinociceção

promovido pelo midazolan ocorre pela ativação específica dos receptores benzodiazepínicos.

Juntos estes resultados trazem novas perspectivas acerca do entendimento sobre a percepção nociceptiva em peixes. Este é o primeiro trabalho que traz evidências acerca da existência de um sistema de modulação da dor ativado pelo estresse e demonstra a participação de uma região encefálica específica na modulação desta antinocicepção. Estes resultados indicam que as vias analgésicas endógenas em peixes são ativadas de maneira semelhante aos mamíferos, sugerindo que estes animais possuem um processamento complexo da informação nociceptiva.

ABSTRACT

WOLKERS, C.P.B. **Restraint stress-induced antinociception in the fish *Leporinus macrocephalus***. Doctoral Thesis – Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 2014.

The assignment of pain perception by fish is controversial among scientists. Some authors associate the pain perception to neocortical structures that are absent in fish. However, recent studies have shown that fish are able to perceive and respond to noxious stimuli, similar to observed in mammals, and this responses are sensitive to morphine administration. Furthermore, pioneering studies from our laboratory have demonstrated the existence of an endogenous analgesic system in fish. This study aimed to evaluate if this endogenous analgesic system can be activated by stress, the neurochemical nature of this system and involvement of a telencephalic region, the dorsomedial (Dm) telencephalon, in the antinociception modulation.

Our data demonstrate that 3 and 5 min of restraint stress inhibits the behavioral response to subcutaneous injection of formalin 3 % in the adipose fin in the fish *Leporinus macrocephalus*, suggesting that this procedure can activate an endogenous antinociceptive system. Furthermore, stress-induced antinociception induced by 3 and 5 min of restraint is short, with the antinociceptive effects being observed only for 5 min after the restriction.

The analysis of the neurochemical nature of antinociception induced by restraint stress revealed the involvement of opioid and cannabinoid systems in the modulation of this response. The pre-treatment with intraperitoneal injection of naloxone (30 mg.kg⁻¹), a non-selective opioid receptors antagonist, blocked the antinociception induced by 3 min of restraint, but was not able to inhibit the antinociception induced by 5 min of restraint. The pre-treatment with intraperitoneal injection of AM251 (3 mg.kg⁻¹), a type 1 cannabinoid receptors antagonist, blocked the stress-induced antinociception promoted by 3 and 5 min of restraint, suggesting that the cannabinoid system plays a critical role in this type of stress-induced antinociception in the studied species.

Our study also showed that the dorsomedial telencephalon is involved in the modulation of stress-induced antinociception in fish *L. macrocephalus*. The microinjection of midazolam (40 and 80 nmol), an benzodiazepine receptors agonist, in the Dm blocked the stress-induced antinociception promoted by 3 and 5 min of restraint. Furthermore, pre-treatment with flumazenil (80 and 160 nmol), a benzodiazepine receptors selective antagonist, inhibited the effects of the midazolam

treatment, demonstrating that the antinociception blockade by midazolan is promoted by specific activation of benzodiazepine receptors.

Together these results provide new insights on the understanding of nociceptive perception in fish. This is the first study that demonstrates evidence for the existence of a pain modulation system activated by stress in fish and demonstrates the involvement of a specific brain region in the modulation of this antinociception. These results indicate that the endogenous analgesic pathways in fish are activated in a similar manner to mammals, suggesting that these animals have a complex processing of nociceptive information.

1. INTRODUÇÃO

A dor é uma submodalidade da sensação somática que tem uma importante função protetiva. Ela alerta o organismo sobre uma injúria real ou iminente induzindo respostas somáticas e autonômicas apropriadas para a proteção do organismo (BASBAUM & JESSEL, 2000; JULIUS & BASBAUM, 2001). Segundo o Comitê da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), a dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável associada à lesão tecidual real ou potencial ou, ainda, descrita em termos dessa lesão. Sendo assim, a dor é uma experiência sensorial complexa que envolve não somente a percepção e a transdução de um estímulo nocivo ambiental, mas também um processo cognitivo e emocional (JULIUS & BASBAUM, 2001).

A dor não é resultado de um único evento, mas de um conjunto de eventos que se inicia por meio da ativação de terminais de neurônios sensitivos primários periféricos, a transmissão do sinal nociceptivo para o encéfalo, o processamento nociceptivo em áreas distintas do encéfalo, e, finalmente, a conversão da informação nociceptiva em percepção da dor. Dessa forma, a atividade induzida nos nociceptores e nas vias nociceptivas pelo estímulo nocivo ainda não pode ser considerada dor. Apenas a interpretação do sinal nociceptivo no encéfalo, sob influência de fatores cognitivos e emocionais, transforma a nocicepção em dor (SEGNER, 2012).

Sendo assim, descrever a dor como uma *experiência* (IASP) separa a dor da nocicepção. A nocicepção é um processo neural que envolve a transdução e transmissão de um estímulo nocivo ao encéfalo por vias ascendentes de dor. Já a dor seria o

resultado de uma complexa interrelação entre sistemas sinalizadores, modulação de centros superiores e uma percepção individual única (STEEDS, 2013).

Nossa percepção de dor é fortemente influenciada pela nossa experiência, e surge a questão do que a dor realmente significa quando transferimos este conceito para os animais. A experiência de dor nos animais será qualitativamente diferente da sensação de dor que nós, humanos, sentimos. Dessa maneira, quando nos referimos à dor animal, não podemos nos ater à definição de dor dada pela IASP, que se refere a humanos. Quando falamos em dor em peixes, nós estamos lidando com uma forma qualitativamente diferente de experiência, provavelmente mais primitiva e simples (SEGNER *et al.*, 2012). Sendo assim, quando nos referimos à dor em animais, a definição proposta por Molleny (1997) pode ser mais apropriada que a definição da IASP:

“A dor animal é uma experiência sensorial aversiva, representando a consciência, pelo animal, de dano ou ameaça à integridade dos tecidos. Promove mudanças na fisiologia e comportamento do animal, buscando reduzir ou evitar os danos, a probabilidade de repetição e promover recuperação.”

Uma das maiores dificuldades de se avaliar a percepção da dor em animais é a definição dos parâmetros a serem usados como indicadores de dor. Como a verbalização da dor não é possível, para avaliar se um animal sente dor a pesquisa se apoia em uma abordagem comparativa, avaliando similaridades e continuidades entre estruturas e funções que estão envolvidas com a percepção da dor em humanos e estruturas e funções correspondentes nos animais. Esta abordagem inclui analogias e homologias neuroanatômicas, neurofisiológicas e de respostas comportamentais frente a estímulos potencialmente dolorosos. Entretanto, a interpretação destes dados pode ser equivocada;

intuitivamente, essa abordagem pode funcionar para espécies que estão próximas do homem, como os primatas, mas fica cada vez mais difícil quanto mais distante evolutivamente é a espécie. Sendo assim, a controvérsia sobre a existência de percepção da dor em animais como peixes está relacionada, principalmente, a essa dificuldade (BATESON, 1991).

1.1. Fisiologia da dor

A percepção de um estímulo nocivo se inicia por meio da ativação de terminais periféricos de neurônios sensitivos primários, denominados nociceptores, localizados na região do tronco e membros e na região da cabeça, cujos corpos celulares estão localizados no gânglio da raiz dorsal do nervo espinal e no gânglio trigeminal, respectivamente (BASBAUM & JESSEL, 2000). A existência dos nociceptores foi descrita há mais de um século por Sherrington (1906). Estes receptores possuem propriedades biofísicas e moleculares que permitem detectar e responder seletivamente a estímulos potencialmente prejudiciais, sendo ativados apenas quando a intensidade do estímulo atinge a faixa nociva, sem responder, contudo, a estímulos inócuos como calor ou toque leves (BURGESS & PERL, 1967; BASBAUM *et al.*, 2009).

Com base em critérios anatômicos e funcionais, nos mamíferos as fibras destes neurônios sensitivos primários são classificadas em dois tipos:

a) Fibras do tipo C: As fibras do tipo C são amielínicas, de pequeno diâmetro, e com velocidade de condução na faixa de 0,5 a 2,0 m/s e respondem a estímulos térmicos, mecânicos e químicos, sendo, por isso, denominadas de polimodais.

Correspondem a 80% das fibras envolvidas na condução da mensagem nociceptiva e são responsáveis pela dor de duração lenta ou secundária, estando relacionadas com a dor crônica, difusa e de difícil localização (MILLAN, 1999; JULIUS & BASBAUM, 2001; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 2008a). Há, ainda, uma classe de aferentes amielínicos, denominados nociceptores silenciosos, que são responsivos ao calor, mas insensíveis a estímulos mecânicos, porém desenvolvem sensibilidade a estes apenas em caso de injúria tecidual (SCHMIDT *et al.*, 1995).

b) Fibras do tipo Aδ: As fibras do tipo Aδ são mielinizadas, de diâmetro médio, com velocidade de condução entre 5 e 30 m/s (MILLAN, 1999; JULIUS & BASBAUM, 2001), correspondem a 20% das fibras e são responsáveis pela dor rápida ou primária. Trata-se de uma dor aguda, bem localizada e discriminativa, resultante de um estímulo pontual (MILLAN, 1999; JULIUS & BASBAUM, 2001; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 2008a). As fibras Aδ podem ser divididas em dois tipos: Tipo I (nociceptores mecânicos de alto limiar) – respondem a estímulos químicos e mecânicos, e possuem limiares de temperatura relativamente altos (> 50°C); e Tipo II – possuem um limiar para calor mais baixo, mas um limiar mecânico bastante alto (RAJA *et al.*, 1999).

Os estímulos de alta intensidade são detectados pelos nociceptores, transduzidos em sinais eletroquímicos (potenciais de ação) e conduzidos ao sistema nervoso central para o processamento da informação nociceptiva. Os nociceptores que inervam a cabeça conduzem a informação ao núcleo espinal do nervo trigêmeo e os nociceptores que inervam os membros e o tronco conduzem a informação até o corno dorsal da medula espinal (MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 2008a). A organização laminar dos neurônios no corno dorsal da medula espinal é muito precisa. Os neurônios nociceptivos estão

localizados principalmente na camada marginal (lâmina I) e na substância gelatinosa (lâmina II) e recebem entrada direta de fibras A δ e C. A lâmina I é composta principalmente por neurônios que respondem exclusivamente a estimulação nociva, denominados neurônios nociceptivos específicos, que se projetam para estruturas supra espinhais, e por neurônios de ampla faixa dinâmica, que respondem de maneira graduada a estímulos mecânicos nocivos e não nocivos. A lâmina II é composta quase exclusivamente por interneurônios (tanto excitatórios quanto inibitórios), alguns dos quais respondem apenas a entradas nociceptivas enquanto outros respondem também a estímulos não nocivos. A lâmina V contém primariamente neurônios de ampla faixa dinâmica que projetam para o tronco encefálico e para regiões do tálamo. Eles também recebem entrada de fibras C, tanto diretamente em seus dendritos, os quais se estendem dorsalmente no corno dorsal superficial ou indiretamente via interneurônios excitatórios que recebem entrada de fibras C. Muitos neurônios na lâmina V também recebem entrada nociceptiva de estruturas viscerais (BASBAUM & JESSEL, 2000).

A transmissão sináptica entre os aferentes sensoriais primários e os neurônios do corno dorsal da medula é mediada por neurotransmissores químicos, sendo que o principal neurotransmissor excitatório liberado por fibras A δ e C, bem como por aferentes não-nociceptivos, é o aminoácido glutamato. A liberação de glutamato a partir de terminais sensoriais evoca potenciais de ação rápidos nos neurônios do corno dorsal da medula espinal pela ativação de receptores glutamatérgicos do tipo AMPA. As fibras aferentes primárias de neurônios nociceptivos também induzem potenciais excitatórios pós-sinápticos lentos nos neurônios do corno dorsal da medula, pela liberação de transmissores peptídicos. Um dos principais neuropeptídeos presentes nos neurônios sensoriais nociceptivos é a Substância P, que é liberada por fibras C em resposta a

danos teciduais ou à estimulação intensa de nervos periféricos. O glutamato e os neuropeptídeos são liberados juntos nos terminais aferentes primários e tem ações fisiológicas distintas nos neurônios pós-sinápticos, mas agem coordenadamente para regular as propriedades de disparo dos neurônios pós-sinápticos. Os neuropeptídeos, incluindo a substância P, aumentam e prolongam as ações do glutamato (BASBAUM & JESSEL, 2000).

Os neurônios de projeção das lâminas I e V do corno dorsal da medula espinal constituem a principal saída da medula para o encéfalo (BASBAUM & JESSEL, 2000). Estes neurônios são origem de múltiplas vias, incluindo a vias espinotalâmicas que carregam as informações nociceptivas para o encéfalo. Os axônios dos neurônios nociceptivos no corno dorsal da medula espinal cruzam a linha média e deixam a substância cinzenta medular para entrar na substância branca do funículo ântero-lateral e então se projetam para os núcleos do tálamo. A via ascendente espinotalâmica compreende os tratos neoespinotalâmico ou trato espinotalâmico lateral e paleoespinotalâmico ou trato espinotalâmico medial:

a) Trato neoespinotalâmico: O trato neoespinotalâmico ascende pela substância branca do funículo ântero-lateral da medula espinal e alcança os núcleos talâmicos ventral posterior lateral (VPL) e certos núcleos talâmicos mediais (VPM), que, por sua vez, se projetam para o córtex somatosensorial (RUSSO *et al.*, 1998; PURVES *et al.*, 2001; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 2008a). Do ponto de vista evolutivo, o trato neoespinotalâmico é recente, sendo encontrado apenas em vertebrados derivados, como os mamíferos. Apresenta poucas sinapses ao longo do seu trajeto ascendente, conduzindo as informações nociceptivas com alta velocidade; está envolvido na

transmissão da dor rápida ou aguda relacionada com o componente sensorial-discriminativo da dor (MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 2008a).

b) Trato paleoespinotalâmico: O trato paleoespinotalâmico também ascende pelo funículo ântero-lateral e seus axônios se projetam por meio de colaterais para estruturas de vários níveis do encéfalo antes de alcançar os núcleos mediais do tálamo (Núcleo central lateral (CL), núcleo parafascicular (P_F), porção ventrocaudal médio-dorsal (MD_{VC}) e complexo posterior medial (VM_{PO})). Essas estruturas encefálicas incluem núcleos da formação reticular do tronco encefálico inferior (trato espinorreticular), do mesencéfalo, como a substância cinzenta periaqueductal (trato espinomesencefálico) e do hipotálamo (trato espino-hipotalâmico). Assim, o trato paleoespinotalâmico transmite informações nociceptivas para várias regiões supraespinhais relacionadas com diferentes funções. Nos núcleos mediais do tálamo, ocorrem as sinapses com os neurônios de terceira ordem, que se projetam para o córtex do cíngulo e a ínsula. O trato paleoespinotalâmico é filogeneticamente mais antigo, aparecendo nos répteis; porém, nesses animais não existe essa projeção cortical. Além disso, é multissináptico, conduz as informações nocivas à baixa velocidade e está relacionado com a dor lenta ou crônica (RUSSO *et al.*, 1998; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 2008a). Ele está envolvido com o componente afetivo-motivacional da dor.

O tálamo é uma área chave para o processamento da informação somatosensorial. Os axônios que trafegam nos tratos espinotalâmicos lateral e medial terminam em seus respectivos núcleos lateral e medial, e se projetam, a partir daí, para os córtex somatosensoriais primários e secundários, a ínsula, o córtex cíngulo anterior e o córtex “pré-frontal”. Essas regiões desempenham várias funções na percepção da dor e também interagem com outras áreas do encéfalo, como por exemplo, o cerebelo e

os núcleos basais (STEEDS, 2013). Não há uma única região do encéfalo essencial para a dor (APKARIAN *et al.*, 2005). Ao contrário, a dor resulta da ativação de um grupo distribuído de estruturas, algumas mais associadas às propriedades sensório-discriminativas (como o córtex somatosensorial) e outras com aspectos emocionais (como o córtex do giro do cíngulo anterior e córtex insular) (BASBAUM *et al.*, 2009).

Mais recentemente foram descobertos tratos ascendentes que trafegam contralateralmente pelo funículo dorsolateral da medula espinal que também estão envolvidos na transmissão de informação nociceptiva. Os principais tratos que trafegam por esta via são o trato espino-parabrâquio-amigdalóide, que se projeta para a região do núcleo parabraquial e complexo amigdalóide, e o trato espino-parabrâquio-hipotalâmico, que se projeta para o núcleo parabraquial e hipotálamo. Ambos se originam de neurônios nociceptivos específicos da lâmina I da medula espinal, cujos axônios cruzam para o lado contralateral e ascendem pelo funículo dorsolateral. Estes tratos estão envolvidos com respostas relativas ao componente afetivo-motivacional da dor e na elaboração de respostas autonômicas e endócrinas que acompanham a percepção da dor (MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 2008a).

1.2. Controle endógeno da dor

Um importante mecanismo usado pelos animais em situações de emergência é a redução da capacidade de perceber a dor (MENESCAL-DE-OLIVEIRA & HOFFMANN, 1993). Em situações de confronto agonístico, em que é imprescindível a mobilização de mecanismos de defesa, dominância ou de adaptação a circunstâncias

extremas e ameaçadoras detectadas no ambiente, o recrutamento de um sistema capaz de modular ou suprimir a dor pode ser necessário (FREITAS, 2005). Esse sistema, denominado analgésico endógeno, é de suma importância, uma vez que inibe reações comportamentais recuperativas que seguem a percepção da dor que poderiam ser extremamente desvantajosas para a sobrevivência do indivíduo em casos de confronto agonístico ou de confronto entre presas e predadores.

O encéfalo possui circuitos modulatórios cuja principal função é regular a percepção da dor. Vários sistemas modulatórios dentro do sistema nervoso afetam as respostas a estímulos nocivos (BASBAUM & JESSEL, 2000). Estes sistemas modulatórios originam vias descendentes, a partir de regiões do tronco cerebral, que modulam a entrada da informação nociceptiva na medula espinal. Dentre estas regiões destacam-se a substância cinzenta periaqueductal (PAG), o núcleo magno da rafe e o grupo de células adjacentes ao bulbo rostroventromedial (RVM), que, juntamente com outras regiões que a elas se projetam, compõem o sistema de modulação da dor (HOFFMAN, 2008; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 2008a, BUTLER & FINN, 2009). As regiões do sistema de analgesia endógena emitem projeções para o corno dorsal da medula espinal onde convergem informações inibitórias de sistemas descendentes sobre os neurônios envolvidos na transmissão nociceptiva (MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 2008a). Há vários neurotransmissores envolvidos em diferentes níveis do SNC na modulação da informação nociceptiva tais como opioides endógenos, neuropeptídeos, serotonina, noradrenalina, glicina, aspartato, dopamina e acetilcolina.

A primeira evidência experimental da existência de um sistema analgésico endógeno foi reportada por Reynolds (1969), o qual verificou que a estimulação elétrica do tronco encefálico, incluindo a substância cinzenta periaqueductal do mesencéfalo produzia uma potente analgesia em ratos acordados submetidos à cirurgia abdominal.

Esses animais não apresentaram nenhuma manifestação comportamental ou motora relacionada à dor. Em um ambiente natural ou em condições experimentais, o sistema analgésico endógeno pode ser ativado por diferentes formas de estresse relacionadas à situações de risco como: presença de um predador natural, ou mesmo o odor de um co-específico, restrição física, rotação, restrição alimentar, desidratação, isolamento, conflito social, choque elétrico, natação forçada, estímulo auditivo intenso, dentre outros (RODGERS & RANDALL, 1987).

Sendo assim, o sistema analgésico endógeno pode ser mobilizado em situações de estresse, medo ou durante confrontos onde há riscos de injúrias para o animal. Segundo Butler e Finn (2009), em mamíferos, a analgesia induzida pelo estresse é uma resposta de supressão da dor que ocorre durante ou após a exposição a um estímulo estressante ou de medo. A analgesia induzida pelo estresse pode ser descrita como um componente do comportamento defensivo. Em uma situação de confronto, a dor poderia não ser útil à sobrevivência do organismo se houver ameaça de morte (MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 2008b; BUTLER & FINN, 2009).

Uma série de regiões encefálicas está envolvida na ativação deste sistema, sendo que a região do complexo amigdalóide tem um papel primordial na sinalização da dor, nas respostas de medo inato e condicionado e na analgesia endógena. Juntamente com o hipotálamo, o complexo amigdalóide medeia a resposta de analgesia endógena durante essas situações que envolvem medo e estresse, enviando informações a regiões do tronco encefálico, como a PAG e o RVM, que, por sua vez, se projetam para a medula espinal (MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 2008b; BUTLER & FINN, 2009).

Atualmente, estudos demonstram que as mesmas regiões que estão envolvidas na analgesia endógena também podem facilitar a transmissão da dor, promovendo pró-nocicepção. Na pró-nocicepção as projeções descendentes da medula espinal

provenientes do tronco encefálico promovem a facilitação da transmissão da informação dolorosa no corno dorsal da medula espinal (MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 2008a). Embora a pró-nocicepção tenha sido mais profundamente estudada a partir da década de 90, as primeiras evidências deste fenômeno foram obtidas em estudo realizado em nosso departamento na década de 70. Este estudo demonstrou que a estimulação elétrica do complexo amigdalóide, stria terminalis, hipocampo e septum pode gerar tanto efeitos analgésicos quanto pró-nociceptivos em cobaias, dependendo do local de aplicação dentro da região e da frequência de estimulação (LICO *et al.*, 1974).

1.3. Aspectos filogenéticos da nocicepção

A nocicepção parece ter surgido cedo na escala evolutiva. A habilidade de responder a um estímulo nocivo está presente em todos os animais (LEÓN-OLEA, 1993), porém o grau de mobilização do organismo em resposta ao estímulo é variável e depende da evolução do sistema nervoso, podendo manifestar-se como um ato reflexo comandado pela medula espinal ou por um sistema ganglionar, no caso dos invertebrados, ou por experiência emocional, no caso dos humanos (HOFFMANN, 2008). Estudos demonstram que, até mesmo os invertebrados como os caramujos do gênero *Megalobulimus* apresentam respostas a estímulos nocivos, sugerindo que a nocicepção já estaria presente neste grupo de animais (ROMERO *et al.*, 1994; ACHAVAL *et al.*, 2005).

Por outro lado, a dor se refere a uma experiência emocional mais complexa. Ela é experimentada pelo sistema nervoso que, frente à informação nociceptiva, elabora

respostas e sensações que variam em função da diferenciação do sistema em cada espécie, sendo que os animais que apresentam um sistema nervoso mais complexo são dotados do componente subjetivo (HOFFMANN, 2008).

1.4. Nocicepção e dor em peixes

A percepção da dor em vertebrados não-mamíferos é um assunto controverso no meio científico. Alguns pesquisadores sugerem que a presença de estrutura neocortical seria condição *sine qua non* para a percepção da dor (ROSE, 2002; ROSE, 2007; ROSE *et al.*, 2012; ARLINGHAUS *et al.*, 2007). Nessa perspectiva, apenas os mamíferos seriam capazes de perceber a dor. Estes autores se baseiam no fato de que, no homem o neocórtex tem importância central na percepção consciente da dor. Entretanto, a percepção da dor no homem não é exclusivamente associada com o neocórtex, envolvendo também regiões subcorticais e do tronco encefálico, que tem estruturas homólogas no encéfalo do peixe. Além disso, a ausência de neocórtex não é suficiente para concluir a ausência de funções associadas ao neocórtex, já que espécies não-mamíferas podem possuir regiões análogas realizando estas funções (SEGNER, 2012).

