

**ANDRÉ LUIZ VEIGA CONRADO**

**Percepção de dor em peixes ósseos: ação de  
fatores morfofisiológicos e moleculares**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo/SP  
2023

**ANDRÉ LUIZ VEIGA CONRADO**

**Percepção de dor em peixes ósseos: ação de  
fatores morfofisiológicos e moleculares**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular, Tecidual e Desenvolvimento

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Machado Cunha da Silva

Versão corrigida

São Paulo/SP  
2023

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica  
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Conrado, André Luiz Veiga  
Percepção de dor em peixes ósseos: ação de fatores morfofisiológicos e moleculares / André Luiz Veiga Conrado; orientador José Roberto Machado Cunha da Silva. -- São Paulo, 2023.  
103 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Cyprinus carpio. 2. Anestesia. 3. Pinçamento caudal. 4. Cortisol. 5. HSP70. I. Silva, José Roberto Machado Cunha da, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato: André Luiz Veiga Conrado

Titulo da Tese: Percepção de dor em peixes ósseos: ação de fatores morfofisiológicos e moleculares

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Machado Cunha da Silva

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou o candidato:

(    ) **Aprovado(a)**            (    ) **Reprovado(a)**

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente:                              Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Percepção de dor em peixes ósseos: ação de fatores morfofisiológicos e moleculares", protocolada sob o CEUA nº 5420020819, sob a responsabilidade de **Jose Roberto Machado Cunha da Silva e equipe; André Luiz Veiga Conrado** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 01/11/2019.

We certify that the proposal "Pain perception in bone fish: action of morphophysiological and molecular factors", utilizing 70 Fishes (70 females), protocol number CEUA 5420020819, under the responsibility of **Jose Roberto Machado Cunha da Silva and team; André Luiz Veiga Conrado** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 11/01/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: [36 meses](#)

Depto/Setor: [Biologia Celular E do Desenvolvimento](#)

Origem: [Animais provenientes de estabelecimentos comerciais](#)

Espécie: [Peixes](#)

sexo: [Fêmeas](#)

Idade ou peso: [100 a 350 g](#)

Linhagem: [Cyprinus carpio](#)

**N amostral:** [70](#)

São Paulo, 01 de novembro de 2019



Prof. Dra. Luciane Valéria Sita

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



Dr. Alexandre Ceroni

Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

## **AGRADECIMENTOS**

A Eli, Yeshuah e Ruah. A Miguel e Miriam. Shalom!

Aos meus pais, Silvio e Lúcia, e aos meus irmãos Ana Paula e Marco Aurélio que são meu “porto seguro” em todos os momentos!

Ao Prof. Dr. José Roberto Machado Cunha da Silva me aceitou como seu orientado de doutorado e com quem aprendi muito sobre a citologia e histologia de invertebrados aquáticos.

Aos amigos da pós-graduação, agregados, colegas e estagiários do LHE Ana Paula e Marina, Renata, Matheus, Isabela Bordon, Renan, Norton, Giovana, Gabriela, Rebecca e Milena sem esquecer a Marlene, o meu muito obrigado pela ajuda durante o doutorado nas publicações e nas arrumações do biotério e nos cafés da tarde.

Em especial à Renata Stecca lunes pela ajuda em todas as horas, pois sem você nada disso seria realidade. Passamos por muitas dificuldades e estresses juntos, passamos muitos momentos bacanas também, mas tudo isto agora pertence ao passado.

Ao Instituto Cimas pelo empréstimo do Doppler vascular utilizado durante a anestesia das carpas.

À Profa. Dra. Raquel Yvonne Arantes Baccarin, docente do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP e responsável pelo Laboratório de Bioquímica e Hematologia do Hospital Veterinário da FMVZ/USP, pelo empréstimo da centrífuga de microhematócrito no período de lockdown. Também agradeço às técnicas deste Laboratório - Clara, Cláudia e Cleide - por todo o auxílio para as análises hematológicas.

Ao Prof. Dr. Marcelo Santoro, do Laboratório de Patologia do Instituto Butantan, que permitiu o uso de seu laboratório durante o lockdown para o preparo da placa de ELISA para determinação de cortisol e sua leitura.

Ao Prof. Dr. Rogério Faleiros, da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) – campus São Mateus/ES, pela colaboração no desenho dos *primers* para os genes *hsp70* e para o gene endógeno *rpl10a*.

Ao Prof. Edson Moreira, do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), que nos proporcionou conhecer o reator nuclear do Instituto e que também avaliou os microminerais da ração das carpas.

Ao Laboratório de Bromatologia e de Digestão de Monogástricos do Departamento de Produção e Nutrição Animal nas pessoas do Prof. Dr. Messias Trindade e Prof. Dr. Cesar Augusto P. Garbossa e dos técnicos Renata e Flávio Perna Júnior pelas análises nutricionais da ração das carpas.

Ao Prof. Dr. Vicente Gomes por ter proporcionado a colaboração entre o Instituto Oceanográfico (IO/USP) e o Laboratório de Histofisiologia Evolutiva, com a qual pudemos colaborar com a tese de doutoramento de Ana Paula Santos e também coletar ouriços-do-mar e siris-azuis para as pesquisas paralelas do Laboratório de Histofisiologia Evolutiva.

À Dra. Renata Gabriel Fontinele, fisioterapeuta respiratória do Hospital São Luiz – unidade Anália Franco, e Dr. Iuri Moraes Neyrão, zootecnista e doutor em animais aquáticos/UFRGS pelas críticas e sugestões ao manuscrito apresentado na qualificação.

À Profa. Dra. Irene Yan do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento pela colaboração para a leitura da hemoglobina em seu espectrofotômetro e uso de termociclador para confecção do DNA complementar.

À Profa. Dra. Marilene H. Lopes pela experiência como aluno PAE na disciplina de Histologia Básica para os cursos de fisioterapia e terapia ocupacional, além do

auxílio com o processo de reforma do Biotério de Animais Aquáticos do ICB/USP e o aporte de verba junto à Pró-Reitoria de Pesquisa da USP.

À Comissão de Pesquisa do ICB pela concessão de verba para reparo do leitor de placa do Laboratório de Histofisiologia Evolutiva.

À Secretaria de Pós-Graduação do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento e do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Sistemas nas pessoas das secretárias Tânia Cacheiro e Patrícia Rocha.

Ao pessoal da Secretaria de Agricultura e Cultura de Itupeva/SP pelo apoio para o término desta tese. Agradeço principalmente à Malu, Adelaide, Edna, Beth e Pâmela.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq/MCTI pela concessão de bolsa de estudos e verba de bancada (Processo 163896/2018-6) e à FAPESP, que indiretamente contribuiu para a realização de toda a análise molecular desta tese.



## RESUMO

CONRADO, A. L. V. **Percepção de dor em peixes ósseos**: ação de fatores morfofisiológicos e moleculares. 2023. 103 f. Tese (Doutorado em Biologia de Sistemas: Biologia Celular e Tecidual e Desenvolvimento) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

A dor em Peixes ainda é um dogma dentro da Ciência, com críticas à sua neuroanatomia e pela dificuldade de interpretação das reações aos estímulos dolorosos neste grupo de animais. Além disso, as consequências e respostas fisiológicas desencadeadas podem ser de diferentes intensidades no organismo dos peixes, com ações em nível molecular, celular e tecidual. Desta forma, objetivou-se estudar ferramentas para detectar a percepção de dor em peixes. Para tanto foram utilizadas carpas-koi *Cyprinus carpio* anestesiadas por imersão em banhos anestésicos à base de benzocaína nas concentrações de 70, 10 e 130 mg.L<sup>-1</sup> (grupos B70, B100 e B130) e de eugenol nas concentrações de 20, 40 e 60 mg.L<sup>-1</sup> (grupos E20, E40 e E60) seguida de preensão da nadadeira caudal por um minuto. O grupo controle não foi anestesiado, sendo apenas manipulado para coleta de sangue. Foram avaliadas as frequências cardíaca e respiratória antes e após o estímulo doloroso, glicemia sérica, além do hemograma completo, níveis plasmáticos de cortisol e da expressão gênica de *hsp70* nas células sanguíneas. Observou-se que carpas-koi dos grupos B100 e E40 apresentaram menores valores de frequência cardíaca antes, e após estímulo doloroso ( $p < 0,05$ ), menores níveis de glicemia sérica ( $p < 0,05$ ) e alterações hematológicas, porém os valores de cortisol plasmáticos variaram de forma não linear ( $p > 0,05$ ), com o grupo B100 com os valores mais elevados dentre os grupos anestesiados com benzocaína. A análise da expressão de *hsp70* em células sanguíneas se mostrou eficiente para detecção primária da defesa do organismo diante da dor. Todos os peixes anestesiados com benzocaína reduziram a expressão de *hsp70*, também observado em carpas-koi do grupo E40 ( $p < 0,0003$ ). Conclui-se que as ferramentas utilizadas para monitoração e a análise hematológica indiretamente fornecem informações sobre a percepção de dor em peixes, como também fatores moleculares.

**Palavras-chave:** *Cyprinus carpio*. Anestesia. Pinçamento caudal. Cortisol. HSP70.

## ABSTRACT

CONRADO, A.L. V. **Pain perception in bone fish**: action of morphophysiological and molecular factors. 2023. 103 p. Ph. D. thesis (Life Systems Biology: Cell, Tissue and Development Biology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Fish pain is still a dogma within Science, with criticism of fish neuroanatomy and the difficulty of interpreting reactions to painful stimuli in this group of animals. In addition, the triggered consequences and physiological responses can be of different intensities in the fish body, with molecular, cellular and tissue actions. Thus, it was aimed to study tools to detect the perception of pain in fish. To this end, koi carps *Cyprinus carpio* were anesthetized by immersion in benzocaine-based anesthetic baths at 70, 10 and 130 mg.L<sup>-1</sup> (groups B70, B100 and B130) and eugenol at concentrations of 20, 40 and 60 mg.L<sup>-1</sup> (groups E20, E40 and E60) followed by caudal fin pinching for one minute. The control group was not anesthetized, being only manipulated for blood collection. Heart and respiratory rates were evaluated before and after painful stimulus, serum blood glucose, in addition to the complete hematology analysis, plasma cortisol levels and *hsp70* gene expression in blood cells. B100 and E40 koi carps were observed with lower heart rate values before, and after painful stimulus ( $p < 0.05$ ), lower levels of serum blood glucose ( $p < 0.05$ ) and hematological changes, but plasma cortisol values varied nonlinearly ( $p > 0.05$ ) with group B100 with the highest values among the groups anesthetized with benzocaine. The analysis of *hsp70* expression in blood cells proved to be efficient for primary detection of the defense of the organ in the face of pain. All anesthetized fish with benzocaine reduced the expression of *hsp70*, also observed in E40 koi carps ( $p < 0.0003$ ). In conclusion, the tools used for monitoring and hematological analysis indirectly provide information on the perception of pain in fish, as well as molecular factors.

**Keywords:** *Cyprinus carpio*. Anesthesia. Caudal pinching. Cortisol. HSP70.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	16
2.1. <i>Modelo animal – Carpa-koi Cyprinus carpio</i> .....	16
2.2. <i>Fisiopatologia da dor</i> .....	19
2.3. <i>Consequências orgânicas pós-processamento da dor</i> .....	22
2.4. <i>Estresse em peixes</i> .....	23
2.5. <i>Papel fisiológico da HSP70 nos peixes expostos ao estresse</i> .....	26
2.6. <i>Dor em peixes – dogma científico</i> .....	29
2.7. <i>Anestesia em peixes e controle de efeitos indesejáveis da dor</i> .....	32
2.8. <i>Benzocaína na anestesia de peixes</i> .....	35
2.9. <i>Eugenol na anestesia de peixes</i> .....	38
2.10. <i>Análise hematológica em carpas</i> .....	40
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	43
3.1. <i>Objetivo principal</i> .....	43
3.2. <i>Objetivos específicos</i> .....	43
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	44
4.1. <i>Local de experimentação e manutenção dos animais</i> .....	44
4.2. <i>Análise bromatológica da ração</i> .....	45
4.3. <i>Análise de microminerais na ração</i> .....	46
4.4. <i>Anestesia das carpas e coleta de material</i> .....	46
4.5. <i>Análise hematológica</i> .....	48
4.6. <i>Histologia da pele</i> .....	50
4.7. <i>Quantificação de cortisol plasmático</i> .....	50
4.8. <i>Extração de RNA de células sanguíneas</i> .....	51
4.9. <i>Confecção de cDNA</i> .....	53
4.10. <i>RT-qPCR de hsp70 e rpl10a nas células sanguíneas de carpas-koi</i> .....	53
4.11. <i>Análise estatística</i> .....	55
<b>5. RESULTADOS</b> .....	56
5.1. <i>Parâmetros físicos e químicos da água</i> .....	56
5.2. <i>Análise bromatológica da ração</i> .....	56

5.3. <i>Análise de microminerais na ração</i> .....	56
5.4. <i>Fatores fisiológicos relacionados à anestesia, estímulo doloroso e hemograma</i> .....	57
5.5. <i>Histologia da pele das carpas</i> .....	63
5.6. <i>Níveis plasmáticos de cortisol</i> .....	66
5.7. <i>Extração de RNA das células sanguíneas</i> .....	67
5.8. <i>RT-qPCR para hsp70 e rpl10a</i> .....	67
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	69
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	76
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	77

## 1. INTRODUÇÃO

O termo dor na literatura médica ocidental remonta ao período hipocrático (século V a.C.), quando Hipócrates e seus seguidores publicaram a Coleção Hipocrática (CHEN, 2011). Mais tarde, Herófilo (335-280 a.C.) foi o primeiro a descrever o papel da medula espinhal na ligação do cérebro aos nervos periféricos e a existência de nervos envolvidos na sensação e no controle de movimentos (CERVERO; WOOD, 2020). Neste mesmo período, Aristóteles (324-322 a.C.) postulou que o coração era a sede das sensações (audição, visão, olfato, paladar e dor), das emoções e das funções mentais. Na verdade, a ideia de que o cérebro era a sede da percepção foi postulada por alguns filósofos e médicos, tais como Pitágoras (570-495 a.C.), Anaxágoras (500-428 a.C.) e Galeno (130-201 d.C.) nos tempos antigos, e Avicena (980–1037 d.C.) na Idade Média. Galeno reconheceu o cérebro como o local do sentimento e propôs que a dor é uma característica específica da sensação tátil (CHEN, 2011).