A percepção da dor envolve tanto os nociceptores periféricos, para detecção e transdução do estímulo nocivo, quanto as estruturas centrais, para a conversão dos sinais nociceptivos em um estado emocional percebido. Sendo assim, quando avaliamos a habilidade de um animal em sentir dor, é necessário considerar, inicialmente, se o animal possui um sistema neuroanatômico para a nocicepção e a percepção da dor. Para Bateson (1991), os principais critérios para se determinar se um animal é capaz de

experienciar a dor são: a presença de nociceptores, presença de estruturas encefálicas e vias de condução para essas estruturas, substâncias opioides endógenas e respectivos receptores, redução da resposta nociceptiva em resposta a analgésicos, aprendizado de evitação e suspensão do comportamento normal.

Passaremos a examinar a ocorrência de itens relacionados a estes critérios na tentativa de traçar um panorama atual da nocicepção em não-mamíferos, sobretudo em peixes.

1.4.1. Nociceptores

A presença de terminações nervosas livres na pele de peixes, semelhantes aos nociceptores, foi descrita pela primeira vez na década de 70 (WHITEAR, 1971), entretanto, a primeira evidência funcional relacionada a presença de nociceptores em peixes só foi demonstrada recentemente no início dos anos 2000. Estudos anatômicos e neurofisiológicos do nervo trigêmeo da truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) demonstraram a presença de fibras do tipo A β , A δ e C, também presentes nos mamíferos. As fibras A δ foram mais abundantes, representando 1/3 de todas as fibras presentes. As fibras amielínicas C foram encontradas em pequenos grupos frequentemente associadas a células de Schwann e compreendiam aproximadamente 4% das fibras, ao contrário de mamíferos onde elas compreendem aproximadamente 50% do total de fibras (SNEDDON, 2002; SNEDDON 2003b; SNEDDON 2003c) (Figura 1). De acordo com Sneddon (2004) o número reduzido de fibras C em peixes em relação aos mamíferos pode ser explicado evolutivamente pela passagem do modo de vida

aquático para o terrestre. Os vertebrados terrestres estão sujeitos a um maior risco de injúria devido à força da gravidade, gases nocivos, temperaturas extremas. No ambiente aquático a flutuação contém a gravidade, as substâncias químicas podem ser diluídas e não existem grandes variações de temperatura como acontece no ambiente terrestre.

Estudos eletrofisiológicos demonstraram, ainda, que a aplicação de estímulos nocivos como pressão, calor e químicos irritantes (ácido acético) é capaz de induzir a ativação dos nociceptores trigeminais, demonstrando que estas fibras com características morfológicas de nociceptores, realmente respondem como nociceptores aos estímulos nocivos (SNEDDON, 2002; SNEDDON, 2003 a, b, SNEDDON, 2004). Foram encontrados nociceptores polimodais de adaptação lenta à estimulação mecânica e que respondem ao calor e ao estímulo químico nocivos, sendo este tipo de receptor predominante na área analisada. Foram, ainda, encontrados nociceptores mecanotermiais e mecanoquímicos (SNEDDON *et al.*, 2003a, ASHLEY *et al.*, 2007). Estes resultados trazem evidências contundentes da presença de nociceptores em peixes teleósteos.

Em peixes elasmobrânquios, estudos anatômicos não detectaram a presença de nociceptores e fibras do tipo C, embora as fibras do tipo A δ estejam presentes (LEONARD, 1985). Essa diferença entre peixes teleósteos e cartilaginosos pode representar uma divergência evolutiva, na qual a linhagem dos peixes cartilaginosos teriam perdido as fibras amielínicas (SNEDDON *et al.*, 2004).

Figura 1. Secção do ramo maxilar do nervo trigeminal da truta mostrando a presença de fibras do tipo A δ e C. Fonte: SNEDDON, 2004.

1.4.2. Processamento da informação nociceptiva: medula espinal

Além da presença de nociceptores, uma característica essencial para a percepção de dor é o processamento dos sinais nociceptivos na medula espinal. Estudo com peixes elasmobrânquios demonstram que a matéria cinzenta destes animais pode ser dividida em sete lâminas. A primeira lâmina ocupa a maior parte do corno dorsal da medula e corresponde à lâmina I e à substância gelatinosa da medula espinal de mamíferos, aves e répteis (IWAHORI *et al.*, 1998). Além disso, os peixes apresentam uma organização das vias espinhais semelhante à dos mamíferos, incluindo os tratos espinotalâmicos, espinomesencefálicos, espinoreticulares e espinolímbicos (CHANDROO *et al.*, 2004a) e o trato trigeminal. Estudos com o tubarão *Ginglymostoma cirratum* demonstram que fibras ascendentes que partem da medula atingem a formação reticular e também se

projetam para o núcleo motor do vago, o bulbo, o tronco cerebral, o cerebelo, o núcleo intercolicularis, o teto mesencefálico e o tálamo (EBBESSON & HODDE, 1981). Embora não haja dados experimentais demonstrando que as informações nociceptivas em peixes trafegam por estes tratos, dados eletrofisiológicos demonstram a presença de atividade, medida por meio dos potenciais evocados, no telecéfalo (DUNLOP & LAMING, 2005; NORDGREEN, 2007), medula espinal, cerebelo e teto óptico (DUNLOP & LAMMING, 2005) de peixes após estimulação nociva cutânea, indicando que os sinais nociceptivos periféricos atingem o encéfalo.

1.4.3. Estruturas encefálicas

A percepção da dor em humanos envolve uma série de regiões encefálicas que processam a informação nociceptiva. Esse grupo de regiões, denominado de “Matriz da dor” envolve o tronco encefálico, tálamo e áreas subcorticais e neocorticais (MILAN, 1999; PRICE, 2000). O encéfalo dos peixes, assim como de todos os vertebrados obedece a uma estrutura básica, com a presença de telencéfalo, mesencéfalo, diencéfalo e tronco cerebral (STRIEDTER, 2005), incluindo a maior parte das regiões envolvidas no processamento da dor. Entretanto, alguns autores sugerem que, mesmo possuindo a estrutura anatômica supracitada, a ausência do neocórtex impediria os peixes de sentirem qualquer qualidade de dor (ROSE, 2002; ROSE, 2007; ROSE *et al.*, 2012; ARLINGHAUS *et al.*, 2007). De acordo com Rose (2002), o tronco cerebral e as regiões subcorticais podem ser capazes de modular a percepção da dor por meio de conexões com o córtex, mas são incapazes de fazê-lo na ausência deste. Este autor

baseia essa conclusão em observações em humanos com destruição cortical ou deficiências corticais congênitas. Entretanto, a interpretação dessas observações pode ser complexa. Alguns estudos com pacientes com córtex não funcional demonstram que essas pessoas não parecem ter a sensação de dor completamente abolida, ao contrário, elas possuem uma percepção de dor limitada, de qualidade diferente daquela apresentada por pessoas com córtex funcional (*ver* SEGNER 2012). A perda da capacidade de sentir dor só acontece quando uma lesão ocorre na região do tálamo, e não do córtex cerebral, demonstrando que esta sim é uma região essencial na percepção da dor (PERL, 2007).

A afirmação de que a ausência de um neocórtex impossibilita aos vertebrados basais a percepção do estímulo nocivo, bem como outros sentidos que envolvem a cognição, é pouco cautelosa. Segundo Medina e Abellan (2009) o neocórtex não é o único tipo de estrutura envolvido em funções complexas e sofisticadas e no comportamento inteligente, sendo que estas funções também podem ser realizadas por outras estruturas. A visão de que o neocórtex é uma estrutura única responsável pela “inteligência superior” dos mamíferos é contraditória sob alguns aspectos. Primeiramente, é extremamente difícil, se não impossível, comparar a inteligência entre diferentes vertebrados em função da dificuldade de se desenvolver testes cognitivos adequados para cada uma das espécies. Além disso, espécies diferentes demonstram melhores ou piores resultados, dependendo dos testes de inteligência realizados (seres humanos, por exemplo, são piores em detectar odores memorizados que outras espécies). Segundo, o neocórtex se desenvolveu do *pallium* dorsal, e esta subdivisão palial está presente em todos os amniotas, possivelmente todos os tetrápodes, e compartilha um número similar de tipos celulares e conexões (MEDINA & ABELLAN,

2009). Mais recentemente, evidências indicam a existência de uma subdivisão palial homóloga ao *pallium* dorsal também em peixes teleósteos (MUELLER *et al.*, 2011).

Embora o mecanismo básico de desenvolvimento ontogenético do encéfalo seja diferente (evaginação x eversão), estudos recentes fazendo uso de técnicas de biologia molecular tem demonstrado cada vez mais similaridades no desenvolvimento do prosencéfalo de peixes e mamíferos (WULLIMANN & MUELLER, 2004; MUELLER & WULLIMANN, 2009). Durante o desenvolvimento dos embriões de camundongos, os padrões de expressão gênica indicam que o *pallium* dos mamíferos possui quatro regiões: uma medial que dá origem ao hipocampo, uma dorsal que origina o isocórtex de seis camadas, uma ventral que origina parte do complexo amigdalóide palial e uma lateral que origina o córtex piriforme e outras partes do complexo claustroromigdalóide (ver revisão MUELLER & WULLIMANN, 2009). Estudo de Mueller *et al.* (2011) demonstrou que, assim como os mamíferos, o *pallium* do zebrafish possui quatro divisões histogenéticas reais, a medial (Dm), lateral (Dl), posterior (Dp) e central (Dc), que possuem homologia com o *pallium* ventral, medial, lateral e dorsal dos mamíferos, respectivamente. Além das evidências anatômicas, a homologia entre a região medial (Dm) e o complexo amigdalóide palial e entre a região lateral (Dl) e o hipocampo dos tetrápodes tem sido suportada por dados comportamentais (PORTAVELLA, 2002), genéticos (WULLIMANN & RINK, 2001) e hodológicos (NORTHCUTT, 2006; NORTHCUTT, 2008).

Enquanto originalmente se pensava que a função primária do encéfalo dos peixes fosse o processamento olfatório, agora é claro que sua função vai muito além deste aspecto (SEGNER, 2012). O telencéfalo dos teleósteos se desenvolveu em uma estrutura altamente diferenciada para o processamento de diversas informações

sensoriais, e possivelmente informações emocionais. Pesquisas recentes tem demonstrado que os peixes possuem capacidades cognitivas, de aprendizagem e memória marcantes, e que o telencéfalo parece ser o principal correlato neural dessas capacidades. Regiões paliais e subpaliais do encéfalo dos peixes apresentam conexões neurais com outras áreas que se assemelham àquelas dos vertebrados mais derivados (BUTLER & HODAR, 1996; NIEUWENHUYS *et al.*, 1998), e estão envolvidos no processamento de informações somatosensoriais, gustatória, visual, auditiva e outras modalidades sensoriais, e mediam comportamentos complexos e funções integrativas como o aprendizado de evitação, aprendizado espacial e comportamento social e são essenciais para a motivação e aprendizado emocional, bem como para a memória (RODRIGUEZ *et al.*, 2002. PORTAVELLA *et al.*, 2004; BROGLIO *et al.*, 2005; BROGLIO *et al.*, 2010). Estes estudos tem sugerido que o *pallium* lateral e medial de teleósteos tem envolvimento no aprendizado emocional e espacial, semelhante ao hipocampo e à amígdala dos tetrápodes. Também tem sido proposto que o *pallium* dorsal é homólogo ao (neo) córtex mamífero, devido a conexões dessa região com outras regiões encefálicas de forma semelhante ao observado nos tetrápodes e também em função da homologia de marcadores genéticos do *pallium* dorsal dos peixes e do neocórtex dos mamíferos (WULLIMANN & MÜLLER, 2004).

Considerando estas evidências, o argumento de que a percepção da dor depende exclusivamente do neocórtex também é controverso. Como o córtex dos mamíferos, o *pallium* dos peixes parece ter uma capacidade altamente desenvolvida de processamento de informações sensoriais, sendo intensamente interconectado com outras regiões encefálicas como o mesencéfalo e o diencéfalo (RINK & WULLIMANN, 2004), apresentando atividade após a estimulação nociva (DUNLOP & LAMING, 2005), e contendo estruturas que guardam homologia com a amígdala e o hipocampo mamífero

(PORTAVELLA *et al.*, 2002, 2004). Os peixes possuem, ainda, um hipotálamo que está envolvido em funções sexuais e no comportamento social e integra sinais de origem telencefálica relacionadas a respostas de medo (CHANDROO *et al.*, 2004). Essas evidências não indicam que os peixes possuem as mesmas capacidades cognitivas que os mamíferos, mas sugerem continuidade nas funções encefálicas e nos correlatos neurais de estados emocionais e mentais no decorrer da evolução, ao invés de uma divisão rígida entre vertebrados pré e pós neocórtex (SEGNER, 2012).

1.4.4. Respostas nociceptivas em peixes

Peixes expostos a estímulos nocivos demonstram uma ampla variedade de respostas fisiológicas e comportamentais (SNEDDON *et al.*, 2003a; NEWBY & STEVENS, 2008; REILLY *et al.*, 2008; ROQUES *et al.*, 2010; ALVES *et al.*, 2013). Em truta arco-íris (*O. mykiss*), a injeção de ácido acético nos lábios (estímulo nocivo) induz a realização de comportamentos atípicos, como o "rubbing", que consiste em esfregar o lábio (onde a substância foi injetada) na parede do aquário e o "rocking", em que o animal fica se movimentando de um lado a outro e raspando a região da injeção no cascalho. Além disso, os animais que receberam o estímulo nocivo levaram mais tempo para ingerir o alimento e aumentaram a taxa de batimentos operculares para valores semelhantes a animais em atividade extrema (SNEDDON, 2003a). Em outro estudo com truta arco-íris (*O. mykiss*) foi observada perda do equilíbrio e aumento da frequência respiratória em resposta à injeção de ácido acético nos lábios, sem, entretanto, a realização de comportamentos atípicos ("rubbing" e "rocking") (NEWBY

& STEVENS, 2008). Em zebrafish (*Danio rerio*) a aplicação do estímulo nocivo (ácido acético injetado nos lábios) também aumenta a taxa de batimentos operculares e diminui a frequência natatória (REILLY *et al.*, 2008a). Em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), a aplicação de um estímulo nocivo mecânico, um clipe na cauda, promoveu um aumento na atividade natatória, associado com um gasto maior do tempo nas partes iluminadas do aquário, liberação de muco pelas células das brânquias e alterações nos transportadores de íons da membrana das brânquias (ROQUES *et al.*, 2010). Em piaçu (*L. macrocephalus*), a injeção subcutânea de formalina na região da nadadeira adiposa promoveu um aumento intenso da atividade locomotora, principalmente no primeiro minuto avaliado, além do aumento na frequência ventilatória (ALVES *et al.*, 2010; ALVES *et al.*, 2013). A variedade de respostas fisiológicas e comportamentais nas diversas espécies de peixes estudadas, utilizando diferentes tipos de estímulo nocivo demonstra que a resposta dos peixes a estímulos nocivos é espécie-específica.

Além de responderem aos estímulos nocivos, estudos demonstram que os peixes também são capazes de aprender a evitar um estímulo nocivo. Estudos com goldfish (*Carassius auratus*) e truta arco-íris (*O. mykiss*) demonstraram que os peixes têm capacidade de aprender a associar uma área particular com um estímulo nocivo e manter a informação aprendida, evitando retornar a esta área após o estímulo (DUNLOP *et al.*, 2006; MILLISOPP & LAMING, 2007). Além disso, a aprendizagem de esquiva se mostrou flexível, variando de acordo com a intensidade do estímulo e da situação, demonstrando que a habilidade de responder comportamentalmente ao estímulo nocivo pode variar. Em truta arco-íris (*O. mykiss*), foi observado que a alteração de fatores ambientais pode alterar a resposta aprendida, sendo que a colocação de um coespecífico ao lado da área de choque aumenta a probabilidade da truta se manter nessa área, a despeito da presença do estímulo nocivo (DUNLOP *et al.*, 2006). Embora o goldfish (*C.*

auratus) não responda da mesma forma à presença de um coespecífico, foi observado que essa espécie muda o comportamento aprendido em resposta ao jejum, entrando na área de choque para obter alimento (MILLISOPP & LAMING, 2007). Este resultado sugere que aparentemente o peixe analisa o custo/benefício e muda seu comportamento de esquiva do estímulo nocivo de acordo com as circunstâncias. Estes resultados indicam uma flexibilidade do comportamento aprendido, sugerindo que o comportamento em resposta ao estímulo nocivo não é puramente reflexo.

1.4.5. Sistema opioide

A presença de receptores opioides e substâncias opioides endógenas é um fator crucial para caracterizar a capacidade nociceptiva dos animais (SNEDDON, 2004). Em mamíferos, os receptores e substâncias opioides estão localizados em regiões particularmente associadas com o processamento da informação nociceptiva e da dor, como a medula espinal, núcleo da rafe, formação reticular, substância cinzenta periaqueductal e tálamo (SIMATOVE *et al.*, 1977).

Evidências indicam que os peixes possuem um sistema opioide funcional, de maneira semelhante a outros vertebrados. Os peixes possuem todos os principais tipos de receptores opioides presentes nos vertebrados (delta, kappa e mu), com estrutura proteica semelhante aos dos receptores de mamíferos (BUATTI e PASTERNAK, 1981; VELLASCO *et al.*, 2009; DREBORG, 2011). Em paulistinha, quatro receptores opioidérgicos foram clonados: o receptor δ opioide (dr DOR1), com alta similaridade

com o receptor dos mamíferos (BARRALLO *et al.*, 1998), o dr DOR2, um drDOR1 duplicado que apresenta alta similaridade a outro receptor δ opioide (PINAL-SEOANE *et al.*, 2006), o receptor drMOR homólogo ao μ opioide (BARRALLO *et al.*, 2000) e o drKOR, homólogo ao receptor opioide κ de mamífero (ALVAREZ *et al.*, 2006). A análise da expressão de receptores opioides no encéfalo de paulistinha, utilizando técnicas de hibridização (ALVAREZ *et al.*, 2006; PINAL-SEOANE *et al.*, 2006) demonstram que os receptores opioides apresentam um amplo padrão de distribuição, com marcação mais intensa nas regiões relacionadas ao processamento de informações sensoriais e em áreas que são parte de vias analgésicas, como o telencéfalo, tálamo, hipotálamo, teto óptico, formação reticular, núcleos da rafe e medula espinal (GONZALEZ-NUNEZ & RODRIGUEZ, 2009).

Além da presença de receptores opioides, substâncias semelhantes à encefalina foram encontradas em várias regiões do encéfalo de douradinho (*Carassius auratus*) (FINGER, 1981; SCHULMAN *et al.*, 1981), do bagre (*Ictalurus nebulosus*) (FINGER, 1981), do peixe pulmonado africano (*Protopterus annectens*) (REINER & NORTHCUTT, 1987) e da truta arco íris (*Onchorinchus mykiss*) (VECINO *et al.*, 1992), com padrão de distribuição semelhante ao observado em mamíferos (VECINO *et al.*, 1992). Estudo de imuno-histoquímica também demonstra a distribuição de neurônios e fibras contendo β -endorfina no encéfalo do peixe teleósteo *Boops boops* (VALLARINO, 1985). Além disso, a presença de sítios de ligação para ^3H - naloxona foram encontradas no encéfalo do teleósteo *Ictalurus nebulosus* (ROSEBAUM & CALLARD, 1988).

Embora a existência de um sistema opioide funcional esteja bem estabelecida em peixes, pouco é conhecido a respeito da analgesia nesse grupo de animais. A inibição de comportamentos nociceptivos pela aplicação de substâncias analgésicas tem sido

descrita em algumas espécies de peixe. Em truta arco-íris o tratamento com morfina reduz a realização de comportamentos atípicos e as alterações ventilatórias induzidas pela injeção subcutânea de ácido acético nos lábios (SNEDDON *et al.*, 2003a). Em linguado (*Pseudopleuronectes americanus*), a aplicação de morfina bloqueou completamente o aumento da atividade cardíaca induzida pelo estímulo nocivo (injeção de ácido acético na bochecha) (NEWBY *et al.*, 2007). Em carpa comum (*Cyprinus carpio*), uma resposta analgésica prolongada foi observada quando o tramadol, um agonista de receptores μ opioide, foi aplicado antes de um estímulo nocivo elétrico (CHERVOVA & LAPSHIN, 2000).

A despeito da analgesia causada por substâncias opioides exógenas, como a morfina e o tramadol, a existência de um sistema endógeno para o controle da dor ainda é pouco estudada em peixes. Em truta arco-íris, a diminuição da resposta nociceptiva foi observada em animais submetidos à subordinação social por 7 dias (ASHLEY *et al.*, 2009). Esta diminuição da resposta nociceptiva pode indicar a ativação do sistema analgésico endógeno nestes animais, desencadeado pelo estresse da subordinação social. Em piaçu (*L. macrocephalus*), estudo demonstrou que peixes submetidos à presença de substância de alarme de coespecífico apresentavam inibição da resposta motora à aplicação subcutânea de formalina na região da nadadeira adiposa (estímulo nocivo), e esta inibição é bloqueada pelo pré-tratamento com naloxona (antagonista não seletivo de receptores opioides), sugerindo uma analgesia endógena de origem opioide induzida pelo estresse causado pela presença da substância de alarme (ALVES *et al.*, 2013).

Embora os estudos acerca do sistema opioide em peixes ainda sejam incipientes, as evidências disponíveis sugerem que as propriedades bioquímicas, moleculares e farmacológicas dos receptores opioides de peixes são fundamentalmente similares aos dos mamíferos. Dessa maneira, o uso de peixes como modelo animal para o

desenvolvimento de novas drogas analgésicas e psicoativas para o homem tem sido amplamente defendido (GONZALEZ-NUNEZ & RODRIGUEZ, 2009; MALAFOGLIA *et al.*, 2013).

1.4.6. Sistema canabinoide

A descoberta de um sistema canabinoide endógeno em animais é bastante recente na pesquisa. Em meados da década de 60 Gaoni & Mechoulam (1964) identificaram o principal constituinte psicoativo da *Cannabis sativa*, o Δ^9 -tetra-hidrocannabinol (THC), entretanto, apenas no final da década de 80 um receptor canabinoide foi caracterizado (DEVANE *et al.*, 1988) e clonado (MATSUDA *et al.*, 1990) no encéfalo de mamíferos.

O sistema endocanabinoide é composto por dois tipos de receptores, CB1 e CB2 (HWOLETT, 2002), seus ligantes endógenos e outros mediadores lipídicos, incluindo a arachidoniletanolamida (anandamida, AEA) (DEVANE *et al.*, 1992) e o arachidonil glicerol (2-AG) (MECHOULAM *et al.*, 1995), e as enzimas relacionadas que produzem e inativam essas substâncias (PAZOS *et al.*, 2005). O sistema endocanabinoide parece ser bem conservado dentro do grupo dos vertebrados (ELPHINIC & EGERTOVÁ, 2001). Estudos moleculares e neuroanatômicos demonstram um alto grau de conservação dos genes que codificam os receptores CB1 e CB2 em peixes e em mamíferos (YAMAGUCHI *et al.*, 1996; ELPHINIC, 2003; COTTONE *et al.*, 2005b; LAM *et al.*, 2006; PALERMO *et al.*, 2008). Além disso, os receptores canabinoides são amplamente expressos no encéfalo dos peixes, sendo encontrados no telencéfalo, área

preóptica, hipotálamo, glândula pituitária, tronco encefálico e cerebelo (COTTONE *et al.*, 2005a; COTTONE *et al.*, 2005b; LAM *et al.*, 2006; HARVEY-GIRARD *et al.*, 2013). De acordo com Lam *et al.*, (2006), os altos níveis de expressão do gene que codifica o receptor CB1 no telecéfalo dorsal dos peixes indicam que este receptor pode estar envolvido em processos cognitivos. Além disso, após a estimulação nociva, foi detectado um “up regulation” do gene que codifica o receptor CB1 em truta arco-íris (REILLY *et al.*, 2008b), sugerindo a participação deste receptor no processamento central da dor. Estudos funcionais demonstram que o sistema endocanabinoide participa do controle da ingestão de alimento em peixes (VALENTI *et al.*, 2005; PICCINETTI *et al.*, 2010), entretanto, a despeito das evidências moleculares e anatômicas sua participação na antinocicepção ainda não foi estudada.

A participação do sistema endocanabinoide na modulação da analgesia induzida pelo estresse já foi demonstrada em mamíferos (HOHMANN *et al.*, 2005; VAUGHAN *et al.*, 2005). A aplicação de estressores físicos e fisiológicos podem promover a ativação de vias descendentes de controle da dor, mediada por mecanismos opioides e não-opioides, incluindo o sistema endocanabinoide (VAUGHAN *et al.*, 2005). Um evento estressante pode induzir à formação rápida de duas substâncias endocanabinoides, a anandamida e o 2-AG, na substância cinzenta periaqueductal de ratos, produzindo analgesia (HOHMANN *et al.*, 2005). A ativação do sistema endocanabinoide em mamíferos é mediada pela ativação de receptores CB1 em regiões encefálicas relacionadas com a dor, ativando as vias descendentes de controle da dor (PERTWEE, 2001). Em modelos de dor aguda em roedores, as substâncias canabinoides inibem respostas a estímulos nocivos térmicos (RICHARDSON *et al.*, 1998) e mecânicos (SMITH *et al.*, 1998), bem como as aquelas observadas no teste da formalina (HAMA

& SAGEN, 2011; ROA-CORIA *et al.*, 2012; SCHREIBER *et al.*, 2012), sendo esta inibição mediada por receptores CB1.

1.4.7. Percepção da dor em peixes

Considerando os aspectos da nocicepção e da dor em peixes acima discutidos, fica claro que, o conceito de dor animal não se insere nas definições de dor em humanos dadas pela IASP, a qual está focada na qualidade da experiência da dor em humanos. Quando nos referimos à dor em peixes, estamos lidando com uma experiência de dor qualitativamente diferente, provavelmente mais primitiva em um ponto de vista evolutivo (SEGNER, 2012).

Um ponto crítico na discussão da existência de percepção de dor em animais não humanos é a questão da existência de consciência. Em humanos a dor é definida como uma experiência consciente e subjetiva. Por muito tempo se acreditou que apenas os humanos fossem dotados de consciência, sugerindo que nenhum animal seria capaz de sentir dor. Entretanto, as percepções sobre os animais têm mudado, e a visão do homem como o único ser consciente foi abandonada. Agora é amplamente aceito que pelo menos alguns animais que são próximos de nós, como os primatas em particular, e os mamíferos em geral, são sensíveis, e possuem emoções positivas e negativas. Essa visão é particularmente verdadeira quando nos referimos a animais simpáticos, como cães e gatos. Entretanto, a situação muda quando nos referimos a animais frios e viscosos, como os peixes; neste caso somos mais relutantes em aceitar a existência de estados emotivos e percepção da dor nestes animais (SEGNER, 2012).

Embora o *pallium* dos peixes não seja capaz de sustentar estados avançados de consciência, o sistema nervoso desses animais permite processos como percepção, aprendizado e memória, tornando-os aptos a evitar estímulos e situações que causam desconforto e nocicepção (HOFFMANN, 2008).

A consciência é uma função do sistema nervoso que comporta vários fenômenos (ROTH, 2001) e segundo Edelman e Tononi (2000) ela pode ser dividida em dois tipos: consciência primária e expandida.

a) Estados gerais da consciência ou consciência primária: A consciência primária não tem uma ligação clara com um conteúdo mental. Ela é responsável pelo controle da vigilância, da fadiga, do conforto, da percepção da duração temporal e do layout espacial e serve de suporte para tipos mais específicos ou complexos da consciência. Esses diferentes estados gerais da consciência podem ser afetados seletivamente por lesões específicas do sistema nervoso e essas estruturas foram conservadas ao longo da evolução entre os vertebrados. Uma dessas estruturas é a formação reticular do tronco cerebral, onde se situam alguns agrupamentos celulares que originam vias ascendentes que se projetam difusamente para todas as regiões anteriores do sistema nervoso, inclusive para as regiões neocorticais, diferenciadas mais recentemente (HOFFMANN, 2008).

b) Consciência expandida: A consciência expandida comporta estados como percepção consciente do ambiente e do próprio corpo, atividades mentais (pensar, imaginar, lembrar e planejar), consciência autobiográfica, percepção da realidade e autopercepção. O crescente desenvolvimento do *pallium* nos mamíferos, sobretudo das áreas associativas do neocórtex, facultou o aparecimento dessa consciência (EDELMAN e TONONI, 2000).

Portanto, é possível que nos peixes haja a presença da consciência primária como uma função do sistema nervoso (CHANDROO *et al.*, 2004) e esse tipo de consciência pode ser uma explicação plausível para se tentar abordar a questão da percepção consciente da dor em peixes. Estruturas subcorticais, existentes nos vertebrados não-mamíferos, contribuem de forma substancial para a geração e manutenção da consciência primária, e são imprescindíveis para a geração da consciência expandida, e sua destruição resulta na perda da consciência em mamíferos (HOFFMANN, 2008). Tem sido sugerido que a consciência evoluiu gradativamente, e que diferentes espécies de animais podem apresentar diferentes graus de consciência (DUNCAN, 1996). Os estados de experiência emocional não são dependentes de altos graus de consciência (como é encontrado nos humanos e possivelmente em algumas espécies de animais como os símios), mas sim de formas básicas. Sabe-se que essas formas de consciência são necessárias para a execução de alguns tipos de habilidades e comportamentos e, dessa forma, pode ser possível determinar quais espécies de animais possuem essas características (FLECKNELL, 2008). Entretanto, a capacidade de peixes em experimentar a dor ainda não está esclarecida, sendo necessário realizar uma abordagem acurada sobre as capacidades mentais desses animais requerendo um aumento no conhecimento da neuroanatomia e uma compreensão de como essas estruturas medeiam respostas comportamentais (HOFFMANN, 2008).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Os objetivos gerais do presente estudo foram:

- investigar a existência de um sistema de antinocicepção endógeno, mobilizado pelo estresse de restrição no peixe *L. macrocephalus* e suas características temporais e neuroquímicas.
- Avaliar a participação de uma estrutura telencefálica, o telencéfalo dorsomedial, na modulação da antinocicepção induzida pelo estresse de restrição no peixe *L. macrocephalus*.

2.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos do presente estudo foram:

- verificar, por meio do teste algesimétrico da formalina, a existência de um sistema de antinocicepção endógena induzida por meio do estresse de restrição;
- analisar a influência da duração do estresse de restrição na antinocicepção induzida;
- avaliar a duração da antinocicepção induzida pelo estresse de restrição;
- avaliar a natureza neuroquímica da antinocicepção induzida pela restrição por meio da aplicação de bloqueadores de receptores opioides e canabinoides;
- analisar o papel do telencéfalo dorsomedial na mobilização de analgesia endógena por meio da utilização de substâncias ansiolíticas aplicadas centralmente.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O protocolo experimental utilizado no presente estudo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP) (Processo n° 052/2010).

3.1. Espécie estudada e condições de manutenção laboratorial

Foram utilizados exemplares de juvenis de piaçu (*L. macrocephalus*) obtidos de criação comercial. Os peixes foram mantidos individualmente em aquários de vidro (40 X 22 X 20 cm, 18L), cujas paredes laterais foram revestidas com papel opaco a fim de isolá-los de estímulos visuais de coespecíficos mantidos em aquários vizinhos. Os animais estavam submetidos a um ciclo claro / escuro de 12:12h (dia subjetivo: início as 07h00 e fim as 19h00) com temperatura de $26^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e foram alimentados uma vez ao dia com ração peletizada para peixes (PURINA), na quantidade de 3% da biomassa. A alimentação foi interrompida 24 horas antes da realização dos experimentos e dos procedimentos cirúrgicos (FIGUEROA *et al.*, 1975).

3.2. Drogas utilizadas

Durante a realização dos experimentos serão utilizadas as seguintes drogas:

- Naloxona (Tocris Bioscience, Bristol, UK): bloqueador não seletivo de receptores opioides, na concentração de 30 mg.kg^{-1} ($0.1 \text{ ml}/10 \text{ g}$ de peso do peixe), diluída em salina;
- AM251 (Tocris Bioscience, Bristol, UK): bloqueador de receptores endocanabinoides do tipo CB1, diluído em etanol absoluto a uma concentração de 20 mg.mL^{-1} e novamente diluído em salina (3 mg.kg^{-1} , $0.1 \text{ ml}/10 \text{ g}$ de peso do peixe, com concentração final de etanol de 1,5%);
- Midazolan (Roche, Basle, Switzerland): substância ansiolítica potencializadora da ação de receptores GABA_A, na concentração de 40 nM e 80 nM, diluído em salina contendo *Tween* 80 (2 gotas de *tween* 80 por 10 mL de salina, (HARRIS & WESTBROOK, 1996));
- Flumazenil (Tocris Bioscience, Bristol, UK): antagonista benzodiazepínico, na concentração de 80 nM e 160 nM, diluído em salina contendo *Tween* 80 (2 gotas de *tween* 80 por 10 mL de salina, (HARRIS & WESTBROOK, 1996));
- Tricaina metano sulfonato (MS-222, Sigma, St. Lois, USA): anestésico, na concentração de $0,2 \text{ g.L}^{-1}$.

3.3. *Teste Nociceptivo*

Para o teste nociceptivo foi utilizada a injeção subcutânea de solução de formalina a 3%, (diluída em Salina), reproduzindo modelos de dor propostos para ratos (DUBUISSON & DENNIS, 1977) e adaptados para peixes em nosso laboratório (ALVES, 2010). A região escolhida para a injeção foi a região próxima à nadadeira adiposa (Figura 2). Para a aplicação das injeções, os animais foram removidos da água com auxílio de uma rede de *nylon* e enrolados em pano umedecido, para a injeção subcutânea da droga e imediatamente devolvidos para a água. As alterações comportamentais foram utilizadas como indicadores nociceptivos. No final do experimento os peixes foram sacrificados por anestesia profunda com MS-222 (0,2 g.L⁻¹).

Figura 2. Região onde foi aplicada a injeção subcutânea de formalina a 3%.

3.4. Estresse de restrição

Para imobilizar o peixe uma placa de metal foi introduzida no aquário (30 x 20 x 3 cm), empurrando o peixe contra a parede e impedindo seus movimentos por 3 ou 5 minutos, sem impedir os movimentos operculares (Figura 3). Os níveis de cortisol foram analisados para confirmar a eficiência deste procedimento para induzir o estresse. Para isso, 24 animais foram divididos em 3 grupos: um grupo controle (n=8) não submetido à restrição, um grupo submetido a 3 minutos de restrição (n=8) e um grupo submetido a 5 minutos de restrição (n=8). Cinco minutos após o término da restrição o peixe foi anestesiado (MS-222, 0,2g.L⁻¹) e seu sangue foi amostrado por punção do vaso caudal utilizando-se seringas não-heparinizadas de 1 ml. O sangue foi submetido à centrifugação por 10 minutos à 3.000 rpm à 4°C (Centrífuga Ependorf). O soro foi usado para a análise da concentração de cortisol por radioimunoensaio (Coat-a-Count Cortisol, DPC, Los Angeles, CA, USA).

Figura 3. Juvenil de *Leporinus macrocephalus* sendo submetido ao estresse de restrição.

3.5. *Análises comportamentais*

Uma filmadora foi acoplada a um computador através de um “free software” de captura de imagem Virtual Dub 1.6.16, sendo colocada de frente ao aquário para a filmagem de todo o experimento. O estudo do comportamento foi realizado por meio da visualização das filmagens, sendo avaliada a atividade natatória dos animais. Para isso, foram avaliados: (i) distância percorrida no aquário durante o tempo de avaliação; (ii) velocidade do animal. Essas variáveis foram analisadas mediante o uso de um *software* de monitoramento e quantificação do comportamento, o *EthoVision XT 7.1* (Noldus Information Technology, Wageningen, Netherlands) e os dados foram expressos como a diferença (delta) dos dados após (pós-estímulo) e antes (linha de base) das intervenções metodológicas.

Para garantir que o bloqueio do aumento da atividade locomotora após o estresse de restrição observado neste estudo foi promovido pela mobilização de um sistema antinociceptivo endógeno e não por efeitos do estresse sobre a atividade locomotora, um grupo *sham* foi incluído para avaliar o efeito do estresse de restrição sobre a atividade locomotora. Para isso, 18 peixes foram divididos em 3 grupos experimentais: um grupo controle (n=6), não submetido à restrição; um grupo submetido a 3 min de restrição (n=6), e um grupo submetido a 5 min de restrição (n=6). O comportamento basal foi avaliado por 5 min (linha de base), os animais foram submetidos à restrição, sendo o comportamento avaliado novamente por 5 min após o término da restrição (pós-estímulo).

3.6. Procedimentos cirúrgicos

3.6.1. Anestesia

Os peixes foram anestesiados por imersão em solução de MS-222 ($0,20 \text{ g.L}^{-1}$), até a interrupção dos movimentos operculares e somáticos. Foram envolvidos com algodão umedecido para proteger o epitélio cutâneo e permaneceram sob ventilação hidráulica contínua durante toda a cirurgia, através das guelras, com água aerada contendo solução anestésica de manutenção (MS-222: $0,1 \text{ g.L}^{-1}$).

3.6.2. Implantação da cânula-guia no telencéfalo dorsomedial

Os animais foram submetidos ao implante unilateral de cânulas-guias sobre a região do telencéfalo dorsomedial para administração central das drogas. O procedimento cirúrgico foi realizado em uma caixa de confinamento acrílica, com um prendedor de cabeça, no qual os animais ficaram fisicamente retidos (CORRÊA *et al.*, 1998) (figura 4). A essa caixa de confinamento foi acoplado um micromanipulador *Prior* para a realização dos procedimentos estereotáxicos, sendo estes procedimentos realizados com auxílio de uma lupa binocular com luz polarizada (Carl Zeiss, OPMI 1-FC). Após a fixação da cabeça na caixa e assepsia da pele que recobre o crânio, foi feita

uma incisão cutânea longitudinal para a exposição da calota craniana. Posteriormente, foram feitos orifícios com o auxílio de broca odontológica, para a implantação da cânula-guia de 7 mm de comprimento confeccionada a partir de segmentos de agulhas hipodérmicas com 0,55 mm de diâmetro externo. O estereotáxico foi posicionado nas coordenadas +1,5 mm ântero-posterior a partir do plano zero frontal (junção do bulbo olfatório com o telencéfalo na linha média) e +0,35 mm latero-lateral a partir da linha média; no plano dorso-ventral, a cânula-guia (7 mm) foi inserida e encostada na superfície telencéfálica, sendo o ponto de injeção localizado a +0,1mm, alcançado pela agulha (7,1 mm) (Figura 5). Após a inserção da cânula os orifícios foram obstruídos por misturas de partes iguais de glicerina e vaselina e o crânio, fechado com acrílico autopolimerizável (Symplex: DFL, Ind. Com. Ltda) e cola instantânea (Super Bonder: Loctite). Com o término da cirurgia e recuperação da anestesia, os animais retornaram aos seus respectivos aquários e os experimentos foram realizados de dois a cinco dias após o procedimento cirúrgico. As coordenadas estereotáxicas utilizadas para a colocação da cânula foram baseadas em um atlas extereotáxico do telencéfalo de *L. macrocephalus* desenvolvido em nosso laboratório (dados não publicados).

Figura 4. Caixa cirúrgica confeccionada em acrílico com o prendedor de cabeça e o micromanipulador para a realização dos procedimentos estereotáxicos.

3.6.3. Microinjeção central das drogas

A aplicação das drogas foi feita com o auxílio de uma seringa Hamilton para microinjeção de 2 μ l, conectada a uma agulha Mizzy com 0,3 mm de diâmetro externo por um segmento de polietileno PE 10. A agulha de injeção, o polietileno e a microseringa foram preenchidos com salina. Em seguida, um pouco de ar foi aspirado para formar uma pequena bolha que serve para separar os dois líquidos e, finalmente, a solução com a droga foi aspirada. Nos grupos controle, a microseringa foi totalmente preenchida com salina. A microinjeção (0,1 μ l) foi efetuada após introdução da agulha Mizzy na cânula-guia até a profundidade da estrutura visada, demorando em torno de 10 segundos. A agulha permaneceu no local por mais 10 segundos, para evitar o refluxo da solução injetada durante a retirada da agulha. A agulha utilizada para a microinjeção central de drogas no telencéfalo dorsomedial foi de 7,1 mm.

3.6.4. Histologia

Ao término dos experimentos, os animais receberam uma lesão eletrolítica para a identificação do sítio da microinjeção (Figura 6). Para isso, os animais foram profundamente anestesiados em MS-222 (0,20 g.L⁻¹), enrolados em algodão umedecido e colocados na caixa de contenção. Um eletrodo com comprimento idêntico ao da agulha utilizada para a microinjeção (7,1 mm) foi inserido na cânula guia e a corrente elétrica foi ligada (3 mV por 5 seg). Em seguida, os peixes foram sacrificados por anestesia profunda por MS-222, a cabeça foi separada do corpo e mergulhada em solução de formalina a 10%. O encéfalo foi retirado da caixa craniana e foi submetido ao processamento histológico e coloração com Cresyl Violeta. Os cortes foram observados ao microscópio de luz (Zeiss), sendo que nos animais em que as microinjeções não atingiram a região desejada foram descartados das análises dos dados.

Figura 5. Corte coronal (esquerda) e representação esquemática (direita) do telencéfalo de *L. macrocephalus* demonstrando o local onde a cânula guia foi inserida e a droga foi aplicada.

Figura 6. Corte coronal do telencéfalo de *L. macrocephalus* demonstrando o local da lesão eletrolítica realizada para a determinação do sítio de microinjeção. **A.** Aumento de 50X (objetiva de 5X); **B.** Aumento de 100X (objetiva de 10X).

3.7. Procedimentos experimentais

PRIMEIRA ETAPA: Análise da antinocicepção endógena induzida pelo estresse de restrição

a) Experimento 1. Influência do tempo de estresse de restrição sobre a antinocicepção

Objetivo

O objetivo deste experimento foi avaliar a influência do tempo de estresse de restrição sobre a resposta motora induzida pela injeção subcutânea de formalina a 3% na região da nadadeira adiposa

Procedimentos experimentais

Nesta etapa os animais foram avaliados em seu estado basal (linha de base) por 5 minutos, em seguida foram submetidos ao estresse de restrição por 3 ou 5 minutos. Após este período receberam injeção subcutânea de solução de formalina a 3% ou salina e retornaram ao aquário, sendo avaliados por 5 minutos (pós-estímulo). Foram realizados, ainda, dois grupos controle onde os animais foram avaliados em seu estado basal (linha de base) por 5 minutos e, em seguida, receberam injeção subcutânea de

formalina a 3% ou salina e retornaram ao aquário, sendo avaliados por 5 minutos (pós-estímulo) (Figura 7).

Figura 7. Desenho esquemático da sequência experimental do Experimento 1. **B** – filmagem da linha de base; **S** – injeção subcutânea de salina; **F** – injeção subcutânea de formalina; **R**–estresse de restrição; **PS** – filmagem do pós estímulo.

Grupos experimentais:

- Salina (**SAL**, n=8): injeção de 20 µL de salina.
- Formalina (**FOR**, n=8): injeção de 20 µL de formalina a 3%.
- Restrição 3 min + salina (**RES(3)+ SAL**, n=8): estresse de restrição de 3 minutos e injeção de 20 µL de salina.
- Restrição 3 min + formalina (**RES(3)+FOR**, n=8): estresse de restrição de 3 minutos e injeção de 20 µL de formalina a 3% .
- Restrição 5 min + salina (**RES(5)+ SAL**, n=8): estresse de restrição de 5 minutos e injeção de 20 µL de salina.
- Restrição 5 min + formalina (**RES(5)+FOR**, n=8): estresse de restrição de 5 minutos e injeção de 20 µL de formalina a 3% .

*b) **Experimento 2** – Análise da duração da antinocicepção endógena induzida pelo estresse de restrição de 3 e 5 minutos*

Objetivo

O objetivo deste experimento foi avaliar a duração da antinocicepção endógena induzida pelo estresse de restrição de 3 e 5 minutos de duração.

Procedimentos experimentais

Nesta etapa o comportamento dos peixes foi avaliado durante 5 minutos (linha de base), sendo, em seguida, submetidos a 3 ou 5 minutos de estresse de restrição. A injeção subcutânea de formalina foi aplicada imediatamente após a restrição (0 min, n=8), 5 minutos (5 min, n=8), 10 minutos (10 min, n=8) ou 15 minutos (15 min, n=8) após a restrição, sendo, em seguida, o comportamento avaliado por 5 minutos (pós-estímulo) (Figura 8).

- 3 min de restrição

- 5 min de restrição

Figura 8. Desenho esquemático da sequência experimental do Experimento 2. **B** – filmagem da linha de base; **R**–estresse de restrição; **S** – injeção subcutânea de salina; **F** – injeção subcutânea de formalina; **PS** – filmagem do pós estímulo.

Grupos experimentais

- Formalina (**FOR**, n=8): injeção de 20 μ L de formalina a 3% sem estresse de restrição prévio.
- 0 minutos (**0 min**, n=8): injeção de 20 μ L de formalina a 3% imediatamente após o estresse de restrição.
- 5 minutos (**5 min**, n=8): injeção de 20 μ L de formalina a 3% 5 minutos após o estresse de restrição.
- 10 minutos (**10 min**, n=8): injeção de 20 μ L de formalina a 3% 10 minutos após o estresse de restrição.
- 15 minutos (**15 min**, n=8): injeção de 20 μ L de formalina a 3% 15 minutos após o estresse de restrição.

c) ***Experimento 3*** – *Análise da natureza neuroquímica da antinocicepção induzida pelo estresse de restrição de 3 minutos*

1. Sistema Opioide

Objetivo

O objetivo deste experimento foi avaliar a influência da injeção intraperitoneal de naloxona na antinocicepção induzida pelo estresse de restrição de 3 minutos de duração.

Procedimentos experimentais

Nesta etapa os animais foram avaliados em seu estado basal (linha de base) por 5 minutos, em seguida foram tratados com injeção intraperitoneal de naloxona (30 mg.kg^{-1}) ou salina. Após 30 minutos de repouso, os peixes foram submetidos ao estresse de restrição por 3 minutos, receberam injeção subcutânea de solução de formalina a 3% ou salina e retornaram ao aquário, sendo avaliados por 5 minutos (pós-estímulo). Foram realizados, ainda, dois grupos controle onde os animais foram avaliados em seu estado basal (linha de base) por 5 minutos e, em seguida, receberam injeção subcutânea de formalina a 3% ou salina e retornaram ao aquário, sendo avaliados por 5 minutos (pós-estímulo) (Figura 9).