Após os trabalhos de dissecação de Andreas Vesalius (1514-1564), o cérebro ganhou a atenção nos estudos modernos da sensação de dor. No século XVII, as funções cerebrais foram significativamente promovidas por René Descartes (1596–1650), Thomas Willis (1621–1675) e Thomas Sydenham (1624–1689). Descartes forneceu um famoso desenho hipotético que mostrava a transmissão de informações de dor através dos nervos periféricos e da medula espinhal para os ventrículos do cérebro e o órgão pineal onde a percepção consciente de um estímulo doloroso foi proposta para ser produzida. Thomas Willis forneceu evidências do papel do cérebro na percepção da dor. Thomas Sydenham foi o primeiro a usar láudano, um composto de ópio, açafrão, canela e cravo adicionados ao vinho, introduzido na Europa por Paracelsus (1493-1541) em 1527, e promoveu o tratamento consistente e sistemático da dor (CHEN, 2011, CERVERO; WOOD, 2020).

Nos séculos seguintes observa-se a crescente pesquisa sobre a fisiologia do sistema nervoso por Giovanni Aldini (1762-1834), Charles Bell (1774–1842), François Magendie (1783–1855), Johannes P. Müller (1801–1858), e da transmissão da dor ao sistema nervoso central por Charles-Edouard Brown-Séquard (1817–1894), sua modulação por Wilhelm Heinrich Erb (1840–1921) e bloqueio por Moritz Schiff (1823–1896), William Gower (1845–1915) e William Gibson Spiller (1863–

1940) (CHEN, 2011). Os conceitos teóricos e resultados experimentais foram utilizados para o tratamento da dor intratável através da cordotomia espinhal parcial no final do século XIX (CERVERO; WOOD, 2020).

Em 1875, Friedrich Sigmund Merkel (1845–1919) descreveu as “tastzellen” ou “células de toque” na pele dos animais, mais tarde reconhecidas como mecanorreceptores por Wladyslaw Szymonowicz (1869-1939) em 1895 (HALATA et al., 2003). Em 1884, Magnus Blix (1849–1904) e Adolf Goldscheider (1858–1935) demonstraram o mosaico de sensações cutâneas e pontos de dor. Durante 1894-1897, Max von Frey (1852-1932) forneceu ainda mais evidências ligando terminações nervosas sensoriais específicas na pele à sensação de dor. Nos anos 1940, Herbert Spencer Gasser (1888–1963) e Joseph Erlanger (1874–1965) identificaram e classificaram as fibras aferentes sensoriais individuais em fibras mielinizadas e não mielinizadas, em que A $\alpha$  e A $\beta$  são fibras de condução rápida e densamente mielinizadas, enquanto as fibras A $\delta$  são fibras de condução lenta e finamente mielinizadas. As fibras C são as fibras não mielinizadas de condução mais lenta (CHEN, 2011).

Charles Scott Sherrington (1857-1952) introduziu o conceito de nocicepção, enfatizando a lesão tecidual como uma fonte trivial de dor. Sherrington também forneceu um modelo experimental do reflexo de flexão nociceptivo espinhal como um substituto para a sensação de dor, que tem sido amplamente utilizado no campo da pesquisa da dor desde então (CHEN, 2011).

Contudo, em 1967, os estudos de Edward Roy Perl (1926–2014) e colaboradores identificaram neurônios especializados em detecção de lesão, então chamados de nociceptores (CERVERO; WOOD, 2020). Perl e seus colaboradores verificaram que a sensação de dor só poderia ser evocada pela ativação de nociceptores, e não por mecanorreceptores de baixo limiar. Três anos depois de descobrirem fibras nociceptivas periféricas, Perl e Christensen identificaram ainda mais uma classe de neurônios centrais referidos como neurônios nociceptivos específicos dentro da lâmina I do corno dorsal da coluna vertebral. Estes neurônios foram identificados no complexo ventrobasal do tálamo e no córtex somatossensorial primário a partir de meados da década de 1980 (CHEN, 2011). Assim, após milênios, comprovou-se morfológicamente a ligação entre o estímulo doloroso na pele com todo o sistema de transdução e transmissão até o cérebro.

Paralelo às descobertas de todo o sistema de transmissão e transdução da dor em animais e humanos, a analgesia também evoluiu. São relatados o uso de éter em galinhas por Paracelsus e de alcaloides de beladona na anestesia de cavalos por Carlo Ruini (1530-1598), de ópio em cães por Robert Boyle (1627-1691) e tintura de ópio em cães por Erik Nissen Viborg (1759-1822), além do óxido nítrico em cobaias por Humphry Davy (1778-1829) (JONES, 2002). Em meados do século XIX, substâncias como éter dietílico, clorofórmio, hidrato de cloral e cocaína foram utilizados na analgesia tanto na medicina humana quanto veterinária. Nos animais de companhia, o éter e o clorofórmio eram costumeiramente administrados no início do século XX. No entanto, a anestesia geral tornou-se mais amplamente aceita após a descoberta dos barbitúricos no final da década de 1920 e introdução do pentobarbital (1930) e do tiopental (1934). A anestesiologia Veterinária evoluiu rapidamente a partir da década de 1970 com novas drogas mais seguras e possibilidade de monitoração do paciente anestesiado (TRANQUILLI; GRIMM, 2015).

Na medicina veterinária a realidade é diferente da medicina humana, pois os avanços são mais lentos pela diversidade de espécies. Observa-se a preocupação do reconhecimento e tratamento da dor em animais de companhia (MONTEIRO et al., 2022), de produção (WEARY et al., 2006) e de laboratório (CARSTENS; MOBERG, 2000). Mas e os vertebrados não mamíferos? As aves parecem experimentar e reagir à dor de maneira semelhante aos mamíferos. Também há evidências de que répteis, anfíbios e peixes compartilhem essas habilidades (LIVINGSTON, 2002).

Para muitos veterinários, anestesia é sinônimo de analgesia. Infelizmente, em muitos protocolos anestésicos, mesmo que o animal não esteja se movendo durante o procedimento cirúrgico e possa ser considerado sem dor, alterações significativas nos parâmetros cardiopulmonares e neurológicos podem ser provocadas por profundidade inadequada ou uso inapropriado de analgésicos (SHORT, 1998).

O público espera que os veterinários sejam capazes de produzir alguma avaliação da origem e intensidade da dor e usar suas habilidades e privilégios profissionais para aliviá-la. Nesse processo, o veterinário não está adotando uma postura ética pela interação com o animal, ele simplesmente tem treinamento e habilidade para fazer a avaliação e adotar estratégias para lidar com a situação (LIVINGSTON, 2002).

Finalmente, as questões éticas associadas à ocorrência de dor em espécies não mamíferas devem ser abordadas. Se acreditarmos que, enquanto as vias neuronais e o tecido encefálico cerebral estiverem presentes, é provável que os animais possam sentir dor, então não temos outra opção senão acreditar que os vertebrados não mamíferos possam realmente sentir dor (LIVINGSTON, 2002).

Ainda hoje, pouco é conhecido sobre as respostas sensoriais de peixes anestesiados com drogas de uso frequente na aquicultura, se há percepção do estímulo doloroso no plano anestésico atingido e quais são as respostas fisiológicas e moleculares nestes animais após o estímulo de dor durante a anestesia com anestésicos em diferentes concentrações. Poucas são as ferramentas para se determinar a dor nestes animais.



## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Modelo animal – Carpa-koi *Cyprinus carpio*

O filo Chordata é composto por mais de 67 mil espécies, das quais os Peixes contribuem com cerca de 35.200 espécies, perfazendo mais de 50% do número total de espécies no globo. Dentro da Superclasse dos Peixes estão incluídos os grupos Cyclostomata (feiticeiras e lampreias), Chondrichthyes (tubarões, quimeras e raias), Actinopterygii (peixes de nadadeira raiada) e Sarcopterygii (peixes pulmonados e celacantos). Os peixes ósseos são mais numerosos, sendo ao redor de 36 mil espécies distribuídas nos mais diversos biomas (FRICKE et al., 2023).

A carpa-comum *Cyprinus carpio* (Linnaeus 1758) é uma das espécies de peixe mais antigas domesticadas para alimentação. A cultura da carpa na China remonta ao século V a.C., embora a domesticação tenha começado muito mais tarde. Na Europa, as linhagens de carpa derivaram da carpa selvagem do Danúbio e nativa de apenas um número limitado de países europeus. As primeiras tentativas de criação remontam ao Império Romano, com sua propagação ocorrendo juntamente com o cristianismo na Europa, de onde linhagens domesticadas foram posteriormente introduzidas em outros continentes (FLAJŠHANS; HULATA, 2007).

O melhor crescimento é obtido à temperatura da água de 23 a 30 °C. Os peixes podem sobreviver aos períodos frios do inverno. A salinidade de até 5 ‰ é tolerada, o pH ideal é de 6,5 a 9,0; A carpa-comum pode sobreviver à baixa concentração de oxigênio (0,3 - 0,5 mg.L<sup>-1</sup>), bem como à supersaturação (FLAJŠHANS; HULATA, 2007).

A carpa é onívora, com alta tendência ao consumo de organismos bentônicos, como insetos aquáticos, larvas de insetos, anelídeos, moluscos e zooplâncton. O consumo de zooplâncton é dominante em tanques de peixes onde a densidade de estocagem é alta. Além disso, a carpa consome os caules, folhas e sementes de plantas aquáticas e plantas terrestres, plantas aquáticas deterioradas, etc. (FLAJŠHANS; HULATA, 2007). Em criações comerciais, a ração oferecida em flocos ou extrudada deve conter entre 30 e 35 % de proteína bruta, energia digestível entre 13 e 15 MJ.kg<sup>-1</sup> (310-360 kcal.kg<sup>-1</sup>) podendo conter até 40 % de amido como fonte de carboidrato, 5 a 15 % de lipídio (extrato etéreo) contendo os ácidos graxos

essenciais linoleico e linolênico (1 % cada), além do mix vitamínico e mineral (TAKEUCHI et al., 2002).

O cultivo de carpa-comum em tanques escavados é baseado em alimentos naturais, com alimentação suplementar de cereais. O crescimento diário pode ser de 2 a 4 % do peso vivo. As carpas podem alcançar 0,6 a 1,0 kg de peso vivo em estações de policultura com clima subtropical/tropical (FLAJŠHANS; HULATA, 2007).

A taxa metabólica de peixes e outras espécies ectotérmicas é amplamente determinada pela temperatura do ambiente e aumenta linearmente ao longo de uma faixa média de temperaturas. A quantidade média de energia térmica do ambiente experimentada por um ectotérmico pode ser quantificada usando uma abordagem em graus-dia (também conhecida como temperatura térmica). O grau-dia para um único dia (GD) é calculado como  $GD = (T_{Max} - T_{min})/2 - T_o$ , onde  $T_{Max}$  e  $T_{min}$  são a temperaturas diárias máxima e mínima do ambiente, respectivamente, e  $T_o$  (geralmente chamada de temperatura base ou limite) é a temperatura abaixo da qual o crescimento ou desenvolvimento é não-linear e efetivamente zero. Quando os valores de GD não negativos são somados ao longo de algum período de interesse, os graus-dias resultantes acumulados em um determinado  $T_o$  é um índice da energia térmica metabolicamente relevante que foi experimentado durante esse período. Para as carpas, o valor de  $T_o$  está entre 10 e 12 °C. Este índice é útil para descrever padrões simultâneos de crescimento e desenvolvimento (CHEZIK et al., 2013). Na Europa, as fêmeas amadurecem após 11.000-12.000 graus-dias nas zonas climáticas temperadas e subtropicais; porém os machos amadurecem 25 - 35 % antes (FLAJŠHANS; HULATA, 2007).

A desova natural de carpas começa quando a temperatura da água atinge 17-18 °C (FLAJŠHANS; HULATA, 2007). Em criações comerciais pode-se utilizar extrato de hipófise de carpa injetado via intramuscular para indução da ovulação e espermição (YARON, 1995). As fêmeas liberam de 100 a 230 g de ovos por 1 kg de peso corporal. Os ovos são depositados em plantas aquáticas submersas e, após sua fixação, aumentam de volume em 3-4 vezes. O desenvolvimento embrionário leva de 60 a 70 graus-dia. As larvas se fixam no substrato e vivem de suprimentos de vitelo. Três dias após o desenvolvimento da região posterior da bexiga natatória, as larvas começam a nadar e consumir alimentos externos com tamanho de 150-180 µm. Os métodos de produção de larvas na Ásia incluem hapas (tanques-rede de

malha de nylon estaqueados no interior de tanques escavados) e canais com rede utilizando substrato natural ou artificial (ninhos de desova), bem como a produção europeia de alevinos em tanques escavados (FLAJŠHANS; HULATA, 2007).

De acordo com Chistiakov e Voronova (2009), a carpa-comum europeia e a carpa asiática representam populações geneticamente diferentes, sugerindo que as populações deveriam ser nomeadas como *Cyprinus carpio carpio* e *Cyprinus carpio rubrofuscus*, respectivamente.

A carpa-koi *Cyprinus carpio rubrofuscus* é um peixe de cores vivas nativo da Ásia e da Europa. A carpa-koi parece ser uma variante ornamental da carpa comum do leste asiático que foi levada da China para o Japão e criadas seguindo-se padrões de coloração e escala. Elas são uma variante ornamental da carpa-comum (*C. carpio*) e foram desenvolvidas por reprodução seletiva da subespécie asiática *C. c. haematopterus* (SAHOO et al., 2020).

O corpo da carpa-koi pode variar de alongado a oval profundo recoberto por escamas ciclóides. Sua coloração é variável, com carpas brancas com manchas vermelhas e pretas, ou vermelhas e laranjas e alguns exemplares são completamente pretos, vermelhos ou brancos. Eles têm uma longa nadadeira dorsal que possui 2–3 raios duros e 17–22 raios moles. O primeiro (maior) raio duro é pontiagudo e serrilhado em sua margem posterior. Características morfológicas adicionais incluem 2–3 espinhos anais, 5–6 raios anais e 36–37 vértebras. Durante a sua alimentação, a boca sofre protrusão para captura de alimento e da ração, os quais podem ser detectados pelos dois pares de barbilhões, um par no lábio superior e outro par nos cantos da boca. A carpa-koi vive entre 15 e 24 anos, com os machos apresentando-se mais longevos do que as fêmeas. A fêmea da carpa-koi produz 1.000.000 ovos por kg de peso corporal. Uma fêmea típica pode produzir 3.000.000 ovos anualmente (SAHOO et al., 2020).

A descrição mais profunda sobre as origens e criação das carpas europeias, asiáticas e kois pode ser encontrada em Balon (1995).

Para todos os efeitos, doravante, haverá a distinção entre informações advindas de experimentos com carpas-koi e carpas-comuns, entretanto ambos os peixes serão identificados como *Cyprinus carpio*.

## 2.2. Fisiopatologia da dor

Em 1900, o neurofisiologista inglês Charles Scott Sherrington (1857 - 1952) definiu a dor como o complemento psíquico de um reflexo protetor imperativo. Esta definição ressalta a dimensão primária da dor como resposta motora para a remoção de regiões/membros para longe de insultos potencialmente prejudiciais. Atualmente, a Associação Internacional para o Estudo da Dor propôs a seguinte definição em humanos: a dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano real ou potencial ao tecido, ou descrito em termos de tais danos (LAMONT et al., 2000).

Precisamente, o “sistema da dor” deveria ser chamado de “sistema nociceptivo” porque dor é o resultado subjetivo da nocicepção. A nocicepção é a codificação e processamento de estímulos nocivos no sistema nervoso que podem ser medidos com técnicas eletrofisiológicas (SCHAIBLE; RICHTER, 2004).

É importante reconhecer que a dor que ocorre após a maioria dos estímulos nocivos é geralmente protetora e bastante distinta da dor resultante de dano evidente aos tecidos ou nervos. Esse primeiro tipo de dor é denominado dor fisiológica. Ele desempenha um papel adaptativo integral como parte dos mecanismos normais de defesa do corpo, alertando sobre o contato com insultos ambientais potencialmente prejudiciais e iniciando estratégias comportamentais e evitando reflexos. Também é frequentemente referida como dor nociceptiva porque só é provocada quando estímulos nocivos intensos ameaçam ferir o organismo. É caracterizada por um alto limiar de estímulo, é bem localizada e transitória e demonstra uma relação estímulo-resposta semelhante àquelas de outras sensações somáticas. Este mecanismo de proteção é facilitado por uma rede altamente especializada de nociceptores e neurônios sensoriais primários que codificam a intensidade, duração e qualidade dos estímulos nocivos e, em virtude de suas projeções topograficamente organizadas para a medula espinhal. Embora a extrapolação desse modelo fisiológico de dor para o ambiente clínico tenha várias limitações inerentes, a compreensão das vias básicas da dor é necessária antes que a dinâmica complexa do sistema possa ser avaliada (LAMONT et al., 2000). Nos animais, a dor fisiológica induz respostas protetoras como a reação de fuga, com o intuito de interromper a exposição ao estímulo nocivo. Este sinal é típico da dor

aguda produzida por estímulos intensos na superfície da pele (KLAUMANN et al., 2008).

Os nociceptores, ou receptores de dor, são terminações nervosas livres encontradas nos tecidos (exceto no cérebro) responsivas a estímulos dolorosos que transmitem informações ao sistema nervoso central. Eles são estimulados por agentes biológicos, elétricos, térmicos, mecânicos e químicos (HELMS; BARONE, 2008). No caso de estímulos mecânicos, as células de Merkel são as responsáveis pela transformação do estímulo em potencial de ação para as fibras do nervo aferente (HALATA et al., 2003). Acredita-se que a mecanorrecepção resulte da abertura de canais catiônicos que resultam na despolarização das terminações nervosas. Durante a inflamação tecidual, a tumefação pode abrir esses canais com mais eficácia do que em condições normais (SCHAIBLE; RICHTER, 2004).

Dois tipos de fibras estão envolvidos na transmissão da dor. As grandes fibras A delta produzem uma dor aguda bem definida, chamada “dor rápida” ou “dor inicial”, tipicamente estimulada por um corte, choque elétrico ou golpe físico. A transmissão através das fibras A é tão rápida que os reflexos do corpo podem realmente responder mais rapidamente do que o estímulo da dor, resultando na retração da parte afetada do corpo antes mesmo que haja a percepção da dor. Após essa primeira dor, as fibras C menores transmitem sensações ardentes ou doloridas, conhecidas como “segunda dor”. As fibras C transmitem a dor mais lentamente do que as fibras A, porque as fibras C são menores e não possuem bainha de mielina. As fibras C são as que produzem dor constante (HELMS; BARONE, 2008).

A percepção da dor ocorre quando esses estímulos são transmitidos para a medula espinhal e depois para as áreas centrais do cérebro. Os impulsos da dor viajam para a raiz dorsal da coluna, onde fazem sinapse com os neurônios da raiz dorsal na substância gelatinosa e então seguem para o cérebro. Os corpos celulares de ambos os tipos de fibras nervosas aferentes nociceptivas estão contidos nos gânglios da raiz dorsal e estendem os axônios para fazer sinapses com os neurônios do corno dorsal dentro da substância cinzenta da medula espinhal. A maioria das fibras A delta termina na camada mais superficial, lâmina I (também chamada de zona marginal), com algumas fibras se projetando mais profundamente na lâmina V. A maioria das fibras C também se destina ao corno dorsal superficial, com foco na lâmina II (a substância gelatinosa). É no corno dorsal que ocorre a integração inicial e a modulação da entrada nociceptiva. Os axônios aferentes primários podem

formar conexões diretas ou indiretas com uma das três populações funcionais de neurônios do corno dorsal: (1) interneurônios, frequentemente divididos em subtipos excitatórios e inibitórios, que servem como retransmissores e participam do processamento local; (2) neurônios propriospinais, que se estendem por vários segmentos espinhais e estão envolvidos em atividade reflexa e interações entre estímulos que atuam em *loci* separados; e (3) neurônios de projeção, que participam da transmissão rostral estendendo axônios além da medula espinhal para terminar em centros supraespinhais, como o mesencéfalo e o córtex. Todos os três componentes são interativos e essenciais para o processamento da informação nociceptiva, o que facilita a geração de uma resposta à dor organizada e adequada (LAMONT et al., 2000).

Dentro do corno dorsal, a comunicação de informações nociceptivas entre vários neurônios ocorre por meio de sinalização química mediada por aminoácidos excitatórios e inibitórios e neuropeptídeos que são produzidos, armazenados e liberados nos terminais das fibras nervosas aferentes e neurônios do corno dorsal. Estudos eletrofisiológicos têm demonstrado que a liberação dos aminoácidos excitatórios glutamato e aspartato, atuando como neurotransmissores disparam potenciais sinápticos rápidos nos neurônios superficiais do corno dorsal, facilitando a transmissão nociceptiva. Neurônios aferentes nociceptivos (em particular fibras C) também liberam uma variedade de outros neuropeptídeos, incluindo substância P, neurotensina, peptídeo intestinal vasoativo, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina e colecistocinina, que são capazes de estimular potenciais pós-sinápticos excitatórios lentos na projeção ascendente. Assim como uma barreira de estímulos nociceptivos é capaz de sensibilizar os nociceptores periféricos, os impulsos aferentes sustentados também podem produzir características de resposta alteradas nos neurônios do corno dorsal (LAMONT et al., 2000).

A sensação básica de dor ocorre no tálamo, e continua ao sistema límbico (centro emocional) e ao córtex cerebral, onde a dor é percebida e interpretada (HELMS; BARONE, 2008).

Axônios ascendentes no trato espinotalâmico ativam o sistema tálamo-cortical que produz a sensação de dor consciente. A sensação de dor tem um aspecto sensorial discriminativo, ou seja, o estímulo nocivo é analisado quanto à sua localização, duração e intensidade. Isso é produzido no sistema tálamo-cortical lateral, que consiste em núcleos de retransmissão no tálamo lateral e nas áreas SI e

SII no giro pós-central. Um segundo componente da sensação de dor é o aspecto afetivo, ou seja, o estímulo nocivo é desagradável e causa reações aversivas. Esse componente é produzido no sistema tálamo-cortical medial, que consiste em núcleos de retransmissão no tálamo central e medial e no córtex cingulado anterior, na ínsula e no córtex pré-frontal (SCHAIBLE; RICHTER, 2004).

A medula espinhal está sob a influência de tratos descendentes que reduzem ou facilitam o processamento nociceptivo. A inibição descendente é formada por vias que se originam dos núcleos do tronco encefálico (em particular, a substância cinzenta periaquedutal e o núcleo magno da rafe) e descem através do funículo dorsolateral da medula espinhal. Este sistema é capaz de suprimir o processamento de informações nociceptivas via interneurônios no corno dorsal da medula espinhal (SCHAIBLE; RICHTER, 2004).

### *2.3. Consequências orgânicas pós-processamento da dor*

O sistema nervoso é o alvo principal da informação nociceptiva e fornece o veículo pelo qual um organismo pode reagir a essa entrada. A resposta à dor, no entanto, é diversa e não se limita apenas ao sistema nervoso. Em mamíferos, a dor induz respostas reflexas segmentares e suprasegmentares que resultam em aumento do tônus simpático, vasoconstrição, aumento da resistência vascular, aumento do débito cardíaco por aumento do volume sistólico e frequência cardíaca, aumento do trabalho miocárdico através de aumentos na taxa metabólica e consumo de oxigênio, diminuição do tônus gastrointestinal e urinário e aumento do tônus do músculo esquelético (LAMONT et al., 2000).

As respostas endócrinas incluem aumento da secreção de corticotropina, cortisol, hormônio antidiurético, hormônio de crescimento, monofosfato de adenosina cíclico, catecolaminas, renina, angiotensina, aldosterona, glucagon e interleucina 1, com concomitante diminuição da secreção de insulina e testosterona. Metabolicamente, isso se traduz em um estado catabólico caracterizado por hiperglicemia, aumento do catabolismo de proteínas e lipólise, retenção renal de água e sódio com aumento da excreção de potássio e diminuição da taxa de filtração glomerular (LAMONT et al., 2000).

Como consequência da dor, os mamíferos podem apresentar mudanças comportamentais como o aumento ou redução da agressividade; vocalização;

animais predados se refugiam e mantêm-se em silêncio; atos de lambedura, mordedura ou movimentação intensa da área dolorida a ponto da automutilação; alteração na deambulação de membro afetado; alteração da postura com contração de abdome e cifose; redução de apetite e ingestão de água com consequente perda de peso e desidratação; fácies de dor - olhos esmaecidos, pupilas dilatadas, fotofobia e movimentos das orelhas; sudorese excessiva em cavalos; salivação excessiva em roedores; descarga oculonasal - em ratos estressados há a produção de pigmento porfirínico lacrimal que simula hemorragia pelas narinas e olhos; ranger de dentes em roedores; e variação na defecação (tenesmo, diarreia) e micção (disúria) (LEONARDI et al., 2006).

#### *2.4. Estresse em peixes*

Estresse é uma resposta não específica do organismo para qualquer demanda que lhe é imposta (BARTON; IWAMA, 1991). O estresse em peixes é um estado causado por um fator de estresse, ou estressor, que o retira de um estado normal de repouso ou um estado homeostático (BARTON; IWAMA, 1991). Estressores universais incluem desvios da zona de conforto de parâmetros ambientais (temperatura ambiente, suprimento de oxigênio), disponibilidade insuficiente de alimento, refúgio inadequado contra predadores ou luz do sol e demandas de interações sociais tais com disputa territoriais (HARPER; WOLF, 2009). Em relação aos estressores relacionados às práticas da aquicultura, como densidade populacional, manipulações e despesca, a intensidade e o tempo são componentes - chave. Outros estressores são aqueles relacionados à qualidade da água e, portanto, relacionado com o leque de variáveis ambientais que incluem temperatura, oxigênio dissolvido, componentes nitrogenados, salinidade, pH, presença de químicos, contaminantes e notavelmente a presença de patógenos. Neste segundo caso, o fator principal é o grau de mudança entre a situação inicial e após a introdução do fator ambiental ou patogênico (TORT, 2011).

De acordo com Selye (1950), um organismo estressado passa por três fases distintas denominadas de Síndrome Geral de Adaptação (SGA).