Figura 9. Desenho esquemático da sequência experimental do Experimento 3. **B** – filmagem da linha de base; **S** – injeção intraperitoneal de salina; **N** – injeção intraperitoneal de naloxona; **R** – estresse de restrição; **S** – injeção subcutânea de salina; **F** – injeção subcutânea de formalina; **PS** – filmagem do pós-estímulo.

Grupos experimentais:

- Salina (**SAL**, n=8): injeção de 20 µL de salina.
- Formalina (**FOR**, n=8): injeção de 20 µL de formalina a 3%.
- Salina + restrição 3 min + salina (**SAL+RES(3)+SAL**, n=8): injeção intraperitoneal de salina, estresse de restrição e injeção subcutânea de 20 µL de salina.
- Salina + restrição 3 min + formalina (**SAL+RES(3)+FOR**, n=8): injeção intraperitoneal de salina, estresse de restrição e injeção subcutânea de 20 µL de formalina a 3%.
- Naloxona + restrição 3 min + salina (**NAL+RES(3)+SAL**, n=8): injeção intraperitoneal de naloxona, estresse de restrição e injeção subcutânea de 20 µL de salina.

- Naloxona + restrição 3 min + formalina (*NAL+RES(3)+FOR*, n=8): injeção intraperitoneal de naloxona, estresse de restrição e injeção subcutânea de 20 µL de formalina a 3%.

2. Sistema endocanabinoide

Objetivo

O objetivo deste experimento foi avaliar a influência da injeção intraperitoneal de AM251 na antinocicepção induzida pelo estresse de restrição de 3 minutos de duração.

Procedimentos experimentais

Nesta etapa os animais foram avaliados em seu estado basal (linha de base) por 5 minutos, em seguida foram tratados com injeção intraperitoneal de AM251 (3 mg.kg^{-1}) ou veículo (salina contendo 1,5% de etanol). Após 30 minutos de repouso, os peixes foram submetidos ao estresse de restrição por 3 minutos, receberam injeção subcutânea de solução de formalina a 3% ou salina e retornaram ao aquário, sendo avaliados por 5 minutos (pós-estímulo). Foram realizados, ainda, dois grupos controle onde os animais foram avaliados em seu estado basal (linha de base) por 5 minutos e, em seguida, receberam injeção subcutânea de formalina a 3% ou salina e retornaram ao aquário, sendo avaliados por 5 minutos (pós-estímulo) (Figura 10).

Figura 10. Desenho esquemático da sequência experimental do Experimento 3. **B** – filmagem da linha de base; **V** – injeção intraperitoneal de veículo (salina contendo 1,5% de etanol); **A** – injeção intraperitoneal de AM251; **R**–estresse de restrição; **S** – injeção subcutânea de salina; **F** – injeção subcutânea de formalina; **PS** – filmagem do pós-estímulo.

Grupos experimentais:

- Salina (**SAL**, n=8): injeção de 20 µL de salina.
- Formalina (**FOR**, n=8): injeção de 20 µL de formalina a 3%.
- Veículo + restrição 3 min + salina (**VEI+RES(3)+SAL**, n=8): injeção intraperitoneal de veículo, estresse de restrição e injeção subcutânea de 20 µL de salina.
- Veículo + restrição 3 min + formalina (**VEI+RES(3)+FOR**, n=8): injeção intraperitoneal de veículo, estresse de restrição e injeção subcutânea de 20 µL de formalina a 3%.
- AM251 + restrição 3 min + salina (**AM251+RES(3)+SAL**, n=8): injeção intraperitoneal de AM251, estresse de restrição e injeção subcutânea de 20 µL salina.

- AM251 + restrição 3 min + formalina (*AM251+RES(3)+FOR*, n=8): injeção intraperitoneal de AM251, estresse de restrição e injeção subcutânea de 20 µL de formalina a 3%.

d) **Experimento 4** – *Análise da natureza neuroquímica da antinocicepção induzida pelo estresse de restrição de 5 minutos*

1. Sistema Opioide

Objetivo

O objetivo deste experimento foi avaliar a influência da injeção intraperitoneal de naloxona na antinocicepção induzida pelo estresse de restrição de 5 minutos de duração.

Procedimentos experimentais

Nesta etapa os animais foram avaliados em seu estado basal (linha de base) por 5 minutos, em seguida foram tratados com injeção intraperitoneal de naloxona (30 mg.kg^{-1}) ou salina. Após 30 minutos de repouso, os peixes foram submetidos ao estresse de restrição por 5 minutos, receberam injeção subcutânea de solução de formalina a 3% ou salina e retornaram ao aquário, sendo avaliados por 5 minutos (pós-estímulo). Foram realizados, ainda, dois grupos controle onde os animais foram avaliados em seu estado basal (linha de base) por 5 minutos e, em seguida, receberam injeção subcutânea de formalina a 3% ou salina e retornaram ao aquário, sendo avaliados por 5 minutos (pós-estímulo) (Figura 11).

Figura 11. Desenho esquemático da sequência experimental do Experimento 4. **B** – filmagem da linha de base; **S** – injeção intraperitoneal de salina; **N** – injeção intraperitoneal de naloxona; **R**–estresse de restrição; **S** – injeção subcutânea de salina; **F** – injeção subcutânea de formalina; **PS** – filmagem do pós-estímulo.

Grupos experimentais:

- Salina (**SAL**, n=8): injeção de 20 µL de salina.
- Formalina (**FOR**, n=8): injeção de 20 µL de formalina a 3%.
- Salina + restrição 5 min + salina (**SAL+RES(5)+SAL**, n=8): injeção intraperitoneal de salina, estresse de restrição e injeção subcutânea de 20 µL de salina.
- Salina + restrição 5 min + formalina (**SAL+RES(5)+FOR**, n=8): injeção intraperitoneal de salina, estresse de restrição e injeção subcutânea de 20 µL de formalina a 3%.
- Naloxona + restrição 5 min + salina (**NAL+RES(5)+SAL**, n=8): injeção intraperitoneal de naloxona, estresse de restrição e injeção subcutânea de 20 µL salina.

- Naloxona + restrição 5 min + formalina (*NAL+RES(5)+FOR*, n=8): injeção intraperitoneal de naloxona, estresse de restrição e injeção subcutânea de 20 µL de formalina a 3%.

2. Sistema endocanabinoide

Objetivo

O objetivo deste experimento foi avaliar a influência da injeção intraperitoneal de AM251 na antinocicepção induzida pelo estresse de restrição de 5 minutos de duração.

Procedimentos experimentais

Nesta etapa os animais foram avaliados em seu estado basal (linha de base) por 5 minutos, em seguida foram tratados com injeção intraperitoneal de AM251 (3 mg.kg^{-1}) ou veículo (salina contendo 1,5% de etanol). Após 30 minutos de repouso, os peixes foram submetidos ao estresse de restrição por 5 minutos, receberam injeção subcutânea de solução de formalina a 3% ou salina e retornaram ao aquário, sendo avaliados por 5 minutos (pós-estímulo). Foram realizados, ainda, dois grupos controle onde os animais foram avaliados em seu estado basal (linha de base) por 5 minutos e, em seguida, receberam injeção subcutânea de formalina a 3% ou salina e retornaram ao aquário, sendo avaliados por 5 minutos (pós-estímulo) (Figura 12).

Figura 12. Desenho esquemático da sequência experimental do Experimento 4. **B** – filmagem da linha de base; **V** – injeção intraperitoneal de veículo (salina contendo 1,5 % de etanol); **A** – injeção intraperitoneal de AM251; **R**–estresse de restrição; **S** – injeção subcutânea de salina; **F** – injeção subcutânea de formalina; **PS** – filmagem do pós-estímulo.

Grupos experimentais:

- Salina (**SAL**, n=8): injeção de 20 µL de salina.
- Formalina (**FOR**, n=8): injeção de 20 µL de formalina a 3%.
- Veículo + restrição 5 min + salina (**VEI+RES(5)+SAL**, n=8): injeção intraperitoneal de veículo, estresse de restrição e injeção subcutânea de 20 µL de salina.
- Veículo + restrição 5 min + formalina (**VEI+RES(5)+FOR**, n=8): injeção intraperitoneal de veículo, estresse de restrição e injeção subcutânea de 20 µL de formalina a 3%.
- AM251 + restrição 5 min + salina (**AM251+RES(5)+SAL**, n=8): injeção intraperitoneal de AM251, estresse de restrição e injeção subcutânea de 20 µL de salina.

- AM251 + restrição 5 min + formalina (**AM251+RES(5)+FOR**, n=8): injeção intraperitoneal de AM251, estresse de restrição e injeção subcutânea de 20 µL de formalina a 3%.

SEGUNDA ETAPA: Participação do telencéfalo dorsomedial (Dm) na antinocicepção induzida pelo estresse de restrição

a) Experimento 5 – Participação do telencéfalo Dm na antinocicepção endógena induzida pelo estresse de restrição de 3 minutos

1. Midazolan

Objetivo

O objetivo deste experimento foi avaliar a influência da microinjeção de midazolan, um agonista de receptores benzodiazepínicos, na região do telencéfalo dorsomedial sobre a antinocicepção induzida pelo estresse de restrição de 3 minutos.

Procedimentos experimentais

Nesta etapa foram utilizados animais pré-operados para a implantação de uma cânula-guia sobre a região do telencéfalo Dm. Os animais foram avaliados em seu estado basal (linha de base) por 5 minutos, em seguida foram tratados com microinjeção de midazolan (0,1 µL, 40 ou 80 nmol) ou veículo (salina contendo *tween* 80). Após 5 minutos de repouso, os peixes foram submetidos ao estresse de restrição por 3 minutos e receberam injeção subcutânea de solução de formalina a 3% ou salina (Figura 13).

Figura 13. Desenho esquemático da sequência experimental do Experimento 5. **B** – filmagem da linha de base; **V** – microinjeção de veículo (salina contendo tween 80); **M** – microinjeção de midazolan (40 e 80 nmol); **R**–estresse de restrição; **S** – injeção subcutânea de salina; **F** – injeção subcutânea de formalina; **PS** – filmagem do pós-estímulo.

Grupos experimentais:

- Veículo + restrição 3 min + salina (**VEI+RES(3)+SAL**, n=7): microinjeção no telencéfalo Dm de veículo, estresse de restrição por 3 min e injeção subcutânea de 20 µL de salina.
- Veículo + restrição 3 min + formalina (**VEI+RES(3)+FOR**, n=7): microinjeção no telencéfalo Dm de veículo, estresse de restrição por 3 min e injeção subcutânea de 20 µL de formalina a 3%.
- Midazolan (40 nmol) + restrição 3 min + salina (**MID40+RES(3)+SAL**, n=8): microinjeção no telencéfalo Dm de midazolan (40 nmol), estresse de restrição por 5 min e injeção subcutânea de 20 µL de salina.

- Midazolan (40 nmol) + restrição 3 min + formalina (**MID40+RES(3)+FOR**, n=8): microinjeção no telencéfalo Dm de midazolan (40 nmol), estresse de restrição por 3 min e injeção subcutânea de 20 µL de formalina a 3%.
- Midazolan (80 nmol) + restrição 3 min + salina (**MID80+RES(3)+SAL**, n=7): microinjeção no telencéfalo Dm de midazolan (80 nmol), estresse de restrição por 3 min e injeção subcutânea de 20 µL de salina.
- Midazolan (80 nmol) + restrição 3 min + formalina (**MID80+RES(3)+FOR**, n=7): microinjeção no telencéfalo Dm de midazolan (80 nmol), estresse de restrição por 3 min e injeção subcutânea de 20 µL de formalina a 3%.

2. Flumazenil + Midazolan

Objetivo

O objetivo deste experimento foi avaliar a influência da microinjeção de flumazenil, um antagonista de receptores benzodiazepínicos, na região do telencéfalo dorsomedial sobre inibição da antinocicepção induzida pelo estresse de restrição de 3 minutos promovida pela microinjeção de midazolan.

Procedimentos experimentais

Nesta etapa foram utilizados animais pré-operados para a implantação de uma cânula-guia sobre a região do telencéfalo Dm. Os animais foram avaliados em seu estado basal (linha de base) por 5 minutos, em seguida foram tratados com microinjeção de flumazenil (0,1 μ L, 80 ou 160 nmol) ou veículo (salina contendo tween 80), permanecendo em repouso por 5 minutos. Em seguida, os animais receberam microinjeção de midazolan (0,1 μ L, 40 ou 80 nmol). Após 5 minutos de repouso, os peixes foram submetidos ao estresse de restrição por 3 minutos, receberam injeção subcutânea de solução de formalina a 3% (Figura 14).

Figura 14. Desenho esquemático da sequência experimental do Experimento 5. **B** – filmagem da linha de base; **V** – microinjeção de veículo (salina contendo tween 80); **F** – microinjeção de flumazenil (80 e 160 nmol); **M** – microinjeção de midazolan (40 e 80 nmol); **R**–estresse de restrição; **S** – injeção subcutânea de salina; **F** – injeção subcutânea de formalina; **PS** – filmagem do pós-estímulo.

Grupos experimentais

- Veículo + midazolan (40 nmol) + restrição 3 min (**VEI+ MID40**, n=8): microinjeção no telencéfalo Dm de veículo, microinjeção no telencéfalo Dm de midazolan (40 nmol), estresse de restrição por 3 min e injeção subcutânea de 20 µL de formalina.
- Flumazenil (80 nmol) + midazolan (40 nmol) + restrição 3 min (**FLU80+ MID40**, n=7): microinjeção no telencéfalo Dm de flumazenil (80 nmol), microinjeção no telencéfalo Dm de midazolan (40 nmol), estresse de restrição por 3 min e injeção subcutânea de 20 µL de formalina.
- Flumazenil (160 nmol) midazolan (40 nmol) + restrição 3 min + (**FLU160+ MID40**, n=8): microinjeção no telencéfalo Dm de flumazenil (160 nmol),

microinjeção no telencéfalo Dm de midazolan (40 nmol), estresse de restrição por 3 min e injeção subcutânea de 20 µL de formalina.

- Veículo + midazolan (80 nmol) + restrição 3 min (**VEI+ MID80**, n=7): microinjeção no telencéfalo Dm de veículo, microinjeção no telencéfalo Dm de midazolan (80 nmol), estresse de restrição por 3 min e injeção subcutânea de 20 µL de formalina.
- Flumazenil (80 nmol) midazolan (80 nmol) + restrição 3 min + (**FLU80+ MID40**, n=7): microinjeção no telencéfalo Dm de flumazenil (80 nmol), microinjeção no telencéfalo Dm de midazolan (80 nmol), estresse de restrição por 3 min e injeção subcutânea de 20 µL de formalina.
- Flumazenil (160 nmol) + midazolan (80 nmol) restrição 3 min + (**FLU160+ MID80**, n=8): microinjeção no telencéfalo Dm de flumazenil (160 nmol), microinjeção no telencéfalo Dm de midazolan (80 nmol), estresse de restrição por 3 min e injeção subcutânea de 20 µL de formalina.

b) Experimento 6 – Participação do telencéfalo Dm na antinocicepção endógena induzida pelo estresse de restrição de 5 minutos

1. Midazolan

Objetivo

O objetivo deste experimento foi avaliar a influência da microinjeção de midazolan, um agonista de receptores benzodiazepínicos, na região do telencéfalo dorsomedial sobre a antinocicepção induzida pelo estresse de restrição de 5 minutos.

Procedimentos experimentais

Nesta etapa foram utilizados animais pré-operados para a implantação de uma cânula-guia sobre a região do telencéfalo Dm. Os animais foram avaliados em seu estado basal (linha de base) por 5 minutos, em seguida foram tratados com microinjeção de midazolan (0,1 µL, 40 ou 80 nmol) ou veículo (salina contendo tween 80). Após 5 minutos de repouso, os peixes foram submetidos ao estresse de restrição por 5 minutos e receberam injeção subcutânea de solução de formalina a 3% ou salina (Figura 15).

Figura 15. Desenho esquemático da sequência experimental do Experimento 6. **B** – filmagem da linha de base; **V** – microinjeção de veículo (salina contendo tween 80); **M** – microinjeção de midazolol (40 e 80 nmol); **R**–estresse de restrição; **S** – injeção subcutânea de salina; **F** – injeção subcutânea de formalina; **PS** – filmagem do pós-estímulo.

Grupos experimentais:

- Veículo + restrição 5 min + salina (**VEI+ RES(5)+SAL**, n=7): microinjeção no telencéfalo Dm de veículo, estresse de restrição por 5 min e injeção subcutânea de 20 µL de salina.
- Veículo + restrição 5 min + formalina (**VEI+RES(5)+FOR**, n=7): microinjeção no telencéfalo Dm de veículo, estresse de restrição por 5 min e injeção subcutânea de 20 µL de formalina a 3%.
- Midazolol (40 nmol) + restrição 5 min + salina (**MID40+RES(5)+SAL**, n=8): microinjeção no telencéfalo Dm de midazolol (40 nmol), estresse de restrição por 5 min e injeção subcutânea de 20 µL de salina.
- Midazolol (40 nmol) + restrição 5 min + formalina (**MID40+RES(5)+FOR**, n=8): microinjeção no telencéfalo Dm de midazolol (40 nmol), estresse de restrição por 5 min e injeção subcutânea de 20 µL de formalina a 3%.

- Midazolan (80 nmol) + restrição 5 min + salina (***MID80+RES(5)+SAL***, n=7): microinjeção no telencéfalo Dm de midazolan (80 nmol), estresse de restrição por 5 min e injeção subcutânea de 20 µL de salina.
- Midazolan (80 nmol) + restrição 5 min + formalina (***MID80+RES(5)+FOR***, n=7): microinjeção no telencéfalo Dm de midazolan (80 nmol), estresse de restrição por 5 min e injeção subcutânea de 20 µL de formalina a 3%.

2. Flumazenil + Midazolan

Objetivo

O objetivo deste experimento foi avaliar a influência da microinjeção de flumazenil, um antagonista de receptores benzodiazepínicos, na região do telencéfalo dorsomedial sobre inibição da antinocicepção induzida pelo estresse de restrição de 5 minutos promovida pela microinjeção de midazolan.

Procedimentos experimentais

Nesta etapa foram utilizados animais pré-operados para a implantação de uma cânula-guia sobre a região do telencéfalo Dm. Os animais foram avaliados em seu estado basal (linha de base) por 5 minutos, em seguida foram tratados com microinjeção de flumazenil (0,1 μ L, 80 ou 160 nmol) ou veículo (salina contendo tween 80), permanecendo em repouso por 5 minutos. Em seguida, os animais receberam microinjeção de midazolan (0,1 μ L, 40 ou 80 nmol). Após 5 minutos de repouso, os peixes foram submetidos ao estresse de restrição por 5 minutos, receberam injeção subcutânea de solução de formalina a 3% (Figura 16).

Figura 16. Desenho esquemático da sequência experimental do Experimento 6. **B** – filmagem da linha de base; **V** – microinjeção de veículo; **F** – microinjeção de flumazenil (80 e 160 nmol); **M** – microinjeção de midazolan (40 e 80 nmol); **R** – estresse de restrição; **S** – injeção subcutânea de salina; **F** – injeção subcutânea de formalina; **PS** – filmagem do pós-estímulo.

Grupos experimentais

- Veículo + midazolan (40 nmol) restrição 5 min + (**VEI+ MID40**, n=8): microinjeção no telencéfalo Dm de veículo, microinjeção no telencéfalo Dm de midazolan (40 nmol), estresse de restrição por 5 min e injeção subcutânea de 20 µL de formalina.
- Flumazenil (80 nmol) + midazolan (40 nmol) restrição 5 min + (**FLU80+ MID40**, n=7): microinjeção no telencéfalo Dm de flumazenil (80 nmol), microinjeção no telencéfalo Dm de midazolan (40 nmol), estresse de restrição por 5 min e injeção subcutânea de 20 µL de formalina.
- Flumazenil (160 nmol) + midazolan (40 nmol) + restrição 5 min (**FLU160+ MID40**, n=8): microinjeção no telencéfalo Dm de flumazenil (160 nmol), microinjeção no telencéfalo Dm de midazolan (40 nmol), estresse de restrição por 5 min e injeção subcutânea de 20 µL de formalina.

- Veículo + midazolan (80 nmol) + restrição 5 min (**VEI+ MID80**, n=7): microinjeção no telencéfalo Dm de veículo, microinjeção no telencéfalo Dm de midazolan (80 nmol), estresse de restrição por 5 min e injeção subcutânea de 20 µL de formalina.
- Flumazenil (80 nmol) + midazolan (80 nmol) + restrição 5 min (**FLU80+ MID40**, n=7): microinjeção no telencéfalo Dm de flumazenil (80 nmol), microinjeção no telencéfalo Dm de midazolan (80 nmol), estresse de restrição por 5 min e injeção subcutânea de 20 µL de formalina.
- Flumazenil (160 nmol) + midazolan (80 nmol) + restrição 5 min (**FLU160+ MID80**, n=8): microinjeção no telencéfalo Dm de flumazenil (160 nmol), microinjeção no telencéfalo Dm de midazolan (80 nmol), estresse de restrição por 5 min e injeção subcutânea de 20 µL de formalina.

3.8. *Análise estatística dos dados*

Os dados da análise de cortisol sérico foram avaliados quanto à distribuição pelo teste Kolmogorov-Smirnov e quanto à homogeneidade das variâncias pelo teste de Levene. Os dados não apresentaram distribuição normal e foram submetidos à transformação em Log 10. Os valores transformados foram submetidos à análise *One-Way ANOVA*, seguida do teste *post-hoc* de Tukey ($P < 0,05$).

Os dados da atividade locomotora (distância percorrida total e velocidade de natação) foram avaliados quanto à distribuição pelo teste Kolmogorov-Smirnov e quanto à homogeneidade das variâncias pelo teste de Levene; em seguida, após comprovada a natureza paramétrica dos dados, foi realizada a análise de variância de uma via (*One-way ANOVA*) para comparar a atividade locomotora dos animais em cada experimento. Quando for verificado efeito significativo o teste *post-hoc* de Tukey ($P < 0,05$) foi realizado.

4. RESULTADOS

Houve um efeito significativo do estresse de restrição sobre os níveis de cortisol sérico dos peixes (ANOVA: $F_{2,21} = 43,98$; $P < 0,001$). Os animais submetidos ao estresse de restrição de 3 e 5 minutos apresentaram um aumento significativo nos níveis de cortisol sérico quando comparados aos animais não submetidos ao estresse (*Tukey test*: $P < 0,001$). Não houve diferença nos níveis de cortisol entre os animais submetidos a 3 e 5 minutos de estresse de restrição (*Tukey test*: $P = 0,953$) (Figura 17).

Não houve efeito significativo do estresse sobre a atividade locomotora dos animais (Distancia: Controle – 110.61 ± 125.83 cm; 3 min – 184.03 ± 124.28 cm; 5 min – 90.90 ± 46.15 cm; e velocidade de natação: Controle – 0.396 ± 0.41 cm.s⁻¹; 3 min – 0.61 ± 0.39 cm.s⁻¹; 5 min – 0.30 ± 0.15 cm.s⁻¹) (ANOVA: $F_{2,15} = 1,820$; $P = 0,196$).

Figura 17. Concentração de cortisol sérico (ng.mL⁻¹) em piaçuçus (*Leporinus macrocephalus*) submetidos ao estresse de restrição de 3 e 5 minutos. Grupos experimentais: animais não submetidos ao estresse de restrição (Controle, n=8); animais submetidos ao estresse de restrição de 3 minutos (RES(3), n=8); animais submetidos ao estresse de restrição de 5 minutos (RES(5), n=8). Letras diferentes indicam diferença estatística (ANOVA seguida do teste *post-hoc* Tukey, $p<0,05$).

PRIMEIRA ETAPA: Análise da antinocicepção endógena induzida pelo estresse de restrição*a) Experimento 1. Influência do tempo de estresse de restrição sobre a antinocicepção*

Houve um efeito significativo da injeção subcutânea de formalina a 3% na região da nadadeira adiposa sobre a distância percorrida (ANOVA: $F_{5,42} = 12,37$; $P < 0,001$) e a velocidade de natação dos peixes (ANOVA: $F_{5,42} = 11,26$; $P < 0,001$). A injeção subcutânea de formalina a 3% (*FOR*) provocou aumento significativo na distância percorrida e na velocidade de natação dos peixes durante os 5 minutos de análise comportamental quando comparados com a injeção de salina (*SAL*) (Tukey test: $P < 0,001$). O aumento da atividade locomotora em resposta à injeção subcutânea de formalina é rápida, sendo observada imediatamente após a administração da droga. Além disso, os animais apresentam natação errática, percorrendo todo o espaço do aquário.

O estresse de restrição influenciou significativamente a resposta locomotora à formalina (ANOVA: distância - $F_{5,42} = 12,37$; $P < 0,001$; velocidade - $F_{5,42} = 11,26$; $P < 0,001$). Nos animais submetidos ao estresse de restrição de 3 minutos (*RES(3)* + *FOR*), a distância percorrida e a velocidade de natação foram significativamente menores que os valores observados nos animais não estressados (*FOR*) (Tukey test: $P < 0,001$), mas não diferiram significativamente dos grupos *SAL* (Tukey test: distância - $P = 0,144$; velocidade - $P = 0,209$) e *RES(3)* + *SAL* (Tukey test: distância - $P = 0,997$;

velocidade - $P=0,999$). Os animais submetidos ao estresse de restrição de 5 minutos (*RES(5) + FOR*) apresentaram padrão comportamental semelhante aos submetidos ao estresse de 3 minutos, sendo que a distância percorrida e a velocidade de natação foram significativamente menores que os valores observados nos animais não estressados (*FOR*) (*Tukey test*: $P<0,001$), mas não foram significativamente diferentes dos grupos *SAL* (*Tukey test*: distância - $P=1,000$; velocidade - $P=1,000$) e *RES(5) + SAL* (*Tukey test*: distância - $P=0,721$; velocidade - $P=0,706$). Não houve diferença significativa na distância percorrida e na velocidade entre os animais que foram submetidos a 3 e 5 minutos de estresse de restrição antes da injeção subcutânea de formalina (*Tukey test*: distância - $P=0,235$; velocidade - $P=0,229$) (Figura18).

Figura 18. Efeito de diferentes tempos de estresse de restrição sobre a atividade locomotora do piauçu (*Leporinus macrocephalus*) submetido a um estímulo nocivo (formalina a 3% subcutaneamente). A. Δ distância (cm); B. Δ velocidade de natação. Injeção subcutânea de salina (SAL; n=8); injeção subcutânea de formalina (FOR; n=8); injeção subcutânea de salina imediatamente após 3 minutos de estresse de restrição (RES(3)+SAL; n= 8); injeção subcutânea de formalina imediatamente após 3 minutos de estresse de restrição (RES(3)+FOR; n=8); injeção subcutânea de salina imediatamente após 5 minutos de estresse de restrição (RES(5)+SAL; n=8); injeção subcutânea de formalina imediatamente após 5 minutos de estresse de restrição (RES(5)+FOR ; n =8). Letras diferentes indicam diferença estatística (ANOVA seguida do teste *post-hoc* Tukey, $p < 0,05$).

b) Experimento 2 – Análise da duração da antinocicepção endógena induzida pelo estresse de restrição de 3 e 5 minutos

Houve um efeito significativo do tempo na inibição da resposta locomotora a formalina induzida pelo estresse de restrição de 3 minutos (ANOVA: distância - $F_{4,36} = 16,95$; $P < 0,001$; velocidade - $F_{4,36} = 16,35$; $P = 0,001$). A distância percorrida e a atividade locomotora de animais não submetidos à restrição foram significativamente maiores que a de animais que receberam injeção subcutânea de formalina imediatamente após a restrição e 5 min após a restrição (*Tukey test*: $P < 0,001$). As injeções subcutâneas de formalina 10 e 15 minutos após a restrição promoveram um aumento na atividade locomotora similar à apresentada pelos animais que não foram submetidos à restrição (Figura 19).

A análise *Two-way* ANOVA demonstrou que não houve efeito significativo da duração do estresse de restrição e da interação tempo de injeção X duração da restrição na atividade locomotora em resposta à injeção subcutânea de formalina ($F_{1,54} = 0,029$; $P = 0,865$ e $F_{3,54} = 2,06$; $P = 0,016$). Foi observado um efeito significativo para o tempo de injeção sobre a resposta locomotora à formalina ($F_{3,54} = 18,255$; $P < 0,001$).

Houve um efeito significativo do tempo na inibição da resposta locomotora à formalina induzida por 5 minutos de estresse de restrição (ANOVA: $F_{4,34} = 6,71$; $P < 0,001$). A distância percorrida e a velocidade de natação dos animais foram significativamente menores que as apresentadas pelos animais não submetidos a restrição quando a formalina foi aplicada imediatamente após a restrição (0 min) e 5 minutos após a restrição (*Tukey test*: $P < 0,001$). A aplicação de formalina 10 e 15 minutos após o término da restrição promoveu aumento da atividade natatória, sendo a

velocidade de natação e a distância percorrida semelhante às apresentadas pelos animais não submetidos ao estresse (Figura 20).

Figura 19. Análise temporal do efeito do estresse de restrição de 3 minutos sobre a atividade locomotora de *L. macrocephalus* submetido a injeção subcutânea de formalina a 3%. Os dados são apresentados como a diferença (Δ) entre pós-estímulo e linha de base. A. Δ distância percorrida; B. Δ velocidade de natação. Injeção subcutânea de formalina sem restrição prévia (FOR; n=8); injeção subcutânea de formalina imediatamente após a restrição (0 min, n=8); injeção subcutânea de formalina 5 min após a restrição (5 min, n=8); injeção subcutânea de formalina 10 min após a restrição (10 min, n=8); injeção subcutânea de formalina 15 min após a restrição (15 min, n=8). Letras diferentes indicam diferença significativa (ANOVA seguida do teste *post-hoc* Tukey, $p < 0,05$).

Figura 20. Análise temporal do efeito do estresse de restrição de 5 minutos sobre a atividade locomotora de *L. macrocephalus* submetido a injeção subcutânea de formalina a 3%. Os dados são apresentados como a diferença (Δ) entre pós-estímulo e linha de base. A. Δ distância percorrida; B. Δ velocidade de natação. Injeção subcutânea de formalina sem restrição prévia (FOR; n=8); injeção subcutânea de formalina imediatamente após a restrição (0 min, n=8); injeção subcutânea de formalina 5 min após a restrição (5 min, n=8); injeção subcutânea de formalina 10 min após a restrição (10 min, n=8); injeção subcutânea de formalina 15 min após a restrição (15 min, n=8). Letras diferentes indicam diferença significativa (ANOVA seguida do teste *post-hoc* Tukey, $p < 0,05$).

c) **Experimento 3** – *Análise da natureza neuroquímica da antinocicepção induzida pelo estresse de restrição de 3 minutos*

1. Sistema Opioide

Houve um efeito significativo da injeção intraperitoneal de naloxona (30 mg.kg^{-1}) sobre a inibição da resposta nociceptiva induzida por 3 minutos de restrição (ANOVA: $F_{5,42} = 18,16$; $P < 0,001$). A injeção intraperitoneal de naloxona 30 minutos antes da restrição de 3 minutos bloqueou a inibição da resposta motora à formalina induzida pelo estresse. Nos animais que foram tratados com naloxona 30 minutos antes do estresse de restrição seguido de injeção subcutânea de formalina (*NAL+RES (3)+FOR*) a distância percorrida e a velocidade foram semelhantes aos valores apresentados pelos animais não imobilizados que receberam injeção subcutânea de formalina (*FOR*), mas foram significativamente maiores que os valores apresentados pelos grupos *SAL*, *SAL+RES(3)+SAL*, *SAL+RES(3)+FOR* e *NAL+RES(3)+SAL* (*Tukey test*: $P < 0,001$), (Figura 21).

Figura 21. Efeito da injeção intraperitoneal de naloxona (30 mg.kg^{-1}) sobre a atividade locomotora do piaçu (*Leporinus macrocephalus*) submetido ao estresse de restrição de 3 minutos seguido de um estímulo nocivo (formalina a 3% subcutaneamente). Injeção subcutânea de salina (SAL; n=7); injeção subcutânea de formalina (FOR; n=8); injeção intraperitoneal de salina + restrição 3 min + injeção subcutânea de salina (SAL+RES(3)+SAL; n=8); injeção intraperitoneal de salina + restrição 3 min + injeção subcutânea de formalina (SAL+RES(3)+FOR; n=8); injeção intraperitoneal de naloxona + restrição 3 min + injeção subcutânea de salina (NAL+RES(3)+SAL; n=8); injeção intraperitoneal de naloxona + restrição 3 min + injeção subcutânea de formalina (NAL+RES(3)+FOR; n=8). Letras diferentes indicam diferença estatística (ANOVA seguida do teste *post-hoc* Tukey, $p < 0,05$).

2. Sistema endocanabinoide

Houve um efeito significativo da injeção intraperitoneal de AM251 (3 mg.kg^{-1}) sobre a inibição da resposta nociceptiva induzida por 3 minutos de restrição (ANOVA: $F_{5, 36} = 25,418$; $P < 0,001$). A injeção intraperitoneal de AM251 30 minutos antes do estresse de restrição de 3 minutos bloqueou a analgesia induzida pelo estresse. Nos animais que foram tratados com AM251 antes da restrição seguido de injeção subcutânea de formalina (*AM251+RES(3)+FOR*) a distância percorrida e a velocidade foram semelhantes aos valores apresentados pelos animais não estressados que receberam injeção subcutânea de formalina (*FOR*), mas foram significativamente maiores que os valores apresentados pelos grupos *SAL*, *VEI+RES(3)+SAL* e *VEI+RES(3)+FOR* (*Tukey test*: $P < 0,001$) (Figura 22).

Figura 22. Efeito da injeção intraperitoneal de AM251 (3 mg.kg^{-1}) sobre a atividade locomotora do piaçu (*Leporinus macrocephalus*) submetido ao estresse de restrição de 3 minutos seguido de um estímulo nocivo (formalina a 3% subcutaneamente). Injeção subcutânea de salina (SAL; $n=7$); injeção subcutânea de formalina (FOR; $n=7$); injeção intraperitoneal de veículo + restrição 3 min + injeção subcutânea de salina (VEI+RES(3)+SAL; $n=7$); injeção intraperitoneal de veículo + restrição 3 min + injeção subcutânea de formalina (VEI+RES(3)+FOR; $n=7$); injeção intraperitoneal de AM251 + restrição 3 min + injeção subcutânea de salina (AM251+RES(3)+SAL; $n=7$); injeção intraperitoneal de AM251 + restrição 3 min + injeção subcutânea de formalina (AM251+RES(3)+FOR; $n=7$). Letras diferentes indicam diferença estatística (ANOVA seguida do teste *post-hoc* Tukey, $p<0,05$).

*d) Experimento 4 – Análise da natureza neuroquímica da antinocicepção
induzida pelo estresse de restrição de 5 minutos*

1. Sistema Opioide

Não houve um efeito significativo da injeção intraperitoneal de naloxona (30 mg.kg⁻¹) sobre a inibição da resposta nociceptiva induzida por 5 minutos de restrição (ANOVA: $F_{5,42} = 7,94$; $P < 0,001$). A injeção intraperitoneal de naloxona antes da restrição de 5 minutos não bloqueou a inibição da resposta motora à formalina induzida pelo estresse. Nos animais que foram tratados com naloxona 30 minutos antes da restrição seguido de injeção subcutânea de formalina (*NAL+RES (5)+ FOR*) a distância percorrida e a velocidade foram significativamente menores que os valores apresentados pelos animais não submetidos a restrição que receberam injeção subcutânea de formalina (*FOR*) (*Tukey test*: $P < 0,001$) e semelhantes aos demais tratamentos (Figura 23).

Figura 23. Efeito da injeção intraperitoneal de naloxona (30 mg.kg^{-1}) sobre a atividade locomotora do piauçu (*Leporinus macrocephalus*) submetido ao estresse de restrição de 5 minutos seguido de um estímulo nocivo (formalina a 3% subcutaneamente). Injeção subcutânea de salina (SAL; $n=7$); injeção subcutânea de formalina (FOR; $n=8$); injeção intraperitoneal de salina + restrição 5 min + injeção subcutânea de salina (SAL+RES(5)+SAL; $n=8$); injeção intraperitoneal de salina + restrição 5 min + injeção subcutânea de formalina (SAL+RES(5)+FOR; $n=8$); injeção intraperitoneal de naloxona + restrição 5 min + injeção subcutânea de salina (NAL+RES(5)+SAL; $n=8$); injeção intraperitoneal de naloxona + restrição 5 min + injeção subcutânea de formalina (NAL+RES(5)+FOR; $n=8$). Letras diferentes indicam diferença estatística (ANOVA seguida do teste *post-hoc* Tukey, $p<0,05$).

2. Sistema endocanabinoide

Houve um efeito significativo da injeção intraperitoneal de AM251 (3 mg.kg^{-1}) sobre a inibição da resposta nociceptiva induzida por 5 minutos de restrição (ANOVA: $F_{5, 36} = 22,799$; $P < 0.001$). A injeção intraperitoneal de AM251 30 minutos antes do estresse de restrição de 5 minutos bloqueou a analgesia induzida pelo estresse. Nos animais que foram tratados com AM251 antes da restrição seguido de injeção subcutânea de formalina (*AM251+RES(5)+FOR*) a distância percorrida e a velocidade foram semelhantes aos valores apresentados pelos animais não estressados que receberam injeção subcutânea de formalina (*FOR*), mas foram significativamente maiores que os valores apresentados pelos grupos *SAL*, *VEI+RES(5)+SAL* e *VEI+RES(5)+FOR* (*Tukey test*: $P < 0,001$) (Figura 24).

Figura 24. Efeito da injeção intraperitoneal de AM251 (3 mg.kg^{-1}) sobre a atividade locomotora do piauçu (*Leporinus macrocephalus*) submetido ao estresse de restrição de 5 minutos seguido de um estímulo nocivo (formalina a 3% subcutaneamente). Injeção subcutânea de salina (SAL; n=7); injeção subcutânea de formalina (FOR; n=7); injeção intraperitoneal de veículo + restrição 5 min + injeção subcutânea de salina (VEI+RES(5)+SAL; n=7); injeção intraperitoneal de veículo + restrição 5 min + injeção subcutânea de formalina (VEI+RES(5)+FOR; n=7); injeção intraperitoneal de AM251 + restrição 5 min + injeção subcutânea de salina (AM251+RES(5)+SAL; n=7); injeção intraperitoneal de AM251+ restrição 5 min + injeção subcutânea de formalina (AM251+RES(5)+FOR; n=7). Letras diferentes indicam diferença estatística (ANOVA seguida do teste *post-hoc* Tukey, $p < 0,05$).

SEGUNDA ETAPA: Participação do telencéfalo dorsomedial (Dm) na antinocicepção induzida pelo estresse de restrição

a) Experimento 5 – Participação do telencéfalo Dm na antinocicepção endógena induzida pelo estresse de restrição de 3 minutos

1. Midazolan

Houve um efeito significativo da microinjeção de midazolan em Dm sobre a inibição da resposta nociceptiva induzida por 3 minutos de restrição (ANOVA: $F_{5,43} = 21,367$; $P < 0,001$). A microinjeção de midazolan (40 e 80 nmol) em Dm bloqueou a analgesia induzida pela restrição de 3 minutos. Nos animais que foram tratados com microinjeção de midazolan no telencéfalo Dm 5 minutos antes da restrição seguido de injeção subcutânea de formalina (*MID40+RES(3)+FOR* e *MID80+RES(3)+FOR*) a distância percorrida e a velocidade foram significativamente maiores que os animais dos grupos *VEI+RES(3)+SAL*, *VEI+RES(3)+FOR*, *MID40+RES(3)+SAL* e *MID80+RES(3)+SAL* (*Tukey test*: $P < 0,001$). Não houve diferença significativa entre os animais tratados com microinjeção de 40 a 80 nmol de midazolan (Figura 25).

Figura 25. Efeito da microinjeção de midazolam (40 e 80 nmol; 0,01 μ l) no telencéfalo dorsomedial sobre a atividade locomotora do piauçu (*Leporinus macrocephalus*) submetido ao estresse de restrição de 3 minutos seguido de um estímulo nocivo (formalina a 3% subcutaneamente). Microinjeção de veículo + restrição 3 min + injeção subcutânea de salina (VEI+RES(3)+SAL; n=7); microinjeção de veículo + restrição 3 min + injeção subcutânea de formalina (VEI+RES(3)+FOR; n=7); microinjeção de midazolam (40 nmol) + restrição 3 min + injeção subcutânea de salina (MID40+RES(3)+SAL; n=8); microinjeção de midazolam (40 nmol) + restrição 3 min + injeção subcutânea de formalina (MID40+RES(3)+FOR; n=8); microinjeção de midazolam (80 nmol) + restrição 3 min + injeção subcutânea de salina (MID80+RES(3)+SAL; n=7); microinjeção de midazolam (80 nmol) + restrição 3 min + injeção subcutânea de formalina (MID80+RES(3)+FOR; n=7). Letras diferentes indicam diferença estatística (ANOVA seguida do teste *post-hoc* Tukey, $p < 0,05$).

2. Flumazenil + Midazolan

Houve um efeito significativo do pré-tratamento com flumazenil sobre o bloqueio da antinocicepção induzido pela microinjeção de midazolan em Dm (ANOVA: $F_{5,44} = 6,407$; $P < 0,001$) O pré-tratamento com flumazenil (160 nmol) bloqueou o efeito do midazolan (40 e 80 nmol) sobre a antinocicepção induzida pela restrição. Nos animais que receberam microinjeção de flumazenil na concentração de 160 nmol 5 minutos antes de receberem a microinjeção de midazolan (40 e 80 nmol) no telencéfalo dorsomedial (*FLU160+MID40* e *FLU160+ MID80*) apresentaram velocidade de natação e distância percorrida significativamente menores que os animais que receberam microinjeção prévia de veículo (*VEI+ MID40* e *VEI+ MID80*) (*Tukey test*: $P < 0,001$).

O pré-tratamento com flumazenil (80 nmol) não bloqueou o efeito do midazolan sobre a antinocicepção induzida pela restrição. Nos animais que receberam microinjeção de flumazenil na concentração de 80 nmol 5 minutos antes de receberem a microinjeção de midazolan (40 e 80 nmol) no telencéfalo dorsomedial (*FLU80+ MID40* e *FLU80+MID80*) apresentaram velocidade de natação e distância percorrida semelhantes aos animais que receberam microinjeção prévia de veículo (*VEI+ MID40* e *VEI+ MID80*) (Figura 26).

Figura 26. Efeito da microinjeção de flumazenil (80 e 160 nmol, 0,01 μ l) seguido de microinjeção de midazolam (40 e 80 nmol; 0,01 μ l) no telencéfalo dorsomedial sobre a atividade locomotora do piauçu (*Leporinus macrocephalus*) submetido ao estresse de restrição de 3 minutos seguido de um estímulo nocivo (formalina a 3% subcutaneamente). Microinjeção de veículo + microinjeção de midazolam (40 nmol) + restrição 3 min (VEI+MID40; n=8); microinjeção de flumazenil (80 nmol) + microinjeção de midazolam (40 nmol) + restrição 3 min (FLU80+MID40; n=7); microinjeção de flumazenil (160 nmol) + microinjeção de midazolam (40 nmol) + restrição 3 min (FLU160+MID40; n=8); microinjeção de veículo + microinjeção de midazolam (80 nmol) + restrição 3 min (VEI+MID80; n=7); microinjeção de flumazenil (80 nmol) + microinjeção de midazolam (80 nmol) + restrição 3 min (FLU80+MID80; n=7); microinjeção de flumazenil (160 nmol) + microinjeção de midazolam (80 nmol) + restrição 3 min (FLU160+RES(3)+MID80; n=8). Letras diferentes indicam diferença estatística (ANOVA seguida do teste *post-hoc* Tukey, $p < 0,05$).

b) Experimento 6 – Participação do telencéfalo Dm na antinocicepção endógena induzida pelo estresse de restrição de 5 minutos

1. Midazolan

Houve um efeito significativo da microinjeção de midazolan em Dm sobre a inibição da resposta nociceptiva induzida por 5 minutos de restrição (ANOVA: $F_{5,45} = 11,247$; $P < 0,001$). A microinjeção de midazolan (40 e 80 nmol) em Dm bloqueou a analgesia induzida pela restrição de 5 minutos. Nos animais que foram tratados com microinjeção de midazolan no telencéfalo Dm 5 minutos antes da restrição seguido de injeção subcutânea de formalina (*MID40+RES(5)+FOR* e *MID80+RES(5)+FOR*) a distância percorrida e a velocidade foram significativamente maiores que os animais dos grupos *VEI+RES(5)+SAL*, *VEI+RES(5)+FOR*, *MID40+RES(5)+SAL* e *MID80+RES(5)+SAL* (*Tukey test*: $P < 0,001$). Não houve diferença significativa entre os animais tratados com microinjeção de 40 a 80 nmol de midazolan (Figura 27).

Figura 27. Efeito da microinjeção de midazolam (40 e 80 nmol; 0,01 μ l) no telencéfalo dorsomedial sobre a atividade locomotora do piauçu (*Leporinus macrocephalus*) submetido ao estresse de restrição de 5 minutos seguido de um estímulo nocivo (formalina a 3% subcutaneamente). Microinjeção de veículo + restrição 5 min + injeção subcutânea de salina (VEI+RES(5)+SAL; n=7); microinjeção de veículo + restrição 5 min + injeção subcutânea de formalina (VEI+RES(5)+FOR; n=7); microinjeção de midazolam (40 nmol) + restrição 5 min + injeção subcutânea de salina (MID40+RES(5)+SAL; n=8); microinjeção de midazolam (40 nmol) + restrição 5 min + injeção subcutânea de formalina (MID40+RES(5)+FOR; n=8); microinjeção de midazolam (80 nmol) + restrição 5 min + injeção subcutânea de salina (MID80+RES(5)+SAL; n=7); microinjeção de midazolam (80 nmol) + restrição 5 min + injeção subcutânea de formalina (MID80+RES(5)+FOR; n=7). Letras diferentes indicam diferença estatística (ANOVA seguida do teste *post-hoc* Tukey, $p < 0,05$).