A primeira fase da SGA é uma reação de alarme, normalmente caracterizada por uma rápida resposta fisiológica, seguida por uma segunda fase de resistência. Durante a segunda fase, o organismo se adapta para ou compensa diante das



condições alteradas, causando o estresse a fim de reaver seu estado homeostático. Isto pode ser compreendido como um retorno das condições fisiológicas ao estado de pré-estresse ou a um estado alterado de repouso. Se o estresse for muito grave ou de longa duração, a compensação não será possível e o organismo entra no estágio final de exaustão (BARTON; IWAMA, 1991).

Os peixes teleósteos não apresentam glândulas adrenais organizadas semelhantes aos outros vertebrados, portanto, funções similares são realizadas pelo tecido cromafim e tecido inter-renal localizados nos rins craniais (BARTON, 2002). O rápido aumento nos níveis plasmáticos de catecolaminas, adrenalina e noradrenalina, ocorrem principalmente em face do estresse agudo grave, particularmente se este estresse é acompanhado por, ou envolve significativa redução na concentração de oxigênio sanguíneo (GESTO et al., 2015). Esta rápida resposta é primariamente mediada por fibras nervosas colinérgicas que diretamente inervam o tecido cromafim, sistema conhecido como eixo hipotálamo – sistema nervoso autônomo – células cromafins (WENDELAAR BONGA, 1997; PANKHURST, 2011). Este sistema foi observado em atividade no encéfalo de carpas comuns com o auxílio da Ressonância Magnética Funcional utilizando-se o efeito BOLD (blood-oxygen-level dependent) (FLIK et al., 2006).

As respostas primárias neuroendócrinas ao estresse após percepção pelos sensores do sistema nervoso envolvem a secreção imediata de hormônio secretório de corticosteroide (CRH) pelo núcleo preóptico do hipotálamo. O receptor estimulado pelo CRH nas células corticotrópicas da hipófise induz a secreção de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na circulação que, por sua vez, estimula a secreção de cortisol pelas células do tecido inter-renal localizado ao redor das veias cardinais posteriores do rim cranial (STOLTE et al., 2008a; TORT, 2011) caracterizando o eixo hipotálamo – hipófise – tecido inter-renal (COCKREN, 2013). Em estudo recente, Uchimura et al. (2019) relataram a primeira evidência de que os níveis plasmáticos de cortisol em peixes estão relacionados com o aumento da expressão do gene *crhb* (corticotropin-releasing hormone paralog b) no hipotálamo.

Nos peixes, a secreção de catecolaminas ocorre em questão de segundos após a detecção do distúrbio e a meia-vida desses neuormônios é curta, de apenas alguns minutos. Entretanto, os níveis de cortisol no plasma se mantêm elevados por até dias após o estímulo estressor (BARTON, 2002). Um dos efeitos clássicos das catecolaminas é promover a glicogenólise, portanto aumentando a glicemia

sanguínea e provendo para o animal acesso rápido à fonte de energia para evitar ou superar a ameaça imediata. As catecolaminas podem também induzir a hiperglicemia pela ativação da via gliconeogênica pela mobilização de lipídios (PICKERING, 1993).

Além do aumento do cortisol plasmático, o estresse tipicamente causa aumento nos níveis de plasmáticos de glicose e lactato. Elevações na glicose plasmática são geradas pela gliconeogênese mediada por catecolaminas e, em estágios mais tardios, mediada pelo cortisol, e as concentrações do lactato crescem uma vez que o lactato muscular formado durante a anaerobiose é liberado para o plasma. (PANKHURST, 2011). Em adição à modulação do metabolismo de carboidratos, o aumento dos corticosteroides causa aumento no *turnover* de proteínas, regulação do metabolismo de aminoácidos, excreção de amônia, atividade da glutamina sintetase e aminotransferase e elevação da lipólise (PANKHURST, 2011).

Desta forma, o estresse não pode ser mensurado por si mesmo e apenas as respostas aos estímulos podem ser determinadas por meios quantitativos que refletem os graus de gravidade do estresse experimentado. A elevação de corticosteroides plasmáticos, principalmente cortisol em peixes teleósteos em resposta a vários tipos de estímulos estressantes, constitui uma importante resposta hormonal ou primária ao estresse (BARTON; IWAMA, 1991). Estes hormônios diretamente ou indiretamente resultam em respostas secundárias ou terciárias que podem ser geralmente classificadas como aquelas envolvidas com a mobilização energética e metabolismo, balanço hidromineral, e outras funções que podem afetar a resistência às doenças (SCHRECK, 1996).

Para carpas, a concentração basal de cortisol no plasma foi determinada utilizando-se diferentes procedimentos e agentes anestésicos para coleta de sangue. Para carpas-koi não anestesiadas os níveis de cortisol registrados foram de  $310,7 \pm 28,5 \text{ ng.mL}^{-1}$  (CROSBY et al., 2010), com triclaína (MS-222) no intervalo de 163 – 354  $\text{ng.mL}^{-1}$  (HARMS et al., 2005). Para carpas-comuns são registrados os níveis de cortisol com anestesia com etomidato no intervalo de 5,3 – 139,5  $\text{ng.mL}^{-1}$  (WOJTASZEK et al., 2002) e com 2-fenoxietanol no intervalo de 10 – 50  $\text{ng.mL}^{-1}$  (POTTINGER, 1998).

## 2.5. Papel fisiológico da HSP70 nos peixes expostos ao estresse

A resposta aos fatores estressantes compreende a atuação de proteínas denominadas proteínas de choque térmico (HSP – Heat Shock Proteins), sendo também conhecidas como chaperonas moleculares pela sua interação de forma reversível auxiliando na formação, dobramento e transporte transmembrana de proteínas recém-sintetizadas (KIANG; TSOKOS, 1998).

HSP funcionam como chaperonas moleculares; isto é, elas interagem com outras proteínas e, ao fazê-lo, minimizam a probabilidade de que essas outras proteínas interajam inadequadamente umas com as outras. As HSP reconhecem e se ligam a outras proteínas quando estas estão em conformações não nativas, seja devido ao estresse desnaturante de proteínas ou porque os peptídeos que elas compreendem ainda não foram totalmente sintetizados, dobrados, montados ou localizados em um compartimento celular apropriado. A ligação e/ou liberação dessas outras proteínas é frequentemente regulada por associação com e/ou hidrólise de nucleotídeos. Normalmente, as HSP funcionam como oligômeros, se não como complexos de várias chaperonas, co-chaperonas e/ou fatores de troca de nucleotídeos diferentes. A interação com as chaperonas é responsável por manter as proteínas parceiras de HSP em um estado de dobramento competente, dobrado ou desdobrado; pela localização, importação e/ou exportação em organelas; minimizar a agregação de proteínas não nativas; e pelo direcionamento de proteínas não nativas ou agregadas para degradação e remoção da célula (FEDER; HOFMANN, 1999).

A indução de HSP beneficia os organismos aumentando sua capacidade de se recuperar do estresse ambiental e de lidar com o estresse subsequente (DAHLHOFF, 2004). Porém, nem todas as HSP são induzíveis por estresse, mas aquelas que o são respondem a uma variedade de estresses, incluindo temperaturas extremas, depleção de energia celular e concentrações extremas de íons, outros osmólitos, gases e várias substâncias tóxicas. A ativação de várias vias de sinalização intracelular resulta na expressão de HSP. Todos os estresses conhecidos, se suficientemente intensos, induzem a expressão de HSP. Conseqüentemente, HSP são igualmente denominadas proteínas de estresse, e sua expressão denominada resposta ao estresse. Um aspecto corriqueiro desses estresses indutores é que eles resultam em proteínas com conformações não

nativas, o que é consistente com a função de HSP como chaperonas moleculares (FEDER; HOFMANN, 1999).

Diferenças genéticas entre populações podem levar a diferenças na expressão de HSP entre diferentes genótipos que experimentam condições ambientais idênticas. Embora a maioria dos estudos esteja interessada em um estressor específico em seu organismo de estudo de interesse, a expressão de HSP é regulada positivamente em resposta a qualquer condição que desdobre a proteína (DAHLHOFF, 2004).

Os peixes também respondem no nível celular aos estressores. Essa resposta compreende um conjunto de alterações de proteínas que inclui o aumento da síntese de HSP. Vários estudos têm tentado estabelecer uma relação entre as respostas de estresse fisiológico e celular, mas existem aparentes inconsistências entre esses dois níveis de resposta. Assim, um peixe que apresente uma resposta fisiológica a um estressor pode não apresentar nenhuma alteração no perfil celular de HSP (IWAMA et al., 2004).

Os genes que codificam HSP são altamente conservados e ocorrem em todas as espécies em que foram procurados. Muitos desses genes e seus produtos podem ser atribuídos a famílias com base na homologia de sequência e no peso molecular típico: famílias HSP110, HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40, HSP10 e pequenas HSP. Em eucariotos, muitas famílias compreendem vários membros que diferem em sua capacidade de indução, localização intracelular e função (FEDER; HOFMANN, 1999).

Os mecanismos que regulam a expressão de genes de proteínas de choque térmico em peixes ainda não foram amplamente estudados, embora alguns trabalhos tenham sido iniciados nos genes *hsp70* (BASU et al., 2002). A indução de *hsp70* resulta principalmente da ligação de um fator de transcrição de choque térmico ativado a um elemento de choque térmico palindrômico (CNNGAANNTTCNNG) a montante dos genes *hsp* (BIENZ; PELHAM, 1987, MORIMOTO et al., 1992). Currie e Tufts (1997) sugeriram pela primeira vez que a HSP70 na truta-arco-íris *Oncorhynchus mykiss* é regulada principalmente no nível da transcrição. Posteriormente, Airaksinen et al. (1998) relataram que um fator semelhante ao HSF1 estava envolvido na indução de RNAm de *hsp70* em truta-arco-íris *O. mykiss*. Uma vez que a maioria dos genes *hsp* não contém íntrons, o RNAm é rapidamente traduzido em proteínas nascentes dentro de minutos da

exposição a um estressor (BASU et al., 2002). De acordo com Iwama et al. (2004), sequências genômicas para *hsp70* foram elucidadas em algumas espécies de peixes-ósseos, tais como a truta-arco-íris *O. mykiss*, medaka *Oryzias latipes*, zebrafish *Danio rerio*, baiacu *Fugu rubripes* e tilápia *Oreochromis mossambicus*.

A HSP70 é conhecida por auxiliar no dobramento de cadeias polipeptídicas nascentes, agindo como uma chaperona molecular, e mediar o reparo e degradação de proteínas alteradas ou desnaturadas. Ao contrário de outras proteínas de choque térmico, essas proteínas não têm função constitutiva conhecida e são induzidas apenas durante o estresse (BASU et al., 2002). No caso das HSP70, estas apresentam um importante papel na manutenção da viabilidade, uma vez que interagem diretamente com elementos da via apoptótica, inibindo a cascata de eventos que culminam com a morte celular (MAYER; BUKAU, 2005, HISHIYA; TAKAYAMA, 2008).

O cortisol também está relacionado à família de proteínas HSP (heat-shock proteins), proteínas que aumentam em diversos tecidos nos peixes em situações de estresse. Níveis elevados de cortisol em peixes podem diminuir o número de complexos de receptores celulares de glicocorticóides (GR). A HSP70 está ligada ao GR não ativado, e o GR neste estado media os efeitos fisiológicos do cortisol. Após o cortisol se ligar ao GR, a HSP70 é deslocada do complexo receptor maduro e esta molécula de HSP70 livre pode atuar por meio de um ciclo de *feedback* negativo para inibir a trimerização da HSP e a subsequente indução da HSP (BASU et al., 2001).

Em contraste com o cortisol, a adrenalina pode aumentar os níveis de proteína de choque térmico em peixes. Os hepatócitos de trutas-arco-íris *O. mykiss* expostos à adrenalina, com e sem estresse por calor, tinham níveis significativamente elevados de proteína HSP70. Essa resposta foi abolida quando as células foram expostas ao propranolol (bloqueador  $\beta$  adrenorreceptor; ACKERMAN et al., 2000).

Recentemente, foi demonstrado que outros hormônios afetam os níveis de proteína de choque térmico em peixes. Deane et al. (1999) observaram que a administração exógena de hormônio de crescimento e prolactina resultou na diminuição dos níveis de RNAm hepático de *hsp70* (42 e 54%, respectivamente) e proteína HSP70 (76 e 64%, respectivamente) em sargos *Sparus sarba*. Estudos subsequentes observaram que a sulpirida (um estimulante da prolactina) suprimiu a expressão de *hsp70* e a bromocriptina (um supressor de prolactina) induziu a

expressão de *hsp70* em sargos *Sparus sarba*, sugerindo que os níveis de prolactina circulantes mediam os níveis de HSP70 nesta espécie de peixe (DEANE et al., 2000). Coletivamente, esses dados fornecem uma indicação precoce de que há interações entre as proteínas de choque térmico e os processos fisiológicos mediados por hormônios, como a resposta do organismo ao estresse (cortisol e adrenalina), crescimento (hormônio do crescimento) e osmorregulação (prolactina e cortisol) (BASU et al., 2002).

Embora os papéis intracelulares das HSPs sejam conhecidos, a relevância à respeito da importância fisiológica das HSPs para a sobrevivência de peixes é relativamente pequeno. Poucos estudos mostram claramente o significado fisiológico das mudanças na concentração de HSP em várias células. Além disso, o grau de estressor imposto, em muitos casos, está além do que o animal encontraria na natureza (IWAMA et al., 1999). O aumento das HSPs vem sendo utilizado como indicador de estresse, embora ainda sejam escassos na literatura os valores de referência para que se utilize apropriadamente esse parâmetro para todas as espécies (IWAMA et al., 1999).

Pela infinidade de situações em que a HSP70 é expressa, sua presença deve ser avaliada levando-se em consideração ao agente estressor e a espécie em questão (IWAMA et al., 2004).

## 2.6. Dor em peixes – dogma científico

Nos peixes, a transmissão de estímulos ocorre pela ação das células de Merkel. Nestes animais, as células de Merkel são identificadas em diferentes níveis na epiderme, entre a camada de células basais até próximas da superfície, são células ovoides com 4-6  $\mu\text{m}$  de diâmetro, fixadas às células epiteliais vizinhas por desmossomos, com o citoplasma contendo grânulos específicos ou vesículas concentradas próximas das junções com as fibras nervosas aferentes (WHITEAR, 1989). Células de Merkel estão distribuídas por toda a extensão corpórea dos peixes, dos barbilhões às nadadeiras e no epitélio oral em diferentes espécies de peixes ósseos (ZACCONE et al., 1994).

Para os peixes, não há consentimento científico se estes animais realmente reagem conscientemente à percepção da dor. Em experimentos envolvendo eletrofisiologia, Sneddon et al. (2003a) demonstraram que trutas-arco-íris *O. mykiss*

possuíam grande quantidade de fibras A delta e nociceptores polimodais no crânio com propriedades fisiológicas similares àquelas descritas nos vertebrados terrestres. Sneddon et al. (2003b) relataram que trutas-arco-íris *O. mykiss* apresentaram sinais de medo e neofobia (aumento da frequência opercular e nado para longe do objeto) diante de um objeto novo em seu ambiente, mas redução dos sinais após a administração de morfina. Yue et al. (2004, 2008) demonstraram que os peixes têm memória, podem experimentar medo e podem tanto aprender a evitar estímulos intimidatórios quanto aprender sob estímulos positivos, levando à conclusão de que essas respostas em peixes não são apenas reflexas (BRAITHWAITE; BOULCOTT, 2007).

Em peixes cartilaginosos (tubarões, quimeras e raias), o conhecimento sobre a percepção de dor é pequeno e controverso. Os primeiros estudos relataram que diferentes espécies de raias (*Dasyatis sabina*, *Aetobatus narinari*, *Rhinoptera bonasus*, *Himantura sp.*, *Rhinobatus battilum*) apresentam poucos axônios amielínicos (fibras C) nas raízes dorsais e ventrais dos nervos espinhais ou nervos periféricos (COGGESHALL et al., 1978; SNOW et al., 1993). Leonard (1985) revelou a presença de mecanorreceptores de alto limiar em raias *D. sabina*, entretanto, Cameron et al. (1990) relataram a presença de diferentes neuropeptídeos (serotonina, substância P, somatostatina, calcitonina, neuropeptídeo Y, bombesina) nas lâminas e raízes dorsais e ventrais da medula espinhal das raias *Dasyatis fluviorum*, *A. narinari* e *Rhinobatis battilum*, e Snow et al. (1996) detectaram axônios positivos para encefalina na medula espinhal da raia *Himantura fai*.

A percepção da dor ocorre quando estímulos nocivos são transmitidos à medula espinhal e depois às áreas centrais do cérebro (LAMONT et al., 2000). Para tanto, os peixes apresentam uma organização das vias espinhais semelhante à observada nos mamíferos, incluindo os tratos espinotalâmico, espinomesencefálico, espinorreticular e espinolímbico (CHANDROO et al., 2004) e o trato trigêmeo. O cérebro dos peixes obedece a uma estrutura básica como a de todos os vertebrados, com a presença do telencéfalo, mesencéfalo, diencéfalo e tronco encefálico (STRIEDTER, 2005), incluindo a maioria das regiões envolvidas no processamento da dor. Embora não possuam um neocórtex, o telencéfalo dos teleósteos desenvolveu uma estrutura altamente diferenciada com uma capacidade altamente desenvolvida de processamento de informações sensoriais, estando intensamente interligado com outras regiões cerebrais como o mesencéfalo e o

diencefalo (RINK; WULLIMANN, 2004), mostrando atividade após estimulação nociva (DUNLOP; LAMING, 2005), e contendo estruturas que têm homologia com a amígdala mamífera (telencéfalo dorsomedial) e hipocampo (telencéfalo dorsolateral) (PORTAVELLA et al., 2002; PORTAVELLA et al., 2004). Embora não existam dados experimentais que demonstrem que a informação nociceptiva trafega por esses tratos, dados eletrofisiológicos mostram que peixes possuem grande quantidade de fibras A delta (rápida transmissão de impulsos) e nociceptores polimodais no crânio com propriedades fisiológicas semelhantes às descritas em outros vertebrados (SNEDDON et al., 2003a), demonstrando a presença de atividade, medida por meio de potenciais evocados, no telencéfalo (DUNLOP; LAMING, 2005; NORDGREEN et al., 2007), medula espinhal, cerebelo e teto óptico (DUNLOP; LAMMING, 2005) de peixes após estimulação cutânea nociva, sugerem que sinais nociceptivos periféricos chegam ao cérebro para serem processados.

Avessos à ideia de dor em peixes, Rose et al. (2014) e Key (2015) argumentaram que a extrapolação do sentido humano de dor nos animais não é possível, pois a sua experiência depende da consciência e, além disso, a percepção de dor e as respostas corporais à lesão são fenômenos separados. Desta forma, eles apresentam apenas a nocicepção pela ativação de receptores periféricos por estímulos nocivos na ausência de consciência, sendo então considerados como seres sencientes (KEY, 2015). Outro ponto defendido baseia-se na neuroanatomia: o cérebro dos peixes não apresenta regiões homólogas às regiões cerebrais responsáveis pela consciência de dor em mamíferos, como o mesocórtex e o neocórtex (ROSE et al., 2014; KEY, 2015).

Embora evidências de que os peixes sintam dor sejam encontradas na neuroanatomia e neurofisiologia, o comportamento é geralmente utilizado para discernir dor em outros animais. Quando se monitoram peixes para sinais clínicos de angústia (distress), algumas considerações incluem avaliações subjetivas de orientação corpórea e de nado, alimentação, se o peixe procura se esconder, e/ou posicionamento espacial (próximo do aerador ou aquecedor). Parâmetros adicionais são mais específicos e objetivos do ponto de vista médico veterinário, por exemplo, parâmetros de qualidade do meio ambiente, frequência cardíaca e opercular, letargia, nadadeiras fixas, escurecimento da pele, avaliações laboratoriais (por exemplo, hemograma e bioquímica sérica), e/ou achados do exame físico (WEBER, 2011).



Na medicina veterinária, muitas vezes é difícil distinguir dor de sofrimento; desta forma os objetivos terapêuticos devem ser o de controlar os dois, pois eles têm impacto um no outro, ou seja, dor e ansiedade estão diretamente relacionadas. Pelas terapias serem diferentes para dor e sofrimento, é importante reconhecer os dois estados. A dor envolve uma lesão, a consciência da lesão e alteração comportamental ou biológica em resposta ao prejuízo. O estresse ocorre quando o equilíbrio de um animal é alterado por fatores externos ou internos. O sofrimento ocorre quando um animal é incapaz de responder ao estresse. É um estado físico ou mental que resulta de medo, ansiedade ou dor. Agudamente, o sofrimento pode ser aliviado por tranquilizantes, mas o estresse crônico exige mudança ambiental ou comportamental. A ansiedade é uma apreensão do perigo que pode ser acompanhada pela inquietação (CARROLL, 1999).

A maior parte da controvérsia sobre a identificação de estresse, dor e/ou ansiedade/sofrimento em peixes está relacionada à falta de dados clínicos e compreensivos para a maioria das espécies. Uma das razões subjetivas para promover a medicação da dor em peixes é eliminar a anorexia. Inapetência ou anorexia é um achado habitual em peixes comprometidos, e pode ser uma complicação pós-anestesia, procedimentos diagnósticos e após cirurgias (WEBER, 2011).

### *2.7. Anestesia em peixes e controle de efeitos indesejáveis da dor*

A aplicação de anestesia deve induzir o relaxamento muscular (reflexos motores) e a estabilização autonômica (reflexos autonômicos). Além disso, deve causar analgesia (redução da dor e desconforto), deve induzir rapidamente nos peixes um estágio de inconsciência redução da taxa metabólica, do consumo de oxigênio e da excreção (ZAHL et al., 2012). Também deve manter o animal em estado de repouso e deve permitir uma rápida recuperação uma vez que o animal é retirado do anestésico, para causar o mínimo de esforço ou estresse, facilitando assim o manejo dos peixes (COYLE et al., 2004).

Os peixes são tipicamente anestesiados por imersão em um banho contendo uma concentração apropriada de agente anestésico (WEBER, 2011), que é absorvido pelas brânquias e entra rapidamente na corrente sanguínea. A droga inicialmente inibe o córtex cerebral (perda tátil), depois age nos gânglios da base e

no cerebelo (excitação) e finalmente na medula espinhal (anestesia) (COYLE et al., 2004), porém, o contato excessivo ou persistente com a droga pode causar penetração na medula, paralisia central vasomotora e possivelmente morte (LE et al., 2019).

Para a anestesia e analgesia, podem-se utilizar benzocaína; tricaína (MS222); anestésicos voláteis – halotano, isoflurano e sevoflurano; etorfano e acepromazina (MACHIN, 2001), além de extratos naturais e comerciais à base de eugenol (VIDAL et al., 2008). A anestesia de peixes é indicada para procedimentos como marcação, corte de nadadeiras, medição, extração de ovos, reconhecimento físico e manipulações de peixes perigosos, como piranhas e peixes-elétricos. Além disso, a anestesia deve ser empregada para abolir a dor em intervenções cirúrgicas, tais como enucleação, eliminação de parasitos ou excrescências cutâneas, etc. (DINIZ, 2006).

De acordo com Treves-Brown (2000), os estágios da anestesia em peixes são geralmente reconhecidos como:

- 1) Sedação leve: discreta perda de reatividade aos estímulos externos, equilíbrio normal;
- 2) Sedação profunda: perda total de reação aos estímulos externos exceto ao pressionamento forte, discreto aumento da frequência opercular, equilíbrio normal;
- 3) Perda parcial do equilíbrio: perda parcial do tônus muscular, natação errática, reação apenas a estímulos táteis e vibrações intensas/fortes;
- 4) Perda total do equilíbrio: perda total do tônus muscular e do equilíbrio, frequência opercular elevada (reduzida com alguns agentes anestésicos), reação apenas a estímulo doloroso profundo;
- 5) Perda de reatividade reflexa: perda total de reatividade, frequência opercular e cardíaca baixas;
- 6) Colapso medular: os movimentos operculares cessam imediatamente após a respiração ofegante, seguida de parada cardíaca.

O estágio 4 é adequado para a maioria dos propósitos da piscicultura e em laboratórios. Como na anestesia de mamíferos, o objetivo é induzi-lo o mais rápido possível para limitar o estresse, mas na prática não é possível induzir a anestesia

em peixes tão rapidamente quanto é alcançada com barbitúricos injetáveis em mamíferos. Quando um peixe é colocado em uma solução anestésica, há uma fase inicial de excitação seguida de natação errática; então o peixe fica inativo e desce para o fundo do tanque, repousado em decúbito lateral ou dorsal (TREVES-BROWN, 2000).

Deve-se atentar ao fato de que há uma diferença grande entre analgesia e tranquilização. Analgesia é a perda de sensibilidade à dor. Tranquilização é um estado de calma e tranquilidade. O paciente está acordado, em relaxamento muscular e indiferente ao ambiente e com pouca dor. A importância dessa distinção é que o desconforto menor, como no cateterismo intravenoso, pode ser realizado prontamente em um animal ansioso que teve o benefício da tranquilização. Embora pareça calmo, um animal tranquilizado pode, no entanto, não estar sem dor (CARROLL, 1999).

Após procedimentos que exponham os peixes a estímulos dolorosos, deve ser realizada a medicação analgésica. Nesta classe, os analgésicos mais indicados são os opioides, como o butorfanol (HARMS et al., 2005). Recentemente, foi indicado o uso de lidocaína como agente analgésico para peixes (CHATIGNY et al., 2018). No período pós-anestésico, os peixes devem ter seu comportamento avaliado (SNEDDON, 2015) durante as primeiras 48 e 72 horas, tempo sugerido por Harms et al. (2005) e Baker et al. (2013). Martins et al. (2019) trazem mais informações sobre o uso de analgésicos em diferentes espécies, com suas doses e efeitos observados.

A maior parte da controvérsia sobre a identificação de estresse, dor e/ou ansiedade/sofrimento em peixes está relacionada à falta de dados clínicos e compreensivos para a maioria das espécies. Uma das razões subjetivas para promover a medicação da dor em peixes é eliminar a anorexia. Inapetência ou anorexia é um achado corriqueiro em peixes comprometidos, e pode ser uma complicação pós-anestesia em procedimentos diagnósticos e após cirurgias (WEBER, 2011).

A avaliação de percepção de dor também pode ocorrer através da eletroencefalografia, procedimento que em peixes necessita da dissecação da calota craniana e posicionamento de eletrodos diretamente no encéfalo (SNEDDON et al., 2003a; BARBAS et al., 2021). Métodos alternativos também podem fornecer informações sobre as regiões cerebrais ativadas e sobre as respostas cardiorrespiratórias através da ressonância magnética funcional (MARK et al., 2002;

FLIK et al., 2006, VAN DER LINDEN et al., 2007) e da eletrocardiografia (UENO et al., 1986; LAI et al., 1990, LIU et al., 2016), respectivamente.