1. Flumazenil + Midazolan

Houve um efeito significativo do pré-tratamento com flumazenil sobre o bloqueio da antinocicepção induzido pela microinjeção de midazolan em Dm (ANOVA: $F_{5,44} = 7,638$; $P < 0,001$) O pré-tratamento com flumazenil (160 nmol) bloqueou o efeito do midazolan (40 e 80 nmol) sobre a antinocicepção induzida pela restrição. Nos animais que receberam microinjeção de flumazenil na concentração de 160 nmol 5 minutos antes de receberem a microinjeção de midazolan (40 e 80 nmol) no telencéfalo Dm (*FLU160+ MID40* e *FLU160+ MID80*) apresentaram velocidade de natação e distância percorrida significativamente menores que os animais que receberam microinjeção prévia de veículo (*VEI+ MID40* e *VEI+ MID80*) (*Tukey test*: $P < 0,001$).

O pré-tratamento com flumazenil (80 nmol) não bloqueou o efeito do midazolan sobre a antinocicepção induzida pela restrição. Nos animais que receberam microinjeção de flumazenil na concentração de 80 nmol 5 minutos antes de receberem a microinjeção de midazolan (40 e 80 nmol) no telencéfalo Dm (*FLU80+ MID40* e *FLU80+ MID80*) apresentaram velocidade de natação e distância percorrida semelhantes aos animais que receberam microinjeção prévia de veículo (*VEI+ MID40* e *VEI+ MID80*) (Figura 28).

Figura 28. Efeito da microinjeção de flumazenil (80 e 160 nmol, 0,01 μ l) seguido de microinjeção de midazolam (40 e 80 nmol; 0,01 μ l) no telencéfalo dorsomedial sobre a atividade locomotora do piauçu (*Leporinus macrocephalus*) submetido ao estresse de restrição de 5 minutos seguido de um estímulo nocivo (formalina a 3% subcutaneamente). Microinjeção de veículo + microinjeção de midazolam (40 nmol) + restrição 5 min (VEI+MID40; n=8); microinjeção de flumazenil (80 nmol) + microinjeção de midazolam (40 nmol) + restrição 5 min (FLU80+MID40; n=7); microinjeção de flumazenil (160 nmol) + microinjeção de midazolam (40 nmol) + restrição 5 min (FLU160+MID40; n=8); microinjeção de veículo + microinjeção de midazolam (80 nmol) + restrição 5 min (VEI+MID80; n=7); microinjeção de flumazenil (80 nmol) + microinjeção de midazolam (80 nmol) + restrição 5 min (FLU80+MID80; n=7); microinjeção de flumazenil (160 nmol) + microinjeção de midazolam (80 nmol) + restrição 5 min (FLU160+MID80; n=8). Letras diferentes indicam diferença estatística (ANOVA seguida do teste *post-hoc* Tukey, $p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

Análise da antinocicepção endógena induzida pelo estresse de restrição

Nossos resultados demonstram a existência de um sistema de antinocicepção endógena em peixes, ativado por um estresse agudo, e capaz de modular a resposta motora à injeção subcutânea de formalina, de maneira semelhante ao observado em mamíferos. Esta evidência de modulação endógena da nocicepção em peixes, associada a estudos prévios nesta área (ASHLEY *et al.*, 2009; ALVES *et al.*, 2013), trazem novas perspectivas acerca da evolução da nocicepção e da dor no filo dos vertebrados.

Neste estudo, a injeção subcutânea de formalina a 3% na região da nadadeira adiposa, foi utilizada como estímulo nocivo. O uso da formalina como estímulo nocivo em estudos de dor é amplamente difundido em mamíferos desde a década de 70 (DUBUISSON & DENNIS, 1977) e foi adaptado para peixes em nosso laboratório (ALVES *et al.*, 2013). A formalina é uma substância química que, quando administrada por via subcutânea, promove respostas nociceptivas pela ativação dos nociceptores diretamente, em uma fase inicial, e indiretamente, em uma fase inflamatória subsequente (TJØLSEN *et al.*, 1992). Em piaçu, estudo prévio de nosso laboratório demonstrou que as alterações comportamentais em resposta à formalina ocorrem, principalmente, nos 5 primeiros minutos após o estímulo, não sendo observadas alterações significativas após este período (ALVES, 2010), sendo assim, o período de análise escolhido para o presente estudo foi de 5 min após o estímulo nocivo. Neste estudo, a administração subcutânea de formalina a 3% na nadadeira adiposa promoveu

aumento na atividade natatória do piaçu (*L. macrocephalus*), evidenciado pelo aumento na distância percorrida durante o período de observação, bem como o aumento na velocidade de natação. A resposta motora à injeção subcutânea de formalina é rápida, sendo observada imediatamente após a administração da droga e se caracteriza por natação errática, possivelmente indicando percepção do estímulo nocivo. Segundo Cherchova (1997), em peixes, assim como em outros vertebrados, a resposta comportamental frente a um estímulo doloroso está relacionada ao aumento dos movimentos destinados a afastar o animal da sensação aversiva. Sendo assim, o aumento da atividade natatória pode ser utilizado como indicador da percepção do estímulo nocivo. Um aumento na atividade locomotora também foi associado com a nocicepção em peixes utilizando estímulo nocivo químico (injeção subcutânea de formalina) (ALVES *et al.*, 2013) e mecânico (clipe na nadadeira caudal) (ROQUES *et al.*, 2010). Há, ainda, evidências eletrofisiológicas demonstrando a ativação dos nociceptores por substâncias químicas nocivas em peixes (SNEDDON *et al.*, 2003a; METTAN *et al.*, 2012). Além do aumento na atividade locomotora, outras alterações comportamentais estão relacionadas com a aplicação de estímulos químicos nocivos em peixes, incluindo o aumento na frequência ventilatória (REILLY *et al.*, 2008a; ALVES *et al.*, 2013) e a realização de comportamentos atípicos como o "rubbing", que consiste em esfregar o lábio (onde a substância foi injetada) na parede do aquário e o "rocking", em que o animal fica se movimentando de um lado a outro e raspando a região da injeção no cascalho (SNEDDON, 2003a; REILLY *et al.*, 2008a). A variedade de comportamentos induzidos por estímulos nocivos em várias espécies de peixes estudadas indicam que as respostas comportamentais e fisiológicas a eventos nociceptivos são espécie específicos entre os peixes (REILLY *et al.*, 2008a; SNEDDON, 2009; SNEDDON, 2011; SNEDDON 2012).

A resposta comportamental à formalina é inibida pela aplicação do estresse de restrição, sugerindo que este estressor desencadeia um efeito antinociceptivo. A restrição de 3 e 5 minutos de duração promoveu um aumento drástico nos níveis de cortisol sérico, indicando que este procedimento é altamente estressante para os animais (PICKERING *et al.*). Embora o aumento nos níveis de cortisol possa estar relacionado à alterações nos padrões locomotores (ØVERLI *et al.*, 2002), a supressão da resposta locomotora à formalina não pode ser atribuída ao efeito do cortisol sobre a atividade locomotora dos peixes, pois nenhuma alteração locomotora foi observada nos peixes submetidos apenas à restrição. Sendo assim, a inibição da resposta à formalina induzida pelo estresse de restrição pode indicar a ativação de um sistema antinociceptivo endógeno. Em mamíferos, o sistema antinociceptivo endógeno é um componente do comportamento defensivo e pode ser mobilizado em situações de estresse ou durante encontros agonísticos em que há risco de injúria para o animal (BUTLER & FINN, 2009).

A existência de um sistema antinociceptivo endógeno já foi previamente demonstrada em truta arco íris (*Onchorynhus mykiss*) (ASHLEY *et al.*, 2009) e piaçu (ALVES *et al.*, 2013). A existência de um sistema antinociceptivo endógeno em peixes sugere que este sistema evoluiu cedo no filo dos vertebrados. Em mamíferos, os primeiros estudos acerca da analgesia endógena mobilizada por fatores ambientais foram realizados na década de 70. Em estudo com ratos, Hayes *et al.* (1978) demonstraram que uma potente antinocicepção pode ser produzida por diversos estímulos estressantes como choque nas patas, rotação centrífuga e injeção intraperitoneal de salina hipertônica, sendo esta resposta dependente de atividade supraespinal. Além disso, este estudo demonstrou que estes estímulos parecem afetar

especificamente a percepção da dor, medida pelo teste da retirada da cauda e da placa quente, já que a atividade locomotora, os reflexos corneais, a vocalização, as respostas de sobressalto e a resposta ao toque permaneciam inalterados (HAYES *et al.*, 1978). O primeiro estudo envolvendo a analgesia induzida pela restrição foi realizado em ratos e demonstrou que 1, 2 e 4 horas de restrição produzem uma crescente antinocicepção, medida pelo teste de retirada da cauda (BHATTACHARYA *et al.*, 1978). Outro estudo demonstrou, ainda, que a restrição (1 h) produz analgesia, medida pelo teste de retirada da cauda, em ratos e camundongos, sendo esta analgesia bloqueada por naloxona (KULKARNI, 1980). Já em animais não-mamíferos, a primeira evidência de analgesia induzida pelo estresse foi apresentada em 1983, em estudos realizados com rãs (*Rana pipiens pipiens*). Neste estudo o estresse causado pelo teste algosimétrico (injeção subcutânea de ácido acético) sucessivo, sem adaptação ao aparato experimental promoveu analgesia que não foi bloqueada por naloxona, demonstrando a participação de sistemas não opioides (PEZALLA, 1983). Outros estudos com a mesma espécie de rã demonstraram que o estresse de restrição de 1 ou 2 h de duração também é capaz de induzir analgesia endógena, sendo esta resposta bloqueada pelo pré-tratamento com naloxona (PEZALLA & DICIG, 1984; STEVENS *et al.*, 1995). Em nosso estudo, uma restrição de curta duração foi suficiente para mobilizar o sistema antinociceptivo de peixes. Embora os estudos com mamíferos e anfíbios utilizem períodos prolongados de restrição para induzir nocicepção (0,5 a 4 horas) (HAYES *et al.*, 1978; BHATTACHARYA *et al.*, 1978; PEZALLA & DICIG, 1984; STEVENS *et al.*, 1995), um estudo demonstra que a antinocicepção já pode ser observada após poucos minutos (5 min) do início da restrição também em mamíferos (JØRGENSEN *et al.*, 1984).

Além de apresentar uma rápida ativação, a restrição promove uma antinocicepção de curta duração nos peixes, durando aproximadamente 5 min. Estudos com mamíferos demonstram que a duração da antinocicepção endógena induzida pelo estresse é dependente do tipo e intensidade do estresse aplicado. Uma antinocicepção de curta duração, de até 15 minutos, foi descrita para mamíferos submetidos ao nado forçado (COPPER & CARMODYU, 1982), choque nas patas (LEWIS *et al.*, 1980; IZUMI *et al.*, 1983; ROSS & RANDICH, 1984) e à imobilização submersa em água (IZUMI *et al.*, 1983). Já uma antinocicepção de longa duração foi observada em ratos submetidos a um longo período de restrição (30 min), com duração de mais de 60 min (AMIR & AMIT, 1978). A antinocicepção de curta duração observada no presente estudo pode estar relacionada ao curto período de restrição utilizado no protocolo experimental. É possível que períodos mais prolongados de restrição possam promover uma antinocicepção com diferentes durações.

Analisando a natureza neuroquímica da antinocicepção induzida pelo estresse de restrição em piauí nós observamos que esta resposta parece ser mediada pela interação de mecanismos distintos, dependendo da duração da restrição. A antinocicepção induzida pelo estresse de restrição de 3 min de duração foi bloqueada pelo tratamento prévio com naloxona e com AM251, sugerindo uma possível interação entre mecanismos opioidérgicos e canabinoides na mediação da resposta antinociceptiva. Já a antinocicepção induzida pelo estresse de restrição de 5 min de duração não foi alterada pelo tratamento prévio com naloxona, mas foi inibida pelo AM251, indicando um predomínio de mecanismos endocanabinoides na modulação da antinocicepção induzida por um estresse de duração mais prolongada. A ativação de diferentes mecanismos de

modulação nociceptiva reforça a ideia de complexidade dos processos envolvendo nocicepção e antinocicepção em peixes.

Estudos com mamíferos demonstram que a analgesia induzida pelo estresse pode ser mediada tanto por fatores opioides como não opioides, dependendo do tipo do estresse, tempo de aplicação e local de aplicação do estímulo (BODNAR *et al.*, 1978; CHANCE & ROSECRANS, 1979; LEWIS *et al.*, 1980; WATKINS *et al.*, 1982; PARIKH *et al.*, 2011). Estudo com ratos demonstrou que o estresse causado por choque inescapável nas patas pode causar um tipo de analgesia opioide ou não opioide, dependendo de parâmetros temporais. Um estresse promovido por um choque (60 Hz e 3 mA de corrente constante) intermitente (pulsos de 1 seg a cada 5 seg) por 30 min promove uma profunda analgesia que pode ser bloqueada pela naloxona. Já um estresse produzido por choque curto (3 min) e contínuo produz uma analgesia que não pode ser bloqueada pela naloxona, demonstrando o envolvimento de dois possíveis substratos independentes na analgesia induzida pelo estresse, sendo que apenas um parece agir pelo sistema opioide (LEWIS *et al.*, 1980). Outro estudo com ratos demonstrou que, assim como os parâmetros temporais, a localização do estímulo estressante (choque nas patas) também pode influenciar no tipo de analgesia mobilizada. A aplicação de choques curtos (90 s) nas patas dianteiras parece mobilizar uma analgesia de origem opioide, sendo revertida pela naloxona. Em contraste, a analgesia resultante do choque nas patas traseiras não é revertida pela naloxona, evidenciando a participação de outros sistemas na mediação dessa analgesia (WATKINS *et al.*, 1982). Estudo com camundongos, utilizando a natação como estímulo estressante, também demonstrou que a beta-endorfina tem um papel funcional na analgesia produzida por natação de curta

duração (3 min), mas não parece estar envolvida na analgesia induzida por natação de longa duração (15 min) (PARIKH *et al.*, 2011).

Os resultados do presente estudo demonstram que o sistema analgésico opioide é ativado após 3 minutos de restrição, entretanto sua participação na antinocicepção induzida pelo estresse parece ser transitória, não sendo evidente após um estresse de 5 minutos de duração. Em mamíferos o estresse ativa sistemas neurais que suprimem a sensação de dor. Essa resposta adaptativa é dependente do recrutamento de vias descendentes de controle da dor que se projetam do complexo amigdalóide para o mesencéfalo (substância cinzenta periaquedutal - PAG) e deste para o tronco cerebral (bulbo rostroventromedial - RVM) e daí para o corno dorsal da medula espinal (HOHMANN & SUPLITA, 2006). A via descendente PAG-RVM forma parte do sistema analgésico endógeno opioide. Os agonistas de receptores opioides, como a morfina, e os opioides endógenos ativam essas vias descendentes pela inibição da liberação de GABA de interneurônios que fazem sinapse com os neurônios de projeção descendente na PAG e no RVM. Este processo é conhecido como “hipótese da desinibição GABAérgica” (VAUGHAN, 2006).

Embora nosso estudo demonstre que o sistema opioide participa da mediação da antinocicepção induzida pelo estresse de restrição em peixes, o sistema endocanabinoide parece desempenhar um papel chave na modulação dessa resposta, já que a analgesia induzida pelo estresse de restrição foi bloqueada pelo pré-tratamento com AM251, independente do tempo de restrição utilizado. O sistema endocanabinoide parece ser bem conservado dentro do filo vertebrata, sendo encontrado desde peixes até mamíferos (ELPHINIC & EGERTOVÁ, 2001). Os genes de receptores endocanabinoides CB1 e CB2 foram identificados em peixes, apresentando alto grau de

similaridade com os receptores de mamíferos (YAMAGUCHI *et al.*, 1996; ELPHINIC, 2003; LAM *et al.*, 2006; PALERMO *et al.*, 2008). Além disso, estudo com peixes demonstra que estímulos nocivos tônicos promovem “up-regulation” do gene que codifica o receptor CB1 6 horas após o estímulo nocivo, no mesencéfalo e prosencéfalo (REILLY *et al.*, 2008b). Em ratos os receptores CB1 estão localizados em regiões encefálicas que são componentes-chave das vias descendentes inibitórias da dor, e que estão envolvidas em respostas a estímulos aversivos condicionados e não condicionados (HERKENHAM *et al.*, 1991 apud FINN *et al.*, 2004). Segundo Pertwee (2001), a analgesia induzida por canabinoides é mediada pela ativação dos receptores CB1 no corno dorsal da medula, vias ascendentes da dor e vias descendentes analgésicas similarmente aos opioides, ativando a via descendente PAG-RVM via desinibição mediada pelo GABA.

Estes resultados sugerem a existência de uma possível interação entre os sistemas opioide e canabinoide na antinocicepção induzida pelo estresse de restrição em piauí. As interações entre estes sistemas na modulação da antinocicepção são complexas. Em mamíferos, vários estudos bioquímicos, moleculares e farmacológicos demonstram a existência de interações recíprocas entre os sistemas opioide e canabinoide na modulação da antinocicepção, sugerindo a existência de uma via final comum (WELCH & STEVENS, 1992; CICHEWICZ, 2004; DESROCHES & BEAULIEU, 2010). Estudos com mamíferos demonstram que a analgesia canabinoide é bloqueada pelo pré-tratamento com naloxona, demonstrando que o sistema endocanabinoide pode ativar o sistema opioide para promover antinocicepção (WELCH, 1994; SMITH *et al.*, 1998; MANZANARES *et al.*, 1999; DESROCHES & BEAULIEU, 2010).

Nós mostramos, no peixe *L. macrocephalus*, que diferentes sistemas neuroquímicos estão associados com as características temporais do estresse de restrição na modulação da antinocicepção. Embora os resultados deste estudo não permitam uma conclusão final a respeito dos aspectos temporais relacionados ao estímulo estressante e que modulam a antinocicepção e a interação entre mecanismos opioides e endocanabinoides, algumas possibilidades são discutidas. Uma possibilidade é que a liberação de diferentes substâncias canabinoides em situações estressantes pode ser tempo-dependente. O estresse induz a liberação de 2-AG e anandamida na PAG de ratos, mas essas duas substâncias são liberadas com diferentes decursos temporais. Análises revelaram que os níveis de 2-AG aumentam consideravelmente 2 min depois do estresse e retornam aos níveis basais 15 minutos depois. Por outro lado, um pico nos níveis de anandamida ocorrem entre 7-15 min depois do fim do estresse (HOHMANN *et al.*, 2005). Além disso, estudos demonstram que substâncias endocanabinoides podem estimular a síntese e liberação de peptídeos opioides endógenos, que podem contribuir em alguns dos efeitos dos canabinoides (DESROCHES & BEAULIEU, 2010; HOUSER *et al.*, 2000; MANZANARES *et al.*, 1999; MANSON JR. *et al.* 1999). A administração crônica de agonistas opioides aumentam a liberação de opioides, demonstrado pelo aumento na expressão da proopiomelanocortina (precursora da β -endorfina) e de genes de proencefalina no hipotálamo e na PAG de ratos, respectivamente (CORCHERO *et al.*, 1997; MANZANARES *et al.*, 1998). Em peixes não há evidências para a existência de interação entre estes dois sistemas neuroquímicos, assim mais estudos são necessários para avaliar a possível existência de desta interação na modulação da antinocicepção induzida pelo estresse em piauí.

Este é o primeiro trabalho que trás evidências acerca da existência de um sistema de modulação da dor ativadas pelo estresse em peixes. Os resultados do presente estudo indicam que estas vias analgésicas endógenas em peixes são ativadas de maneira semelhante aos mamíferos, sugerindo que estes animais possuem um processamento supraespinal da informação nociceptiva.

Participação do telencéfalo dorsomedial na antinocicepção induzida pelo estresse de restrição

Nossos resultados demonstram que o telencéfalo dorsomedial, região homóloga à amígdala dos mamíferos (WULLIMANN & RINK, 2001; PORTAVELLA, 2002; NORTHCUTT, 2006; NORTHCUTT, 2008; MUELLER *et al.* 2011), tem participação chave na indução da antinocicepção induzida pelo estresse de restrição em piaçu, sugerindo similaridades entre o sistema analgésico endógeno de peixes e mamíferos.

Neste estudo, nós utilizamos o midazolan para avaliar a participação do telencéfalo Dm de piaçu na antinocicepção induzida pelo estresse de restrição de 3 e 5 minutos de duração. O midazolan é um agonista benzodiazepínico de receptores GABA_A que tem efeito ansiolítico (PIERI *et al.*, 1981). O ácido gamma-aminobutírico (GABA) é o neurotransmissor inibitório mais abundante no SNC. O receptor GABA_A é um canal de Cl⁻ de rápida ativação que media a maior parte da sinalização GABAérgica, sendo, portanto, o mais importante na manutenção do tônus inibitório no encéfalo. As drogas benzodiazepínicas, como o midazolan, aumentam a afinidade microscópica do GABA pelo receptor GABA_A aumentando a frequência de abertura de canais de Cl⁻ e sua atividade inibitória (MACDONALD & OLSEN, 1994). Em peixes, a presença de receptores benzodiazepínicos já foi demonstrada (NIELSEN *et al.*, 1978; WILKINSON *et al.*, 1983; REHNBERG *et al.*, 1989; GIANNACCINI *et al.*, 1997). Em estudo utilizando várias espécies de vertebrados, Nielsen *et al.* (1978) demonstraram a presença de receptores benzodiazepínicos no encéfalo dos peixes ósseos com características semelhantes às dos tetrápodes. Em truta arco íris (*O. mykiss*) e em

salmonete (*Mullus surmeletus*), receptores benzodiazepínicos que se comportam de maneira bastante similar aos receptores do encéfalo de mamíferos também foram demonstrados (WILKINSON *et al.*, 1983; GIANNACCINI *et al.*, 1997). A distribuição dos receptores GABA_A no encéfalo de peixes apresenta, ainda, similaridades com a dos mamíferos, sendo estes receptores encontrados no telencéfalo (córtex dos mamíferos), teto óptico (colículo superior dos mamíferos), torus semicircularis (colículo inferior dos mamíferos) e cerebelo. Há um alto nível de fibras GABAérgicas no núcleo telencefálico dorsomedial, tálamo dorsal, região preóptica, teto óptico, *torus semicircularis* e tegmento periventricular dorsal em salmão do atlântico (ANZELIUS *et al.*, 1995) e em enguia (MEDINA *et al.*, 1994). Embora presentes em todos os peixes ósseos estudados, os receptores benzodiazepínicos não foram encontrados em grupos de vertebrados primitivos como os *Cyclostomata* (lampreias e *hagfish*) e *Chondrichthys* (tubarões e peixe coelho), sugerindo que a evolução dos receptores benzodiazepínicos ocorreu apenas nos ancestrais dos peixes que deram origem aos peixes ósseos *Osteichthys* e tetrápodes (FERNHOLM *et al.*, 1978; NIELSEN *et al.*, 1978).

Neste estudo, a microinjeção de midazolan no telencéfalo Dm de piaçu bloqueou a inibição da resposta motora a formalina induzida pelo estresse de restrição de 3 e 5 minutos de duração. Este resultado indica que a ativação GABAérgica do telencéfalo Dm pelo midazolan é capaz de bloquear a antinocicepção induzida pelo estresse, sugerindo que esta região participa do sistema analgésico endógeno de peixes. Embora o estudo comparativo de homologias no prosencéfalo de teleósteos seja complicado em função do processo de eversão dos hemisférios telencefálicos durante o desenvolvimento ontogenético em contraste com o processo de evaginação dos mamíferos (NIEUWENHUYTS, 1982), há um consenso geral que o Dm nos teleósteos é

derivado do *pallium* ventral e é homólogo à amígdala palial de anfíbios e outros tetrápodes (NORTHCUTT, 2008). Essa homologia foi inicialmente proposta por estudos topológicos (BRADFORD Jr., 1995) e tem sido confirmada por estudos comportamentais (PORTAVELLA *et al.*, 2002), genéticos (WULLIMANN & RINK, 2001) e de conexões (NORTHCUTT 2006; NORTHCUTT, 2008). Em peixes, estudos utilizando a lesão de estruturas telencefálicas demonstram que a região do telencéfalo Dm está diretamente relacionado com a aquisição de respostas condicionadas que apresentam componentes emocionais, como o medo (PORTAVELLA *et al.*, 2002), de maneira semelhante ao observado com o complexo amigdalóide palial nos mamíferos (KILLCROSS *et al.*, 1997) .

O envolvimento do telencéfalo Dm na mediação da antinocicepção induzida pelo estresse em peixes, sugere que esta região pode desempenhar uma função semelhante à amígdala dos mamíferos no processamento da informação nociceptiva e na analgesia. Em mamíferos, o complexo amigdalóide tem um papel chave na mediação da analgesia induzida pelo estresse (BUTLER & FINN, 2009). Estudos demonstram que a estimulação elétrica do complexo amigdalóide promove analgesia (LICO *et al.*, 1974; MENA *et al.*, 1995). Além disso, lesões na amígdala central atenuam a analgesia induzida pelo estresse em ratos após 20 minutos de choque regular e intermitente (WERKA, 1994, 1997), sugerindo que a integridade do complexo amigdalóide pode ser fundamental para a indução de analgesia endógena. Nossos resultados demonstraram que a aplicação de um benzodiazepínico no telencéfalo Dm bloqueia a antinocicepção induzida pelo estresse de restrição em piaçu. Este resultado corrobora estudos em mamíferos que demonstram que a aplicação de diazepam e midazolan na região do complexo amigdalóide reduz a analgesia induzida por estímulos estressantes

condicionados (HELMSTETTER, 1993; HARRIS & WESTBROOK, 1996), e lesões no complexo amigdalóide promovem diminuição na analgesia induzida por estímulos condicionados e não condicionados (WERKA & MAREK, 1990; HELMSTETTER, 1992; FOX & SORENSON, 1994).

Os efeitos do midazolan sobre a atinocicepção causada pelo estresse de restrição parece ser causado por ação específica da droga sobre os receptores benzodiazepínicos no telencéfalo Dm, já que o tratamento prévio com flumazenil inibe a ação do midazolan. O flumazenil compartilha o mesmo sítio de ligação dos benzodiazepínicos nos receptores GABA_A, sendo, portanto bloqueador específico para esta droga (MACDONALD & OLSEN, 1994). Interage com os receptores benzodiazepínicos centrais, para antagonizar ou reverter os efeitos comportamentais, neurológicos e eletrofisiológicos dos benzodiazepínicos (HOFFMAN & WARREN, 1993).

O bloqueio da antinocicepção induzida pelo estresse causado pela aplicação de benzodiazepínicos no telencéfalo Dm, sugere que a antinocicepção induzida pelo estresse em piauí pode ter um importante componente de medo. Assim, como o complexo amigdalóide nos mamíferos, a região do telencéfalo Dm dos peixes está relacionada com a aquisição de respostas condicionadas que apresentam componentes emocionais, como o medo (PORTAVELLA *et al.*, 2002). Estudos com mamíferos sugerem que as estruturas neurais que controlam a expressão do medo podem desempenhar um papel importante na indução de analgesia por um estímulo ambiental não nocivo (FOX & SORENSON, 1994). Em ratos, lesões no complexo amigdalóide diminuem significativamente a analgesia induzida pela exposição ao gato, choque nas patas e condicionamento clássico com choque nas patas, sugerindo que a analgesia induzida por estes desafios ambientais tem um importante componente de medo (FOX

& SORENSEN, 1994). O complexo amigdalóide desempenha um papel crítico no circuito neural necessário para a expressão de analgesia induzida por desafios ambientais potencialmente estressantes (FOX & SORENSEN, 1994). Este é o primeiro trabalho a relacionar a antinocicepção induzida pelo estresse ao telencéfalo Dm de peixes.

Uma das questões mais discutidas no que diz respeito à capacidade de peixes perceberem a dor está relacionada à presença de estruturas encefálicas capazes de processar cognitivamente a informação nociceptiva em peixes (ROSE, 2002; ROSE, 2007; ROSE *et al.*, 2012). Não existem dados conclusivos acerca das regiões encefálicas responsáveis pelo processamento das informações nociceptivas em peixes, entretanto há evidências de que estímulos nocivos promovem ativação de regiões telencefálicas. Em salmão (*Salmo salar*), a estimulação galvânica na base da cauda em intensidades nocivas produz potenciais evocados no telencéfalo dorsal contralateral, com discriminação na amplitude do estímulo (NORDGREEN *et al.*, 2007). Além disso, a estimulação nociva (ácido acético nos lábios) promove aumento na expressão de genes relacionados a dor no telencéfalo de carpa (*C. carpio*) (REILY *et al.*, 2008b). Estes dados, em conjunto aos resultados do presente estudo sugerem um processamento da informação nociceptiva em estruturas telencefálicas em peixes, assim como o observado em mamíferos.

Este é o primeiro estudo a demonstrar a participação de uma região telencefálica na modulação da antinocicepção induzida pelo estresse em peixes. Estes dados trazem novas perspectivas acerca do entendimento sobre o processamento das informações nociceptivas em peixes, sugerindo que este processamento pode ser complexo.

6. CONCLUSÕES

- A restrição de 3 e 5 minutos de duração promove um aumento drástico nos níveis de cortisol sérico, indicando que este procedimento é altamente estressante para os peixes.
- A restrição de 3 e 5 minutos de duração inibe a resposta comportamental à injeção subcutânea de formalina a 3% na região da nadadeira adiposa no peixe *L. macrocephalus*, sugerindo que este procedimento é capaz de ativar um sistema antinociceptivo endógeno.
- A antinocicepção induzida pela restrição de 3 e 5 min é de curta duração, sendo observada apenas por 5 min após o término da restrição.
- O tratamento prévio com injeção intraperitoneal de naloxona (30 mg.kg^{-1}), um antagonista opioide não seletivo, bloqueou a antinocicepção induzida pela restrição de 3 min de duração, mas não foi capaz de inibir a antinocicepção induzida pela restrição de 5 min de duração, sugerindo que a ativação de diferentes mecanismos antinociceptivos durante o estresse de restrição.
- O tratamento prévio com injeção intraperitoneal de AM251 (3 mg.kg^{-1}), um antagonista de receptores canabinoides tipo 1, bloqueou a antinocicepção induzida pelo estresse de restrição de 3 e 5 min de duração, sugerindo que o sistema canabinoide desempenha um papel fundamental na antinocicepção induzida por esta modalidade de estresse no peixe *L. macrocephalus*.

- A microinjeção de midazolan (40 e 80 nmol), um agonista de receptores benzodiazepínicos, no telencéfalo Dm bloqueou a antinocicepção induzida pela restrição de 3 e 5 min de duração, sugerindo que esta região encefálica conhecida por apresentar homologias com o complexo amigdalóide dos mamíferos está envolvida na modulação da antinocicepção induzida pelo estresse de restrição no peixe *L. macrocephalus*.
- O tratamento prévio com flumazenil (80 e 160 nmol), um antagonista específico de receptores benzodiazepínicos GABA_A, inibiu os efeitos do tratamento com midazolan, demonstrando que o bloqueio da antinocicepção promovido pelo midazolan ocorre pela ativação específica dos receptores benzodiazepínicos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHAVAL, M; PENHA, M; SWAROWSKY, A; RIGON, P; XAVIER, L. L; VIOLA, G. G; ZANCAN, M. D. The terrestrial gastropoda *Megalobulimus abbreviatus* as a useful model for nociceptive experiments. Effects of morphine and naloxone on thermal avoidance behavior. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 38(1): 73-80, 2005.

ALVAREZ, F.A.; RODRIGUEZ-MARTIN, I.; GONZALEZ-NUNEZ, V.; de VELASCO, E.M.; GONZALEZ SARMIENTO, R.; RODRÍGUEZ, R.E. New kappa opioid receptor from zebrafish *Danio rerio*. **Neuroscience Letters**, 405:94–99, 2006.

ALVES, F.L. Mecanismos opioidérgicos envolvidos na antinocicepção induzida comportamentalmente e por estimulação mesencefálica no teleósteo *Leporinus macrocephalus*. 2010. 113 f. Tese (Doutorado em Fisiologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2010.

ALVES, F.L.; BARBOSA JUNIOR, A.; HOFFMANN, A. Antinociception in piaçu fish induced by exposure to the conspecific alarm substance. **Physiology and Behavior**, 110-111: 58-62, 2013.

AMIR, S.; AMIT, Z. Endogenous opioid ligands may mediate stress-induced changes in the affective properties of pain related behavior in rats. **Life Sciences**, 23: 1143-1152, 1978.

ANZELIUS, M.; EKSTRÖM, P.; MÖHLER, H.; RICHARDS, J.G. Immunocytochemical localization of GABA A receptor β_2/β_3 - subunits in the brain of atlantic salmorm (*Salmo salar* L). **Journal of Chemical Neuroanatomy**, 8: 207-221, 1995.

APKARIAN, A.V.; BUSHNELL, M.C.; TREEDE, R.D.; ZUBIETA, J.K. Human brain mechanisms of pain perception and regulation in disease and health. **European Journal of Pain**, 9: 463–484, 2005.

ARLINGHAUS, R.; COOKE, S.J.; SCHWAB, A.; COWX, I.G. Fish welfare: a challenge to the feelings-based approach, with implications to recreational fisheries. **Fish Fisheries**, 8:57–71, 2007.

ASHLEY, P.J.; SNEDDON, L.U.; McCROHAN, C.R. Properties of corneal receptors in a teleost fish. **Neuroscience Letters**, 410: 165-168, 2006.

ASHLEY, P.J.; SNEDDON, L.U.; McCROHAN, C.R. Nociception in fish: stimulus response properties of receptors on the head of trout *Oncorhynchus mykiss*. **Brain Research**, 1166: 47-54, 2007.

ASHLEY, P.J.; RINGROSE, S.; EDWARDS, K.L.; WALLINGTON, E.; McCROHAN, C.R.; SNEDDON, L.U. Effect of noxious stimulation upon antipredator responses and dominance status in rainbow trout. **Animal Behavior**, 77(2): 403-410, 2009.

- BARRALLO, A.; GONZÁLEZ-SARMIENTO, R.; PORTEROS, A.; GARCÍA-ISIDORO, M.; ROCRÍGUEZ, R.E. Cloning, molecular characterization, and distribution of a gene homologous to delta opioid receptor from zebrafish (*Danio rerio*). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 245:544–548, 1998.
- BASBAUM, A.I.; JESSELL, T. **The Perception of Pain**. In: KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H. **Principles of Neural Science**. pp 199-212. Elsevier: New York, 1981.
- BASBAUM, A.I.; BAPTISTA, D.M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, 139:267–284, 2009.
- BATESON, P. Assessment of pain in animals. **Animal Behavior**, 42: 827–839, 1991.
- BHATTACHARYA, S.K.; KESHARY, P.R.; SANYAL, A.K. Immobilisation stress-induced antinociception in rats: possible role of serotonin and prostaglandins. **European Journal of Pharmacology**, 50: 83-85, 1978.
- BODNAR, R.J.; KELLY, D.D.; SPIAGGIA, A.; EHRENBERG, C.; GLUSMAN, M. Dose-dependent reductions by naloxone of analgesia induced by cold-water stress. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, 8: 667-672: 1978.
- BRADFORD Jr., M.R. Comparative aspects of forebrain organization in the ray-finned fishes: touchstones or not? **Brain Behavior and Evolution**, 46: 259–274, 1995.
- BRAITHWAITE, V.A.; BOULCOTT, P. Pain perception, aversion and fear in fish. **Diseases of aquatic organisms**, 75:131-138: 2007.
- BROGLIO, C.; GOMEZ, A.; DURAN, E.; OCANA, F.M.; JIMENEZ-MOYA, F.; RODRIGUEZ, F.; SALAS, C. Hallmarks of a common forebrain vertebrate plan: specialized pallial areas for spatial, temporal, and emotional memory in actinopterygian fish. **Brain Research Bulletin**, 66: 277–281, 2005.
- BROGLIO, C.; RODRIGUEZ, F.; GOMEZ, A.; ARIAS, J.L.; SALAS, C. Selective involvement of the goldfish lateral *pallium* in spatial memory. **Behavioural Brain Research**, 210: 191–201, 2010.
- BUATTI, M.C.; PASTERNAK, G.W. Multiple opiate receptors: phylogenetic differences. **Brain Research**, 218: 400-405, 1981.
- BURGESS, P.R.; PERL, E.R. Myelinated afferent fibres responding specifically to noxious stimulation of the skin. **Journal of Physiology**, 190:541–562, 1967.
- BUTLER, A.B.; HOODS, W. **Comparative Vertebrate Neuroanatomy**. Wiley-Liss, New York, 1996.
- BUTLER, R.K.; FINN, D.P. Stress-induced analgesia. **Progress in neurobiology**, 88:184-202: 2009.
- CHANCE, W.T.; ROSECRANS, J.A. Lack of effect of naloxone on autoanalgesia. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, 11: 643-646, 1979.

CHANDROO, K. P., DUNCAN, I. J. H; MOCCIA, R. D. Can fish suffer?: perspectives on sentience, pain, fear and stress. **Applied Animal Behavior Science**, 86 (3-4): 225-250, 2004.

CHERCHOVA, L.S. Pain sensitivity and behavior of fishes. **Journal of Ichthyology**. 37: 98- 102, 1997.

CHERCHOVA, L. S.; LAPSHIN, D.N. Opioid modulation of pain threshold in fish. **Doklady Biological Sciences**, 375: 590-591, 2000.

CORCHERO, J., FUENTES, J.Á., MANZANARES, J. Δ 9-tetrahydrocannabinol increases proopiomelanocortin gene expression in the arcuate nucleus of the rat hypothalamus. **European Journal of Pharmacology**, 323: 193-195, 1997.

CICHEWICZ, D. Synergistic interactions between cannabinoid and opioid analgesics. **Life Sciences**, 74: 1317-1324, 2004.

COOPER, K.; CARMODY, J. The characteristics of the opioid-related analgesia induced by stress of swimming in the mouse. **Neuroscience Letters**, 31: 165-170, 1982.

CORRÊA, S. A. L.; HOFFMANN, A (1999) Reciprocal connections between the periglomerular complex and the dorsolateral telencephalon on the weakly electric fish, *Gymnotus carapo*. **Neuroscience Letters**, 261: 131-134.

COTTONE, E.; CAMPANTICO, E.; GUASTALLA, A.; ARAMU, S.; POLZONETTI-MAGNI, A.M.; FRANZONI, M. Are the cannabinoids involved in bony fish reproduction? **Annals New York Academy Science**, 1040: 273-276, 2005.

COTTONE, E.; FORNO, S.; CAMPANTICO, E.; GUASTALLA, A.; VITOLNO, L.; MACKIE, K.; FRANZONI, M. Expression and distribution of CB1 cannabinoid receptors in the central nervous system of the african cichlid fish *Pelvicachromis pulcher*. **Journal of Comparative Neuroscience**, 485: 293-303, 2005.

DESROCHES, J.; BEAULIEU, P. Opioids and cannabinoids interactions: involvement in pain management. **Current Drug Targets**, 11: 462-473, 2010.

DEVANE, W.A.; DYSARZ, F.A.; JOHNSON, M.R.; MELVIN, L.S.; HOWLETT, A.C. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. **Molecular Pharmacology**, 34: 605-613, 1988.

DEVANE, W.A.; HANUS, L.; BREUER, A.; PERTWEE, R.G.; STECENSON, L.A.; GRIFFIN, G.; GIBSON, G.; MANDELBAUM, A.; ETINGER, A.; MECHOULAM, R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. **Science**, 258: 1946-1949, 1992.

DREBROG, S.; REL SUNDSTROM, G.; LARSSON, T.A. Evolution of vertebrate opioid receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 105(40):15487–15492, 2008.

- DUBUISSON, D.; DENNIS, S.G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, mepiridine and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, 4: 161-174, 1977.
- DUNCAN, I. J. H. Animal welfare defined in terms of feelings. **Acta Agriculturae Scandinavica, Supplementum**, 27: 29-35, 1996.
- DUNLOP, R.; LAMING, P. Mechanoreceptive and nociceptive responses in the central nervous system of goldfish (*Carassius auratus*) and trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of Pain**, 6 (9): 561-568, 2005.
- DUNLOP, R.; MILLSOPP, S. LAMING, P. Avoidance learning in goldfish (*Carassius auratus*) and trout (*Oncorhynchus mykiss*) and implications for pain perception. **Applied Animal Behaviour Science**, 97:255-271, 2006.
- EBBESSON, S.O.E.; HODDE, K.C. Ascending spinal systems in the nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*. **Cell Tissue Research**, 216: 313– 331, 1981.
- EDELMAN, G. M; TONONI, G.A. **Universe of consciousness**. Basic Books, New York, NY, 2000.
- ELPHICK, M.R.; EGERTOVÁ, M. The neurobiology and evolution of cannabinoid signaling. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, 356: 381-408, 2001.
- ELPHICK, M.R.; SATOU, Y.; SATOH, N. The invertebrate ancestry of endocannabinoid signaling: an orthologue of vertebrate cannabinoid receptors in the urochordate *Ciona intestinalis*. **Gene**, 302: 95-101, 2003.
- FERNHOLM, B.; NIELSEN, M.; BRAESTRUP, C. Absence of brain specific benzodiazepine receptors in cyclostomes and elasmobranchs. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 62C: 209-211, 1978.
- FIGUEROA, R. I.; RODRÍGUEZ-SABARÍS, R.; ALDEGUNDE, M.; SOENGAS, J.L. Effects of food deprivation on 24 h-changes in brain and liver carbohydrate and ketone body metabolism of rainbow trout. **Journal of Fish Biology**, 161: 125 - 142, 1975.
- FINGER, T.E. Enkephalin-like immunoreactivity in the gustatory lobes and visceral nuclei in the brains of goldfish. **Neuroscience**, 6(12): 2747-2758, 1981.
- FINN, D.P.; BECKETT, S.R.G.; RICHARDSON, D.; KENDALL, D.A.; MARSDEN, C.A.; CHAPMAN, V. Evidence for differential modulation of conditioned aversion and fear-conditioned analgesia by CB₁ receptors. **European Journal of Neuroscience**, 20: 848-852, 2004.
- FLECKNELL, P. Analgesia from a veterinary perspective. **British Journal of Anaesthesia**, 101 (1): 121-124, 2008.
- FOX, R.J.; SORENSON, C.A. Bilateral lesions of the amygdala attenuate analgesia induced by diverse environmental challenges. **Brain Research**, 648: 215-221, 1994.

FREITAS, R. L (2005) Estudo farmacológico e neuroanatômico das interconexões entre estrutura mesencefálicas e núcleos monoaminérgicos envolvidos no controle da dor: Participação do núcleo dorsal da rafe e de receptores serotoninérgicos na analgesia pós-ictal. **Tese de Mestrado**. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

FRITZGERALD, M. Monoamines and descending control of nociception. **TINS**, 51-52, 1986.

GAONI, Y.; MECHOULAM, R. Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. **Journal of American Chemical Society**, 86(8): 1646-1647, 1964.

GIANNACCINI, G.; BETTI, L.; CORREANI, M.; DINI, M.; GIUSTI, L.; LUCACCHINI, A. [H^3]- Ro 15-1788 to brain membrane of the saltwater fish *Mullus surmuletus*. **Neurochemical International**, 31: 781-787, 1997.

GONZALEZ-NUNES, V.; RODRIGUEZ, R. The zebrafish: a model to study the endogenous mechanisms of pain. **ILAR Journal**, 50(4): 373-385, 2009.

HAMA, A.; SAGEN, J. Centrally mediated antinociceptive effects of cannabinoid receptor ligands in rat models of nociception. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 100: 340-346, 2011.

HARRIS, J.A.; WESTBROOK, R.F. Midazolan impairs the acquisition of conditioned analgesia if rats are tested with an acute but not a chronic noxious stimulus. **Brain Research Bulletin**, 39-227-223, 1996.

HARVEY-GIRARD, E.; GIASSI, A.C.C.; ELLIS, W.; MALER L. Expression of the cannabinoid CB1 receptor in the gymnotiform fish brain and its implications for the organization of the teleost *pallium*. **Journal of Comparative Neurology**, 521: 949-975, 2013.

HAYES, R.L.; BENNETT, G.J.; NEWLON, P.G.; MAYER, D.J. Behavioral and physiological studies of non-narcotic analgesia in the rat elicited by certain environmental stimuli. **Brain Research**, 155: 69-90, 1978.

HELMSTETTER, F.J. The amygdale is essential for the expression of conditional hypoalgesia. **Behavioral Neuroscience**, 3: 518-528, 1992.

HELMSTETTER, F.J. Stress-induced hypoalgesia and defensive freezing are attenuated by application of diazepam to the amygdala. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 44: 433-438, 1993.

HERKENHAM, M.; LYNN, A.B.; JOHNSON, M.R.; MELVIN, L.S.; COSTA, B.R.; RICE, K.C. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. **Journal of Neuroscience**, 11, 563-583, 1991 *Apud*: FINN, D.P.; BECKETT, S.R.G.; RICHARDSON, D.; KENDALL, D.A.; MARSDEN, C.A.; CHAPMAN, V. **European Journal of Neuroscience**, 20, 848-852, 2004.

HOFFMAN, E.J.; WARREN, E.W. Flumazenil: a benzodiazepine antagonist. **Clinical Pharmacy**, 12(9): 641-656, 1993.

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

HOHMANN, A.G.; SUPLITA, R.L.; BOLTON, N.M.; NEELY, M.H.; FEGLEY, D.; MANGIERI, R.; KREY, J.F.; WALKER, J.M.; HOLMES, P.V.; CRYSTAL, J.D.; DURANTI, A.; TONTINI, A.; MOR, M.; TARZIA, G.; PIOMELLI, D. An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. **Nature**, 435: 1108-1113, 2005.

HOHMANN, A.G.; SUPLITA, R.L. Endocannabinoid mechanisms of pain modulation. **The AAPS Journal**, 8: E693-E708 2006.

HOUSER, S.J.; EADS, M.; EMBREY, J.P.; WELCH, S.P. Dynorphin B and spinal analgesia: induction of antinociception by the cannabinoids CP55,940, Δ^9 -THC and anadamide. **Brain Research**, 857: 337-342, 2000.

HOWLETT, A.C. The cannabinoid receptors. **Prostaglandins Other Lipid Mediators**, 68(69): 619—631, 2002.

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

IWAHORI, N.; KAWAWAKI, T.; BABA, J. Neuronal organisation of the spinal cord in the red stingray (Dasyatids akajei: Chondrichthyes). **Journal of Brain Research** 39: 103– 116, 1998.