Assim, para garantir o bem-estar dos peixes sujeitos a procedimentos que possam infligir dor, são necessários agentes anestésicos em concentrações suficientes para bloquear as vias nociceptivas. Estudos mostraram que doses anestésicas de benzocaína, MS-222, metomidato e 2-fenoxietanol não bloqueiam completamente as respostas aos estímulos nociceptivos no bacalhau *Gadus morhua* (Z AHL et al., 2009) e no alabote-do-Atlântico *Hippoglossus hippoglossus* (Z AHL et al., 2011). Reações reflexas ao pinçamento da nadadeira caudal e capacidade de resposta a manejo foram mais efetivamente reduzidos em dois anestésicos, a tricaína metanossulfato (MS-222) e a benzocaína. Isso está provavelmente relacionado ao modo de ação, pois essas substâncias suprimem a transmissão do sinal tanto no sistema nervoso central quanto periférico (Z AHL et al., 2012).

As variações substanciais entre as espécies de peixes em relação à resposta aos agentes anestésicos podem ser o resultado de diferenças farmacocinéticas, geralmente descritas como o que o organismo faz com a droga e pelas diferenças farmacodinâmicas, geralmente descritas como o que a droga faz para o organismo. Tanto diferenças farmacocinéticas quanto farmacodinâmicas nos peixes podem ser influenciadas por fatores biológicos como idade, sexo, estágio de vida, peso corporal, taxa de crescimento, composição corporal, fisiológica, condição e estado de saúde, bem como fatores como temperatura da água, salinidade, pH e de oxigênio dissolvido (Z AHL et al., 2012).

## **2.8. Benzocaína na anestesia de peixes**

A benzocaína é um éster cristalino branco, inodoro e insípido de ácido p-aminobenzóico e etanol, e quimicamente semelhante ao MS-222. Por ser quase totalmente insolúvel em água (apenas 0,04% p/v), é necessário dissolvê-la em acetona ou etanol (ROSS; ROSS, 2008). A massa molar de benzocaína é 165,192 g.mol<sup>-1</sup> e densidade de 1,17 g.mL<sup>-1</sup> (KHAIR-UL-BARIYAH et al., 2020).

Na sua atividade anestésica, a benzocaína se liga aos canais de sódio, estabilizando a membrana neuronal. Isto causa a diminuição da permeabilidade para os íons de sódio; assim, a inibição da despolarização da membrana neuronal é

observada juntamente com o bloqueio da condução do impulso nervoso (KHAIR-UL-BARIYAH et al., 2020).

Seu uso na anestesia de peixes é estudado desde a década de 1970 com os primeiros resultados em trutas-arco-íris *O. mykiss* (WEDEMEYER, 1970, SOIVIO et al., 1977) e posteriormente em carpas-comuns *C. carpio* (DAWSON; GILDERHUS, 1979). Os primeiros testes revelaram que a diluição da benzocaína acidifica a água da solução anestésica pelo aumento do pCO<sub>2</sub>, além do aumento da condutividade elétrica, o que pode ser contornado com o uso de benzocaína tamponada (FERREIRA et al., 1979a).

Os exemplares de trutas-arco-íris *O. mykiss* que receberam *bolus* de 14C-benzocaína (20,8 µg.kg<sup>-1</sup>) através de canulação da aorta dorsal mostraram que, dentro de 1 minuto após a administração, os resíduos de benzocaína foram detectados na água efluente da câmara de exposição e por 3h, 59,2 % da dose foi detectada na água do efluente. A via de excreção renal contribuiu com 2,7 % da dose em 3h após a injeção e 9,0 % em 24h. A via biliar foi a menos dinâmica, com 2,0 % da dose encontrada na bile 24h após a injeção (MEINERTZ et al., 1991). Também é relatada a eliminação da benzocaína através da pele dos peixes (FERREIRA et al., 1984).

As brânquias são um local ideal para a eliminação desses compostos, uma vez que a benzocaína e acetilbenzocaína têm atributos que são propícios à difusão branquial, tais como o pequeno tamanho molecular, a solubilidade e neutralidade. O perfil de resíduos na urina consiste em pequenas quantidades de resíduos menos polares - benzocaína e acetilbenzocaína, e maiores quantidades de resíduos mais polares - ácido p-aminobenzóico e ácido acetil-p-aminobenzóico (MEINERTZ et al., 1999).

A farmacocinética da benzocaína em truta-arco-íris *O. mykiss* expostas ao banho a 1 mg.L<sup>-1</sup> em diferentes temperaturas revelou que o *clearance* de absorção e a depuração metabólica são diretamente proporcionais à temperatura da água, com o volume aparente de distribuição seguindo a mesma tendência. A meia-vida de eliminação da benzocaína no plasma é variável e não difere significativamente com a temperatura (STEHLY et al., 1998).

Estudos realizados com bagres-do-canal *Ictalurus punctatus* expostos a solução de 70 mg.L<sup>-1</sup> de benzocaína revelaram que a sua absorção é independente do fluxo de água pelas brânquias, uma vez que a benzocaína liga-se

moderadamente às proteínas plasmáticas – 54-60 % em salmonídeos anestesiados em solução de benzocaína entre 0,2 e 20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . A eliminação e o perfil metabólico são semelhantes aos encontrados nas trutas-arco-íris *O. mykiss*, com presença de resíduos após 10 dias em bagres-do-canal na ordem de classificação das concentrações: bile > fígado > rim verdadeiro > rim cefálico > pele = músculo vermelho > plasma > músculo branco (HAYTON et al., 1996).

Um dos efeitos colaterais semelhante em humanos e peixes que entram em contato com a benzocaína é a metahemoglobinemia. Ela foi detectada em crianças e em idosos que utilizaram sprays orais com benzocaína em concentração de 14-20 % (KHAIR-UL-BARIYAH et al., 2020), em bagres-do-canal *I. punctatus* anestesiados com MS-222 (HUEY; BEITINGER, 1982) e em salmonídeos anestesiados tanto com MS-222 quanto com benzocaína (SAUNDERS et al., 2020).

A benzocaína é eficaz aproximadamente nas mesmas concentrações que o MS-222, geralmente entre 25 e 50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , e é útil em espécies de água doce, marinhas e tropicais. Esta droga tem uma boa margem de segurança e sua eficácia não é afetada pela dureza ou pH da água. Em solução, a benzocaína é neutra, o que causa pouca hiperatividade e reação estressante inicial. Contudo, é solúvel em gordura e os tempos de recuperação podem ser prolongados em animais mais velhos ou após longa exposição (ROSS; ROSS, 2008).

Na anestesia das carpas-comuns *C. carpio* por imersão em solução anestésica, a concentração indicada de benzocaína é de 50 a 70  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (MOHAMED, 1999). Porém, para Coyle et al. (2004), não existe ainda uma concentração de benzocaína recomendada para carpas-comuns *C. carpio*. Para dirimir esta situação, Antunes et al. (2008) propuseram que a concentração ótima para anestesia tem relação com o peso e pode ser estimada pela equação: concentração =  $114,230 + 0,158 \times \text{peso}$  ( $r^2=0,53$ ), com o peso em gramas. Paralelamente, a benzocaína se mostra eficiente anestésico quando utilizado nas concentrações de 50 a 200  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  em diferentes espécies de ciprinídeos, tais como *Poecilia reticulata* (BOLASINA et al., 2017) e *Barbus grypus* (ÖĞRETMEN et al., 2016).

A benzocaína é o anestésico de escolha para a anestesia de peixes submetidos à intervenções cirúrgicas em pesquisas do Laboratório de Histofisiologia Evolutiva há mais de 20 anos. Em expedições à Estação Antártica Brasileira Comandante Ferraz, a benzocaína foi utilizada na anestesia de cabeça

*Notothenia coriiceps* na concentração de 50 mg.L<sup>-1</sup> em estudos sobre a resposta imunológica frente a parasitas (SILVA et al., 1999); atividade fagocítica macrófágica e formação de células gigantes (SILVA et al., 2002); em cicatrização de pele sob temperaturas antárticas (SILVA et al., 2004, 2005a); ação germicida de macrófagos (SILVA et al., 2005b) e angiogênese ocular (SILVA et al., 2012). Peixes tropicais também foram alvos de pesquisas que envolveram anestesia e cirurgia, tais como o curimatá *Prochilodus scrofa* anestesiado com solução de 50 mg.L<sup>-1</sup> (JENSCH-JUNIOR et al., 2005) e bagre-africano *Clarias gariepinus* em solução com 80 mg.L<sup>-1</sup> (GUERRA et al., 2008).

### 2.9. Eugenol na anestesia de peixes

O óleo de cravo é obtido pela destilação das flores, caules e folhas de *Syzygium aromaticum* (ou *Eugenia aromaticum*) ou *Eugenia caryophyllata*. É um líquido marrom escuro com odor aromático. Ele tem sido usado como anestésico tópico suave desde a antiguidade e sua eficácia como anestésico em odontologia é conhecida. O principal constituinte (70-90 % em peso) do óleo de cravo é o eugenol. Uma grande vantagem do óleo de cravo é ser relativamente barato e ter também poucos efeitos nocivos para os seres humanos em condições normais. Comercialmente, utilizam-se o óleo de cravo, o eugenol e o isoeugenol na anestesia de peixes (ROSS; ROSS, 2008).

A farmacocinética e farmacodinâmica do eugenol foram estudadas em trutas-arco-íris *O. mykiss* anestesiadas com concentração de 75 mg.L<sup>-1</sup>, nas quais relatou-se concentração sanguínea máxima de 10,53 µg.mL<sup>-1</sup> e meia-vida de 12,14h, com rápida diminuição de eugenol no sangue na primeira hora e concentrações abaixo de 10 µg.mL<sup>-1</sup> após cerca de 15 min (GUÉNETTE et al., 2007). Em alabote-japonês *Paralichthys olivaceus* anestesiados com eugenol em concentrações de 117,5 mg.L<sup>-1</sup>, os valores plasmáticos máximos registrados foram de 58,4 µg.mL<sup>-1</sup> (TAGO et al., 2017). Estudos espectrométricos em amostras da musculatura de carpas-comuns *C. carpio* expostas a solução de eugenol na concentração de 10 mg.L<sup>-1</sup> revelaram que este componente é eliminado do organismo dentro de 96h (LI et al., 2015).

Embora o mecanismo exato de ação de suas propriedades neuroprotetoras ainda esteja sob estudo, a pesquisa *in vitro* mostrou uma interação de eugenol com receptores vanilóides com potencial inibição da transmissão da dor, bloqueando este

receptor (YANG et al., 2003). Além disso, suspeita-se que o eugenol interage com neurotransmissores envolvidos na sensibilidade à dor, mostrando efeito agonista sobre o GABA e efeito antagonista sobre o glutamato (NMDA) (AOSHIMA; HAMAMOTO, 1999; YANG et al., 2003), uma vez que ambos desempenham um papel importante na transmissão da dor.

Os primeiros relatos de uso de eugenol na anestesia de carpas-comuns *Cyprinus carpio* mostraram que há relação inversa entre a concentração utilizada e a temperatura da água para os tempos de indução e recuperação. Além disso, a redução da frequência opercular é observada quando se atinge o estágio 4 da anestesia (perda de reflexos). As concentrações indicadas para eugenol estão entre 50-100 mg.L<sup>-1</sup> (HIKASA et al., 1986). No caso do isoeugenol, as concentrações entre 40-100 mg.L<sup>-1</sup> são indutoras de anestesia e indicadas para procedimentos não invasivos de tempo curto (GLADDEN et al., 2010).

Para outras espécies de peixes de água doce de interesse comercial, o eugenol é indicado para anestesia de *Pangasius hypophthalmus* em concentrações entre 40 e 200 mg.L<sup>-1</sup> (HOSEINI et al., 2015), 65 mg.L<sup>-1</sup> para tambaqui *Colossoma macropomum* (ROUBACH et al., 2005), 50 mg.L<sup>-1</sup> para pintado *Pseudoplatystoma corruscans* (VIDAL et al., 2006), 37,5 mg.L<sup>-1</sup> para piavuçu *Leporinus macrocephalus* (VIDAL et al., 2007a), 50 – 100 mg.L<sup>-1</sup> para matrinxã *Brycon cephalus* (VIDAL et al., 2007b), 75 mg.L<sup>-1</sup> para tilápia-do-Nilo *Oreochromis niloticus* (VIDAL et al., 2008) e 20 – 50 mg.L<sup>-1</sup> para jundiá *Rhamdia quelen* (CUNHA et al., 2010). Para espécies marinhas de interesse comercial como o robalo-flecha *Centropomus undecimalis*, a concentração de eugenol é de 50 mg.L<sup>-1</sup> (BERNARDES JUNIOR et al., 2013) e 60 mg.L<sup>-1</sup> para robalo-japonês *Lateolabrax maculatus* (HE et al., 2020).

Em espécies de aquariofilia são relatadas que, para o híbrido Flowerhorn (*Amphilophus labiatus* x *Amphilophus trimaculatus*), a concentração mínima de eugenol é de 50 mg.L<sup>-1</sup> (TARKHANI et al., 2017), 30 mg.L<sup>-1</sup> para peixes beta *Betta splendens* (PATTANASIRI et al., 2017) e de 16 – 53 mg.L<sup>-1</sup> para acará-bandeira *Pterophyllum scalare* (DE OLIVEIRA, 2018).

Efeitos colaterais são observados em esturjões *Acipenser baerii* anestesiados com eugenol, tais como aumento de volume de hemácias e hemólise, além da leucopenia grave (GOMULKA et al. 2008). Em enguias *Anguilla anguilla* foram observados aumento da contagem de hemácias, elevação do hematócrito e dos níveis glicêmicos (ALTUN et al., 2006).



Baldisserotto et al. (2017) não recomendam o eugenol como agente analgésico pós-exposição de zebrafish *Danio rerio* a estímulo nocivo. Além disso, Barbas et al. (2021) observaram que, em tambaquis *Colossoma macropomum*, o eugenol causou a imobilização corporal porém os peixes apresentaram intensa excitabilidade neuronal, falhando em promover depressão do sistema nervoso central, não sendo assim adequado para uso em anestesia geral. Os mesmos autores sugerem que protocolos em que se utilizem eugenol para anestesia de curta duração e na eutanásia sejam revisados.

### 2.10. Análise hematológica em carpas

Em peixes e em todos os outros vertebrados não mamíferos, as células da série vermelha são nucleadas, diferentemente das hemácias dos mamíferos, recebendo a denominação de eritrócitos. Outra diferença é a ausência de plaquetas, sendo sua atividade coagulativa realizada pelos trombócitos. Contudo, a semelhança cabe às células brancas também denominadas de leucócitos, com a presença ou ausência de grânulos intracitoplasmáticos (HRUBEC; SMITH, 2010).

A hematopoiese em peixes ocorre no rim cranial (pronéfrons) e no baço a partir da divisão e diferenciação de células tronco hematopoiéticas em células hematopoiéticas progenitoras. Nas carpas-comuns *Cyprinus carpio*, Kondera (2011) identificou no rim cranial células da linhagem eritroide, granuloide (neutrófilos, basófilos, eosinófilos), linfoide (linfócitos, plasmócitos), monocitoide (monócitos) e trombocítica. Em relação aos resultados para as contagens das células sanguíneas da carpa-comum *C. carpio*, Witeska et al. (2016) traz uma questão pertinente à pesquisa do sangue de peixes: as diferenças nos valores encontrados entre carpas-comuns mantidas em condições laboratoriais controladas e a média dos valores encontrados na literatura para carpas-comuns mantidas em sistemas de criação.

No geral, os eritrócitos de peixes são células nucleadas elipsoides de diferentes tamanhos (102 a 800 fL) e tempo de vida (13 a 500 dias). A contagem de eritrócitos depende da atividade dos peixes, da temperatura da água e da concentração de oxigênio dissolvido, bem como de outros fatores ambientais e mostra considerável variabilidade sazonal. Também depende da idade, sexo, estado nutricional e reprodutivo, e pode diferir entre várias populações da mesma espécie. Geralmente o número de eritrócitos varia de 0,5 a  $1,5 \times 10^6 \cdot \mu\text{L}^{-1}$  em espécies menos

ativas até  $3,0$  a  $4,2 \times 10^6 \cdot \mu\text{L}^{-1}$  nas espécies mais ativas (WITESKA, 2013). O número de eritrócitos no sangue de carpas-koi *C. carpio* varia entre  $0,4 \pm 0,1 \times 10^6 \cdot \mu\text{L}^{-1}$  a  $3,10 \pm 1,00 \times 10^6 \cdot \mu\text{L}^{-1}$  (KHANI et al., 2017; SCHNEIDER et al., 2021) uma vez que a contagem eritrocitária também pode sofrer variabilidade sazonal mesmo em peixes mantidos em condições experimentais (WITESKA et al., 2016).

Os leucócitos de carpas-comuns *Cyprinus carpio* são encontrados na corrente sanguínea tanto em suas formas blásticas quanto em suas formas adultas, tais como neutrófilos, basófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos (WOJTASZEK et al., 2002), podendo variar em tipo e tamanho (KUMAR, 2016). Eles podem ser ainda classificados por tamanho (IMAGAWA et al., 1989) e pela segmentação do núcleo (VELISEK et al., 2005). Em condições experimentais, a contagem de leucócitos totais no sangue de carpas-koi *C. carpio* varia entre  $5,3$  e  $28,1 \times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$  (TRIPATHI et al., 2004; SCHNEIDER et al., 2021). Para a contagem diferencial de leucócitos, a população de linfócitos está no intervalo de  $17,6$  a  $38 \times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , neutrófilos entre  $2,44$  e  $55 \times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , monócitos entre  $0,66$  e  $2,67 \times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$  e basófilos entre  $1,05$  e  $3,0 \times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$  (KHANI et al., 2016, TRIPATHI et al., 2004). De acordo com Witeska et al. (2022), a contagem de eosinófilos em peixes é baixa, representando até 1,8% dos leucócitos totais. Mas em carpas-koi mantidas em tanques, Schneider et al. (2021) encontraram eosinófilos na concentração de  $0,47 \pm 0,15 \times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ . Ademais, os trombócitos apresentam valores registrados para carpas-koi de  $0,33 \pm 0,57 \times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$  (KHANI et al., 2016) a até  $11,2 \pm 5,9 \times 10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$  (SCHNEIDER et al., 2021).

As análises hematimétricas realizadas com o sangue de peixes não diferem das do sangue de mamíferos, podendo ser obtidos os valores para hematócrito, concentração de hemoglobina, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média e concentração de hemoglobina corpuscular média.

O hematócrito (Ht) é a medida do conteúdo de eritrócitos como porcentagem de células em um volume de sangue (WITESKA et al., 2016). Em carpas-koi *C. carpio* o intervalo de hematócrito descrito está entre 30–40 % (TRIPATHI et al., 2004; RADU et al., 2009).

A medição da concentração de hemoglobina (Hb) no sangue de peixe é realizada rotineiramente usando o método espectrofotométrico da cianometemoglobina. Envolve a mistura de todo o sangue com o reagente de Drabkin para converter a hemoglobina do sangue em metahemoglobina estável e sua leitura próxima à sua extinção no comprimento de onda de 540 nm. A

concentração de hemoglobina pode ser calculada com base na relação entre as soluções de hemoglobina padrão e amostras de sangue no ponto de extinção (WITESKA et al., 2022). Os valores encontrados na literatura para hemoglobina em eritrócitos de carpas-koi *C. carpio* variam entre 5,77 e 8,2 g.dL<sup>-1</sup> (GROFF; ZINKL, 1999; KHANI et al., 2016).

A análise hematológica também inclui a análise de índices eritrocitários adicionais que descrevem a morfologia e as propriedades dos eritrócitos, tais como volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). Em suma, os valores médios registrados na literatura para carpas-koi *C. carpio* são VCM: de 178,2 a 202 fL, HCM: 31,8 a 49,1 pg, e CHCM 21,6 ± 3,3 g.dL<sup>-1</sup> (GROFF; ZINKL, 1999; RADU et al., 2009).

Contatos efêmeros de peixes com drogas anestésicas causam pequenas flutuações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos (FERREIRA et al., 1981; VELISEK et al., 2005), ocorrendo diferença estatística 24 horas após o contato com o agente anestésico (VELISEK; SVOBODOVÁ, 2004; VELISEK et al., 2009). Porém, o uso dos anestésicos 2-fenoxietanol e etomidato em carpas-comuns *Cyprinus carpio* causa alterações nos parâmetros hematológicos após 1 hora da anestesia e que são detectáveis após 24 horas (VELISEK; SVOBODOVA, 2004) e após uma semana da anestesia (WITESKA et al., 2014).

Outro fator também analisado no sangue é a glicemia plasmática, que pode ser determinada por método bioquímico colorimétrico ou utilizando-se glicosímetro portátil. Gomes et al. (2017) observaram que as determinações da glicemia plasmática de carpas-koi *C. carpio* utilizando-se os respectivos métodos apresentam alta correlação entre si ( $r=0,875$ ) sendo então utilizado na pesquisa (CROSBY et al., 2010). Assim, para carpas-koi *C. carpio* não anestesiadas são registrados os níveis plasmáticos de glicose no intervalo de 30 – 47 mg.dL<sup>-1</sup> (GROFF; ZINKL, 1999; CROSBY et al., 2010), anestesiadas com MS-222 no intervalo de 20 – 126 mg.dL<sup>-1</sup> (HARMS et al., 2005; PALMEIRO et al., 2007) e com eugenol nos intervalos de 16 – 79 mg.dL<sup>-1</sup> (glicosímetro portátil) e 29 – 93 mg.dL<sup>-1</sup> (leitura colorimétrica) (GOMES et al., 2017). Para carpas-comuns *C. carpio* são registrados os valores de glicemia com o sangue coletado sem anestesia nos valores médios de 52,94 ± 7,21 mg.dL<sup>-1</sup> (FERREIRA et al., 1981) e no intervalo de 59 – 75 mg.dL<sup>-1</sup> quando anestesiadas com 2-fenoxietanol (POTTINGER, 1998).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. *Objetivo principal*

Determinar ferramentas para verificar se ocorre a percepção de dor em carpas-koi *Cyprinus carpio* através do registro das suas respostas fisiológicas e sinalização molecular de dor.

#### 3.2. *Objetivos específicos*

- Utilizar protocolos anestésicos à base de benzocaína e eugenol frequentemente utilizados para anestésiar carpas-koi com dois anestésicos com pressupostas ações no Sistema Nervoso Central;
- Procurar caracterizar a percepção de dor a partir de um estímulo nociceptivo;
- Mensurar o batimento opercular e frequência cardíaca antes e após o estímulo nociceptivo;
- Avaliar parâmetros hematológicos para determinar o hemograma de estresse nesta espécie;
- Detectar as células de Merkel na pele das carpas-koi;
- Determinar os níveis plasmáticos de cortisol e a expressão do gene *hsp70* nas células sanguíneas após o estímulo nociceptivo;

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Local de experimentação e manutenção dos animais

O Biotério de Animais Aquáticos do ICB-1 foi utilizado para manutenção das carpas-koi *C. carpio* utilizadas neste projeto.

O projeto foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do ICB, código 5420020819.

Um tanque redondo com capacidade para 500L de água foi higienizado com hipoclorito de sódio puro comercial e lavado abundantemente dois dias seguidos, para se evitar resquícios deste produto. Este foi então completado com aproximadamente 300L e a água foi dechlorada pela adição de tiosulfato de sódio ao redor de  $0,01 \text{ g.L}^{-1}$  de água e uso de arejadores ligados a pedras porosas. O filtro biológico foi preparado utilizando-se seixos de rio, os quais foram colonizados por bactérias probióticas “inicializadoras” (Nite-Out II, Ecological Laboratories Inc., Cape Coral/FL, Estados Unidos) e que, posteriormente, recebeu bactérias probióticas “estabilizadoras” (*Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus acidophilus*) e prebióticos (metionina, lisina, vitamina C, vitamina E, colina, mananoligossacarídeo e dextrose) (DB Aqua, Imeve, Jaboticabal/SP, Brasil), seguindo-se as especificações dos fabricantes. Para circulação da água entre o filtro biológico e o tanque foi utilizada uma bomba submersa de  $2.500 \text{ L.h}^{-1}$  acoplada a um filtro mecânico, auxiliando a retirada de material orgânico do fundo do tanque.

Vazio sanitário de sete dias foi respeitado entre o preparo do tanque e a recepção das carpas-koi *C. carpio*.

Cinquenta e seis carpas-koi *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758) juvenis do sexo feminino com peso de  $27,20 \pm 9,63 \text{ g}$  (média  $\pm$  desvio padrão) foram adquiridas da Piscicultura Dinamarca LTDA, São Paulo/SP (CNPJ 05.924.760/0001-09). Estas foram transportadas e entregues em duas caixas de papelão contendo sacos plásticos de 60 L preenchidos com água em 1/3 do volume e oxigênio hospitalar em 2/3 de seu volume. Também foi adquirido um saco de ração de 25 kg para peixes onívoros (Ração Peixe Juvenil 360-AM, AMICIL S/A, Guarulhos/SP, Brasil) com níveis mínimos de 36 % de proteína bruta e energia bruta de  $3000 \text{ kcal.kg}^{-1}$ .

As carpas-koi *C. carpio* foram alimentadas uma vez ao dia até a saciedade aparente, sendo retirados os grãos de ração não consumidos. Durante a aclimação, os parâmetros físicos e químicos da água foram determinados diariamente utilizando-se kits de testes rápidos para pH, concentrações de amônia total e amônia tóxica, nitrito e oxigênio dissolvido (Alcon Pet, Camboriú/SC, Brasil), além do valor da temperatura da água aferida em termômetro de vidro para aquários. Os valores de amônia tóxica para diferentes temperaturas e pH foram corrigidos utilizando-se valores ajustados por Emerson et al. (1975).

Diante de níveis tóxicos de amônia e nitrito houve trocas parciais da água do tanque até a redução e estabilização dos seus níveis, indicando colonização e atividade das bactérias desnitrificantes do filtro biológico. A retirada de material orgânico foi realizada por sifonagem do fundo do tanque e lavagem do filtro biológico apenas em água corrente a cada dois dias.

#### *4.2. Análise bromatológica da ração*

A análise bromatológica da ração utilizada para alimentação das carpas-koi deste experimento foi realizada com a colaboração do Laboratório Multiusuário de Nutrição Animal e Bromatologia (MultiNutri) e do Laboratório de Nutrição de Monogástricos do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP - Campus Pirassununga/SP.

No Laboratório de Bromatologia foram realizadas as análises de rotina do método de Weende, as quais fornecem informações sobre a composição química da ração. Os fatores analisados foram matéria seca a 105 °C, proteína bruta, amido, extrato etéreo (gorduras) e matéria mineral, bem como a determinação das porcentagens dos macrominerais cálcio e fósforo. No Laboratório de Nutrição de Monogástricos foi utilizado um calorímetro (C 5003, IKA – Werke, Alemanha) para análise da energia bruta da ração.