IZUMI, R.; TAKAHASHI, M.; KANETO, H. Involvement of different mechanisms, opioid and non-opioid forms, in the analgesia induced by footshock (FS) and immobilized-water immersion (IW) stress. **Japan Journal of Pharmacology**, 33: 1104-1106, 1983.

JØRGENSEN, H.A.; FASMER, O.B.; BERGE, O.G.; TVEITEN, L.; HOLE, K. Immobilization-induced analgesia: possible involvement of non-opioid circulating substance. **Pharmacology, Biochemistry and behavior**, 20: 289-292, 1984.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**.413: 203-210, 2001.

KELLY, D.D. Somatic sensory system IV: Central representations of pain and analgesia. In: KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H. **Principles of Neural Science**. pp 199-212. Elsevier: New York, 1981.

KILLCROSS, S.; ROBBINS, T.W.; EVERIT, B.J. Different types of fear-conditioned behavior mediated by separate nuclei within amygdala. **Nature**, 388: 377-380, 1997.

KOCK, M.; MEERT, T.F. α_2 -Adrenoceptor agonists and stress-induced analgesia in rats: influence of stressors and methods of analysis. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 58: 109-117, 1997.

KULKARNI, S.K. Heat and other physiological stress-induced analgesia: catecholamine mediated and naloxone reversible response. **Life Sciences**, 27: 185-188, 1980.

LAM, C.S.; RASTEGAR, S.; STRAHLE, U. Distribution of cannabinoid receptor 1 in the CNS of zebrafish. **Neuroscience**, 138: 83-95, 2006.

LEONARD, R.B. Primary afferent receptive field properties and neurotransmitter candidates in a vertebrate lacking unmyelinated fibres. **Progress in Clinical and Biological Research**, 178: 135-145, 1985.

LÉON-OLEA, M. Los péptidos opioides y la filogenia de la nocicepción. **Ciencias**, 33-38, 1993.

LEWIS, J.W.; CANNON, J.T.; LIEBESKIND, J.C. Opioid and nonopioid mechanisms of stress analgesia. **Science**, 208: 623-625, 1980.

LICHTMAN, A.; MARTIN, B.R. Cannabinoid-induced antinociception is mediated by spinal α_2 -noradrenergic mechanism. **Brain Research**, 559: 309-314, 1991.

LICO, M.C., HOFFMANN, A., COVIAN, M.R. Influence of some limbic structures upon somatic and autonomic manifestations of pain. **Physiology Behavior**, 12: 805-811, 1974.

MACDONALD, R.L., OLSEN, R.W. GABA_A receptor channels. **Annual Review of Neuroscience**, 17: 569-602, 1994.

MALAFOGLIA, V.; BRYANT, B.; RAFFAELI, W., GIORDANO, A.; BELLIPANNI, G. The zebrafish as a model for nociception studies. **Journal of Cellular Physiology**, 228: 1956-1966, 2013.

MANZANARES, J.; CORCHERO, J.; ROMERO, J.; FERNANDEZ-RUIZ, J.; RAMOS, J.Á.; FUENTES, J.Á. Chronic administration of cannabinoids regulates proenkephalin mRNA levels in selected regions of the rat brain. **Molecular Brain Research**, 55, 126-132, 1998.

MANZANARES, J.; CORCHERO, J.; ROMERO, J.; FERNANDEZ-RUIZ, J.; RAMOS, J.Á.; FUENTES, J.Á. Pharmacological and biochemical interactions between opioids and cannabinoids. **TIPS**, 20: 287-294, 1999.

MASON Jr., D.; LOWE, J.; WELCH, S.P. Cannabinoid modulation of dynorphin A: correlation to cannabinoid-induced antinociception. **European Journal of Pharmacology**, 378: 237-248, 1999.

MATSUDA, L.A.; LOLAIT, S.; BROWNSTEIN, J.; YOUNG, A.C.; BONNER, T.I. Structure of cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. **Nature**, 346: 561-564, 1990.

- MECHOULAM, R.; BEN-SHABAT, S.; HANUS, L.; LINGUMSKY, M.; KAMINSKY, N.E.; SCHATZ, A.R.; GOPHER, A.; ALMOG, S.; MARTIN, B.; COMPTON, D.R.; PERTWEE, R.G.; GRIFFIN, G.; BAYEWITCH, M.; BARG, J.; VOGEL, Z. Identification of an endogenous 2- monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. **Biochemical Pharmacology**, 50: 83-90, 1995.
- MEDINA, L.; ABELLAN, A. Development and evolution of the *pallium*. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, 20: 698–711, 2009.
- MENA, N.B., MATHUR, R., NAYAR, U. Amygdalar involvement in pain. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, 39: 339–346, 1995.
- MENESCAL DE OLIVEIRA, L; HOFFMANN, A. The parabrachial region as a possible region modulating simultaneously pain and tonic immobility. **Behavioral Brain Research**, 56: 127-132, 1993.
- MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. Neurobiologia da dor e da analgesia. **Reflexões em torno da dor**. 1 ed., 131-168. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP: Ribeirão Preto, 2008a.
- MENESCAL DE OLIVEIRA, L As Dores, In: LENT, R. (eds.) **Neurociência da Mente e do Comportamento**. Guanabara Koogan S. A. 183-201, 2008b.
- METTAM, J.J.; McCROHAN, C.R.; SNEDDON, L.U. Characterization of chemosensory trigeminal receptors in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: responses to chemical irritants and carbon dioxide. **Journal of Experimental Biology**, 215: 685-693, 2012.
- MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, 57: 1-164, 1999.
- MILLSOPP, S.; LAMING, P. Trade-offs between feeding and shock avoidance in goldfish (*Carassius auratus*). **Applied Animal Behaviour Science**, 113:247-254, 2007.
- MOLONY, V. Comments on Anand and Craig (Letter to the editor). **Pain** 70: 293, 1997.
- MUELLER, T.; WULLIMANN, M.F. An evolutionary interpretation of teleostean forebrain anatomy. **Brain, Behaviour and Evolution**, 74: 30-42, 2009.
- MÜELLER, T.; DONG, Z.; BERBEROGLU, M.A.; GUO, S. The dorsal *pallium* in zebrafish, *Danio rerio* (Cyprinidae, Teleostei). **Brain Research**, 1381, 95-105, 2011.
- NEWBY, N.C.; GAMPERL, A.K.; STEVENS, E.D. Cardiorespiratory effects and efficacy of morphine sulfate in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). **American Journal of Veterinary Research**, 68: 592–597, 2007.

NEWBY, N.C.; STEVENS, E.D. The effects of the acetic acid “pain” test on feeding, swimming, and respiratory responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Applied Animal Behaviour Science**, 114-260-269, 2008.

NIELSEN, M.; BRAESTRUP, C.; SQUIRES, R.F. Evidence for a late evolutionary appearance of brain-specific benzodiazepine receptors: An investigation of 18 vertebrate and 5 invertebrate species. **Brain Research**, 141: 342–346, 1978.

NIEUWENHUYIS, R. An overview of the organization of the brain of actinopterygian fishes. **American Zoology**, 22: 287-310, 1982.

NIEUWENHUYIS, R.; TEN DONKELAR, H.J.; NICHOLSON, C. **The Central Nervous System of Vertebrates**. Springer, Berlin, 1998.

NORDGREEN, J.; GARNER, J.P.; JANCZAK, A.M.; RANHEIM, B.; MUIR, W.M.; HORSBERG, T.E. Thermonociception in fish: effects of two different doses of morphine on the thermal threshold and post-test behavior in goldfish (*Carassius auratus*). **Applied Animal Behavior Science**, 119: 101-107, 2009.

NORTHCUTT, R.G. Connections of the lateral and medial divisions of the goldfish telencephalic *pallium*. **Journal of Comparative Neurology**, 494: 903–943, 2006.

NORTHCUTT, R.G. Forebrain evolution in bony fish. **Brain Research Bulletin**, 75: 191-205, 2008.

ØVERLI, Ø.; KOTZIAN, S.; WINBERG, S. Effects of cortisol on aggression and locomotor activity in rainbow trout. **Hormones and Behavior**, 42: 53-61, 2002.

PALERMO, F.A.; RUGGERI, B.; MOSCONI, G.; VIRGILI, M.; POLZONETTI-MAGNI, A.M. Partial cloning of CB1 cDNA and CB1 mRNA changes in stress responses in the *Solea solea*. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 286S, S52-S59, 2008.

PARIKH, D.; HAMID, A.; FRIEDMAN, T.C.; NGUYEN, K.; TSENG, A.; MARQUEZ, P.; LUTFY, K. Stress-induced analgesia and endogenous opioid peptides: The importance of stress duration. **European Journal of Pharmacology**, 650: 563-567, 2011.

PAZOS, M.R.; NÚÑEZ, E.; BENITO, C.; TOLÓN, R.M.; ROMERO, J. Functional neuroanatomy of the endocannabinoid system. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 81:239-247, 2005.

PERL, E.R. Ideas about pain, a historical view. **Nature Reviews Neuroscience**, 8: 71–80, 2007.

PERTWEE, R.G. Cannabinoid receptors and pain. **Progress in Neurobiology**, 63: 569-611, 2001.

PEZALLA, P.D. Stress induced analgesia in frogs: a naloxone insensitive system. **Brain Research**, 278: 354-358, 1983.

- PEZALLA, P.D.; DICIG, M. Stress-induced analgesia in frogs: evidence for the involvement of an opioid system. **Brain Research**, 296: 356-360, 1984.
- PICCINETTI, C.C.; MIGLIARINI, B.; PETROSINO, S.; Di MARZO, V.; CARNECALI O. Anandamide and AM251, via water, modulate food intake at central and peripheral level in fish. **General Comparative Endocrinology**, 166: 259-267, 2010.
- PIERI, L.; SCHAFFNER, R.; SCHERSCHLICHT, R.; POLC, P.; DAVIDSON, A.; MÖHLER, H.; CUMIN, R.; DA PRADA, M.; BURKARD, W.P.; KELLER, H.H.; MÜLLER, R.K.; GEROLD, M.; PIERI, M.; COOK, L.; HAEFELY, W. Pharmacology of midazolam. **Arzneimittelforschung**, 31: 2180-201, 1981.
- PINAL-SEONE, N.; MARTIN, I.R.; GONZALEZ-NUÑEZ, V.; de VELASCO, E.M.; ALVAREZ, F.A.; SARMIENTO, R.G.; ROCRIGUEZ, R.E. Characterization of a new duplicate delta-opioid receptor from zebrafish. **Journal of Molecular Endocrinology**, 37:391–403, 2006.
- PORTAVELLA, M.; VARGAS, J.P.; TORRES, B.; SALAS, C. The effects of telencephalic pallial lesions on spatial, temporal, and emotional learning in goldfish. **Brain Research Bulletin**, 57: 397–399, 2002.
- PORTAVELLA, M.; TORRES, B.; SALAS, C. Avoidance response in goldfish: emotional and temporal involvement of medial and lateral telencephalic *pallium*. **Journal of Neuroscience**, 24: 2335–2342, 2004.
- PRICE, D.D. Psychological and neural mechanisms of the affective dimension of pain. **Science**, 288: 1769–1772, 2000.
- PURVES, D; AUGUSTINE, G; FITZPATRICK, D; LAWRENCE, K; ANTHONY, S.L; MACNAMARA, S; MARK, W. **Neuroscience**. Second Edition. Massachusetts: Sinauer Associates, 2002.
- RAJA, S.N.; MEYER, R.A.; RINGKAMP, M.; CAMPBELL, J.N. **Peripheral neural mechanisms of nociception**. In: Wall, P.D., Melzack, R. (Eds.), Textbook of Pain, 4th Edition. Churchill Livingstone, Edinburgh, 11–57, 1999.
- REDDY, S.V.R.; YAKSH, T.L. Spinal noradrenergic terminal system mediates antinociception. **Brain Research**, 189: 391-401, 1980.
- REHNBERG, B.G.; BATES, E.H.; SMITH, R.J.F.; SLOLEY, B.D.; RICHARDSON, J.S. Brain benzodiazepine receptors in fathead minnows and the behavioral response to alarm pheromone. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, 33: 435-442, 1989.
- REILLY, S.C.; QUINN, J.P.; COSSINS, A.R.; SNEDDON, L.U. Behavioural analysis of a nociceptive event in fish: Comparisons between three species demonstrate specific responses. **Applied Animal Behaviour Science**, 114: 248-259, 2008a.

- REILLY, S.C.; QUINN, J.P.; COSSINS, A.R.; SNEDDON, L.U. Novel candidate genes identified in the brain during nociception in common carp (*Cyprinus carpio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Neuroscience Letters**, 437: 135-138, 2008b.
- REINER, A.; NORTHCUTT, R.G. An immunohistochemical study of the telencephalon of the African lungfish, *Protopterus annectens*. **Journal of comparative Neurology**, 256, 463-481, 1987.
- REYNOLDS, D. V. Surgery in the rat during electrical analgesia by focal brain stimulation. **Science**, 164: 444-445, 1969.
- RICHARDSON, J.D.; KILO, S.; HARGREAVES, K.M. Cannabinoids reduce hyperalgesia and inflammation via interaction with peripheral CB1 receptors. **Pain**, 75: 111-119, 1998.
- ROA-CORIA, J.E.; NAVARRETE-VAZQUEZ, G.; FOWLER, C.J.; FLORES-MURRIETA, F.J.; DECIGA-CAMPOS, M.; GRANADOS-SOTO, V. Z. N-(4-Methoxy-2-nitrophenyl) hexadexanamide, a palmitoylethanolamide analogue, reduces formalin-induced nociception. **Life Sciences**, 91: 1288-1294, 2012.
- RODGERS, R.J.; RANDALL, J.L. Defensive analgesia in rats and mices. **Psychological Research**, 57: 335-347, 1987.
- RODRIGUEZ, F.; LOPEZ, J.C.; VARGAS, J.P.; BROGLIO, C.; GOMEZ, Y.; SALAS, C. Spatial memory and hippocampal *pallium* through vertebrate evolution: insights from reptiles and teleost fish. **Brain Research Bulletin**, 57: 449-503, 2002.
- ROMERO, S. M. B; HOFFMANN, A; MENESCAL DE OLIVEIRA, L. Is there an opiate receptor in the snail *Megalobulimus sanctipauli*? Action of morphine and naloxone. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 107 C: 37-40, 1994.
- ROQUES, J.A.C.; ABBINK, W.; GEURDS, F. van de VIS, H.; FLIK, G. Tailfin clipping, a painful procedure: studies on Nile tilapia and common carp. **Physiology and Behavior**, 101: 533-540, 2010.
- ROSE, D. J. The neurobehavioral nature of fishes and the question of awareness and pain. **Review in Fisheries Science**, 10: 1-38, 2002.
- ROSE, J.D. Anthropomorphism and 'mental welfare' of fishes. **Diseases of Aquatic Organisms**, 75: 139-154, 2007.
- ROSE, J.D.; AELINGHAUS, R.; COOKE, S.J.; DIGGLES, B.K.; SAWYNOK, W.; STEVENS, E.D.; WYNNE, C.D.L. Can fish really feel pain? **Fish and Fisheries**, 2012. DOI: 10.1111/faf.12010.
- ROSENBLUM, P.M.; CALLARD, I.P. Endogenous opioid peptide system in male brown bullhead catfish, *Ictalurus nebulosus* lesueur: Characterization of naloxone binding and the response to naloxone during the annual reproductive cycle. **Comparative Physiology and Biochemistry**, 245-244-255, 1988.

- ROSS, R.T.; RANDICH, A. Unconditioned stress-induced analgesia following exposure to brief footshock. **Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes**, 10: 127-137, 1984.
- ROTH, G; WULLIMANN, M. F. **Brain, evolution and Cognition**. New York: John Wiley Sons Inc., 2001.
- RUSSO, C. M; BROSE, W. G. Chronic pain. **Annual Review of Medicine**, 49: 123-33, 1998.
- SCHMIDEK, W. R.; SCHMIDEK, M. Differences in individual rat preference for light levels. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 21: 663 – 665, 1990.
- SCHMIDT, R.; SCHMELZ, M.; FORSTER, C.; RINGKAMP, M.; TOREBJORK, E.; HANDWERKER, H. Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin. **The Journal of Neuroscience**, 15: 333-341, 1995.
- SCHULMAN, J.A.; FINGER, T.E.; BRECHA, N.C.; KARTEN, H.J. Enkephalin immunoreactivity in Golgi cells and mossy fibers of mammalian, avian, amphibian and teleost cerebellum. **Neuroscience**, 6: 2407-2416, 1981.
- SCHREIBER, A.K.; NEUFIELD, M.; JESUS, C.H.; CUNHA, J.M. Peripheral antinociceptive effect of anandamide and drugs that affect the endocannabinoid system on the formalin test in normal and streptozotocin-diabetic rats. **Neuropharmacology**, 63: 1286-1297, 2012.
- SEGNER, H. Fish nociception and pain - A biological perspective. **Beiträge zur Ethik und Biotechnologie**, Band 9, 2012.
- SIMATOV, R.; KUCHAR, M.J.; UHL, G.R.; SNYDER, S.H. Opioid peptide enkephalin: immunohistochemical mapping in rat central nervous system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, 74: 2167– 2171, 1977.
- SMITH, F.L.; CICHEWICZ, D.; MARTIN, Z.L.; WELCH, S.P. The enhancement of morphine antinociception in mice by Δ^9 - tetrahydrocannabinol. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 60: 559-566, 1998.
- SNEDDON, L.U. Anatomical and electrophysiological analysis of the trigeminal nerve in a teleost fish, *Oncorhynchus mykiss*. **Neuroscience Letters**, 319(3): 167-171, 2002.
- SNEDDON, L. U. The evidence for pain perception in fish: the use of morphine as an analgesic. **Applied Animal Behaviour Science**, 83: 153-162, 2003a.
- SNEDDON, L. U. Trigeminal somatosensory innervation of the head of the rainbow trout with particular reference to nociception. **Brain Research**, 972: 44-52, 2003b.
- SNEDDON, L. U.; BRAITHWAITE, V. A.; GENTLE, J. M. Do fish have nociceptors: evidence for the evolution of a vertebrate sensory system. **Proceedings of the Royal Society of London B**, 270: 115-1122, 2003c.

- SNEDDON, L. U. Evolution of nociception in vertebrates: comparative analysis of lower vertebrates. **Brain Research Reviews**, 46: 123-130, 2004.
- SNEDDON, L.U. Pain and distress in fish. **ILAR**, 50(4): 338-342, 2009.
- SNEDDON, L.U. Pain perception in fish: Evidence and implications for the use of fish. **Journal of Consciousness Studies**, 18:209-229, 2011.
- STEEDS, C. E. The anatomy and physiology of the pain. **Surgery**, 31: 49- 53, 2013.
- STEVENS, C.W.; SANGHA, S.; OGG, B.G. Analgesia produced by immobilization stress and enkephalinase inhibitor in amphibians. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 51: 675-680, 1995.
- STEVENS, C.W.; BRENNER, G.M. Spinal administration of adrenergic agents produces analgesia in amphibians. **European Journal of Pharmacology**, 316: 205-210, 1996.
- STEVENS, C.W Opioid research in amphibians: an alternative pain model yielding insights on the evolution of opioid receptors. **Brain Research Reviews**, 46: 204-215, 2004.
- STRIEDTER, G. F. **Principles of Brain Evolution**. Sunderland: Sinauer Associates, Inc., 2005.
- TJØLSEN, A.; BERGE, O.G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J.H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain** 51: 5-17, 1992.
- TYCE, G.M.; YAKSH, T.L. Monoamine release from cat spinal cord by somatic stimuli: an intrinsic modulatory system. **Journal of Physiology**, 314: 513-529, 1981.
- VALLARINO, M. Occurrence of β -endorphin-like immunoreactivity in the brain of the teleost, *Boops boops*. **General and Comparative Endocrinology**, 60: 63-69, 1985.
- VALENTI, M.; COTTONE, E.; MARTINEZ, R.; DE PEDRO, N.; RUBIO, M.; VIVEROS, M.P.; FRANZONI, M.F.; DELGADO, M.J.; DI MARZO, V. The endocannabinoid system in the brain of *Carassius auratus* and its possible role in the control of food intake. **Journal of Neurochemistry**, 95: 662-672, 2005.
- VAUGHAN, C.W. Stressed-out endogenous cannabinoids relieve pain. **Trends in Pharmacological Sciences**, 27: 69-71, 2006.
- VECINO, E.; PINUELA, C.; AVARELO, R.; LARA, J.; ALONSO, J.R. Distribution of enkephalin-like immunoreactivity in the central nervous system of rainbow trout: an immunocytochemical study. **Journal of Anatomy**, 180: 435-453, 1992.
- VELASCO, E.M.F.; LAW, P.Y.; RODRIGUEZ, R.E. Mu opioid receptor from the zebrafish exhibits functional characteristics as those of mammalian Mu opioid receptor. **Zebrafish**, 6: 259-268, 2009.

WATKINS, L.R.; COBELLI, D.A.; MAYER, D.J. Classical conditioning of front paw and hind paw footshock induced analgesia (FSIA): naloxone reversibility and descending pathways. **Brain Research**, 243: 119-132, 1982.

WATKINS, L.R.; JOHANNESSEN, J.N.; KINSHECK, I.B.; MAYER, D.J. The neurochemical basis of footshock analgesia: the role of spinal cord serotonin and norepinephrine. **Brain Research**, 290: 107-117, 1984.

WELCH, S.P. Blockade of cannabinoid-induced antinociception by naloxone benzoylhydrazone (NalBZH). **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 49: 929-34, 1994.

WELCH, S.P.; STEVENS, D.L. Antinociceptive activity of intrathecally administered cannabinoids alone, and in combination with morphine, in mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 262: 10-18, 1992.

WERKA, T.; MAREK, P. Post-stress analgesia after lesions to the central nucleus of the amygdala in rats. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**, 50: 13-22, 1990.

WERKA, T. Post-stress analgesia in rats with partial amygdala lesions. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**, 54: 127-132, 1994.

WERKA, T. The effects of the medial and cortical amygdala lesions on poststress analgesia in rats. **Behavioral Brain Research**, 86: 59-65, 1997.

WILKINSON, M.; WILKINSON, D.A.; KHAN, I., CRIM, L.W. Benzodiazepine receptors in fish brain: [^3H] – Flunitrazepan binding and modulatory effects of GABA in rainbow trout. **Brain Research Bulletin**, 10: 301-303, 1983.

WHITEAR, M. The free nerve endings in fish epidermis. **Journal of Zoology (London)**, 163: 231-236, 1971.

WULLIMANN, M.F.; RINK, E. Detailed immunohistology of Pax6 protein and tyrosine hydroxylase in the early zebrafish brain suggests role of Pax6 gene in development of dopaminergic diencephalic neurons. **Developmental Brain Research**, 131: 173-191, 2001.

WULLIMANN, M.F.; MÜLLER, T. Teleostean and mammalian forebrains contrasted: evidence from genes to behaviour. **Journal of Comparative Neurology**, 475: 143-162, 2004.

YAMAGUCHI, F.; MACRAE, A.D.; BRENNER, S. Molecular cloning of two cannabinoid type 1-like receptor genes from the puffer fish *Fugu rubripes*. **Genomics**, 35: 603-605, 1996.

YOSHIMURA, M.; FURUE, H. Mechanisms for the Anti-nociceptive actions of the descending noradrenergic and serotonergic systems in the spinal Cord. **Journal of Pharmacological Science**, 101: 107-117, 2006.