A metodologia empregada nas análises está de acordo com os métodos aprovados pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1995).

#### 4.3. Análise de microminerais na ração

A análise de microminerais na ração foi realizada no Centro do Reator de Pesquisas (IEA.R1) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN) utilizando análise multielementar por ativação neutrônica, que se baseia na interação de um dado material com nêutrons, seguida da medição da radioatividade induzida (ARMELIN, 2022). Estas análises visam a determinação das concentrações de microminerais na ração e, a partir disto, eliminar qualquer interferência de seus excessos em eventos fisiológicos nos peixes.

#### 4.4. Anestesia das carpas e coleta de material

As carpas-koi *C. carpio* foram divididas ao acaso em sete grupos compostos por oito animais cada. Estas foram transportadas em baldes de 20 litros com arejadores a bateria ao Laboratório de Histofisiologia Evolutiva, ICB-1.

Em uma caixa plástica com tampa de grade de aço inox (caixa de criação de camundongos) foram adicionados quatro litros de água e posteriormente o anestésico a ser testado. Para a anestesia inalatória das carpas-koi *C. carpio* foram preparadas soluções anestésicas à base de benzocaína (Benzocaine, *Sigma-Aldrich*, Saint Louis/MO, Estados Unidos) nas concentrações de 70, 100 e 130 mg.L<sup>-1</sup> (MOHAMED, 1999; ANTUNES et al., 2008) – grupos B70, B100 e B130, e de eugenol (Eugenol, Biodinâmica, Iporã/PR, Brasil) de 20, 40 e 60 mg.L<sup>-1</sup> – grupos E20, E40 e E60 (HIKASA et al., 1986). Antes da adição direta à água, foram dissolvidos em 1:5 em etanol 100 % para melhor dissolução (VIDAL et al., 2008). Uma segunda caixa, também com quatro litros, foi mantida próxima para avaliação da recuperação das carpas-koi *C. carpio* após anestesia com arejamento constante. As carpas-koi *C. carpio* do grupo controle não foram anestesiadas, mas apenas manipuladas para se verificar se as alterações são decorrentes do estresse ou da dor.

Cada grupo de animais foi testado nas respectivas soluções anestésicas, mantidas a 19-20 °C, e os tempos de indução de cada carpa-koi *C. carpio* foram aferidos. Atingido o plano de anestesia profunda, caracterizado por perda total do tônus muscular, perda total de equilíbrio e ventilação quase ausente (ROSS; ROSS, 2008), as carpas-koi *C. carpio* foram retiradas da solução anestésica e posicionadas

sobre a tampa gradeada. Foi inserido via oral uma cânula ligada a uma bomba submersa na solução anestésica, com vazão de 300 L.h<sup>-1</sup>, para a oxigenação das brânquias e manutenção da anestesia das carpas-koi *C. carpio*. A avaliação visual da frequência respiratória foi realizada pela contagem do batimento opercular em um minuto, e a frequência cardíaca com o auxílio de um Doppler vascular (Doppler Vascular DV610, MedMega Indústria de Equipamentos Médicos, Franca/SP, Brasil).

Para apreensão da nadadeira caudal, uma pinça dente de rato foi posicionada ventrocranialmente entre a nadadeira caudal e a cloaca, com extensão de 1 centímetro sobre os flancos e formando um ângulo de 45 graus entre a pinça e a nadadeira caudal de cada carpa-koi *C. carpio*. A pinça foi acionada com máxima intensidade por um minuto. Após o estímulo nociceptivo, foram novamente aferidos a frequência respiratória e cardíaca.

Na coleta de sangue, cada carpa-koi *C. carpio* foi posicionada em decúbito lateral e realizou-se a punção dos vasos dorsais localizados na região ventral à coluna vertebral próximos da nadadeira caudal. Foi utilizada agulha hipodérmica de 13 x 0,38 mm (27,5G x 1,2mm) acoplada a seringas de 1 mL, ambas previamente revestidas internamente com EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético, LGC Biotecnologia, Cotia/SP, Brasil) a 3 % diluído em solução salina de NaCl a 0,65 % para coleta de sangue total. Uma segunda seringa também revestida com EDTA foi utilizada na coleta de sangue para aquisição do plasma sanguíneo. Ao redor de 100 µL foram coletados em cada seringa por animal.

Finalmente, as carpas-koi *C. carpio* foram pesadas e realocadas para uma caixa de recuperação com oxigenação constante e o tempo foi mensurado. A analgesia pós-estímulo doloroso foi realizada com a administração de 0,15 mL de lidocaína (Lidocaína 1 %, Eurofarma Laboratórios, Itapevi/SP, Brasil) via intramuscular na concentração de 5 mg.mL<sup>-1</sup> (CHATIGNY et al., 2018). As carpas-koi *C. carpio* foram devolvidas para aquários de 50 litros e foram avaliadas por 48-72 horas a fim de observações de sinais e comportamentos que futuramente justifiquem a contra indicação das doses utilizadas.

Após 72 horas, as carpas-koi *C. carpio* foram sacrificadas em solução de benzocaína em concentração de 250 mg.L<sup>-1</sup>. Uma amostra de pele com aproximadamente 1 cm x 1cm x 0,5 cm foi retirada da pele da face lateral de cada carpa-koi *C. carpio* e metade foi fixada em solução de paraformaldeído a 4 % e metade em nitrogênio líquido. As carcaças foram armazenadas em sacos plásticos



brancos, congelados em freezer e então destinados ao descarte de amostras biológicas do ICB/USP.

#### 4.5. Análise hematológica

A amostra de sangue total foi utilizada nas determinações da glicemia sérica, hematócrito, confecção de extensões sanguíneas e amostras para congelamento em nitrogênio líquido. A glicemia foi determinada utilizando-se o monitor de glicemia *Accu-Chek Active* (Roche, Mannheim, Alemanha) com tiras descartáveis (lote 26007531) (CROSBY et al., 2010). Para o hematócrito foram utilizados tubos capilares de vidro já heparinizados para microhematócrito, que foram selados em uma das extremidades com massa de modelar e centrifugados a 3.000 RPM em centrífuga para microhematócrito Microcentrífuga MH SISLAB (SISLAB Ltda., São Paulo/SP, Brasil) por 1-2 minutos e posteriormente lidos (resultado em porcentagem de células). Pequenas gotas de sangue foram adicionadas em lâminas de vidro para a confecção das extensões sanguíneas, que foram secas e armazenadas a -20 °C. Dois microlitros de sangue foram ainda diluídos em 398 µL de solução salina NaCl a 0,65 % para contagem total de células sanguíneas em câmara de *Neubauer* ao microscópio óptico em aumento de 400X. A determinação das concentrações de hemoglobina foi realizada através do método de cianometá-hemoglobina: 10 µL de sangue foram diluídos em 2,5 mL de solução de ferrocianeto de potássio a 0,6 mM (líquido de Drabkin) (Kit Hemoglobina, Labtest Diagnósticos S/A, Lagoa Santa/MG, Brasil) e homogeneizado. Após 10 minutos a intensidade de cor de cada amostra foi lida em espectrofotômetro (*Biophotometer Eppendorf v.1.35, Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha*) com comprimento de onda de 540 nm (DRABKIN; AUSTIN, 1935). Os cálculos da concentração de cada amostra levou em conta a concentração de hemoglobina em amostra padrão na concentração de 10 g.dL<sup>-1</sup> (Padrão de hemoglobina, Labtest Diagnósticos S/A, Lagoa Santa/MG, Brasil). O restante do sangue total foi acondicionado em tubo criogênico, que foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado em *freezer ultralow temperature* a -80 °C para análise do gene *hsp70* por PCR.

As amostras de sangue coletadas com anticoagulante foram centrifugadas (centrífuga Universal 32R, *Andreas Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen, Alemanha*) a 3000 RPM por 3 minutos a 4 °C para aquisição do plasma sanguíneo. Após a

centrifugação, o plasma de cada amostra (50 µL) foi recolhido e acondicionado em microtubos, os quais foram armazenados a -20 °C para determinação dos níveis de cortisol utilizando-se testes ELISA.

As extensões sanguíneas foram coradas em kit panótico (Kit Panótico, Laborclin Produtos para Laboratórios, Pinhais/PR, Brasil) para contagem diferencial de leucócitos, utilizando-se óleo de imersão diretamente sobre a lâmina e objetiva de 100x. Para tal, foi contado o total de leucócitos observados entre 1000 eritrócitos, realizando-se a diferenciação entre linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos.

Desta forma foram realizados os cálculos do total de eritrócitos pela multiplicação do total de células contadas na câmara de *Neubauer* por 10.000 (nº de células/µL) e regras de três simples para a determinação da concentração de cada tipo de leucócito por microlitro de sangue. Os dados do hematócrito, da hemoglobina e número de eritrócitos foram utilizados para o cálculo dos valores hematimétricos de volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média e concentração de hemoglobina corpuscular média de acordo com a técnica descrita por Tripathi et al. (2004) e Witeska et al. (2022).

O volume corpuscular médio (VCM) foi calculado pela seguinte fórmula:

$$VCM = 10 \times \frac{Ht}{RBC}$$

em que Ht representa o valor de hematócrito e RBC a contagem total de eritrócitos.

A hemoglobina corpuscular média (HCM) foi calculada pela seguinte fórmula:

$$HCM = \frac{Hb}{RBC}$$

em que Hb representa o valor de hemoglobina e e RBC a contagem total de eritrócitos.

Por fim, a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foi calculada pela seguinte fórmula:

$$CHCM = 100 \times \frac{Hb}{Ht}$$

em que Hb representa o valor de hemoglobina e Ht o valor do hematócrito.

#### 4.6. Histologia da pele

Para inclusão do material coletado em paraformaldeído a 4 % em tampão fosfato, as amostras de pele foram desidratadas em soluções de etanol com concentrações crescentes, sendo metade das amostras diafanizadas em xilol e incluídas em paraplast e metade seguiu para inclusão em historesina (*Leica HistoResin, Leica Instruments GmbH, Heidelberg, Alemanha*). Os blocos foram seccionados e cortes com espessura de 3  $\mu\text{m}$  em historesina e 5-7  $\mu\text{m}$  em paraplast foram recolhidos em lâminas de vidro. As descrições histológicas foram realizadas com o auxílio das colorações hematoxilina e eosina, picrossirius (JUNQUEIRA et al., 1979), azul de toluidina, método de von Kossa para cálcio e ácido periódico de Schiff. As lâminas foram descritas utilizando-se microscopia de luz em aumentos de 100x, 200x e 400x.

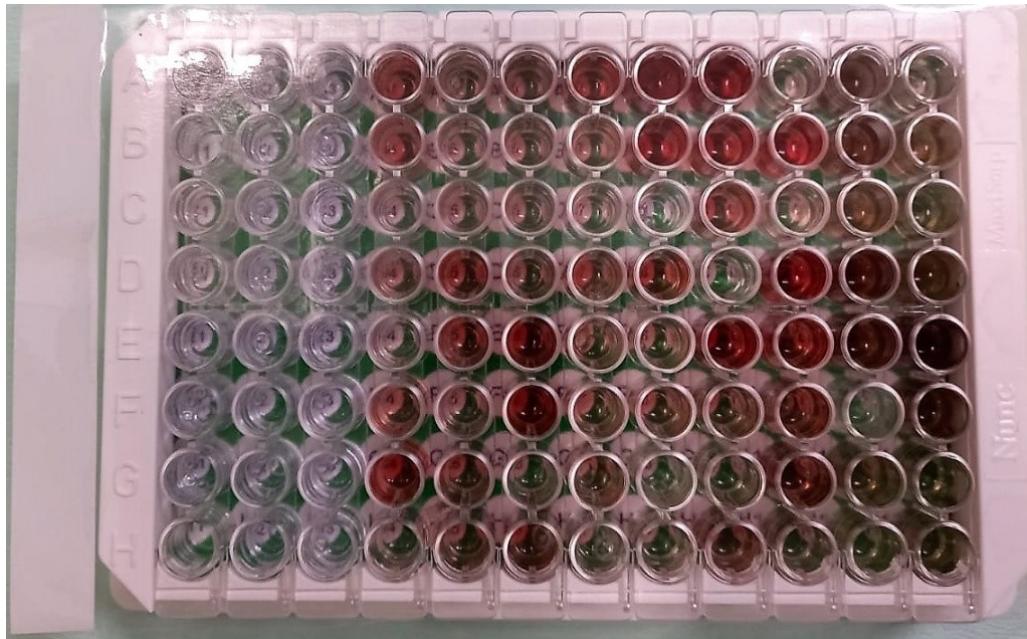
A impregnação argêntica argirofílica foi realizada seguindo-se a técnica descrita por Grimelius (2004) e com positividade para células de Merkel descrita por Ramírez e de los Monteros (2019). Para tal, a solução para impregnação por prata foi preparada com 70 mg de nitrato de prata dissolvido em 100 mL de tampão acetato de Walport pH 5,6 diluído 1:10. O tampão acético de Walport foi preparado com 48 mL de ácido acético a 0,2 mol.L<sup>-1</sup> (1,14 mL de ácido acético glacial diluído em 98,86 mL de água destilada) adicionados a 452 mL de acetato de sódio a 0,2 mol.L<sup>-1</sup> em água destilada, sendo o pH da solução final igual a 5,6 aferido em pHmetro Hanna HI 2221 (*Hanna Instruments Inc., Woonsocket/RI, Estados Unidos*). As lâminas foram mergulhadas na solução de impregnação e mantidas em estufa a 60 °C por 5 horas. Após isto foram reveladas em solução de hidroquinona (Hidroquinona, HenriFarma, São Paulo/SP, Brasil) a 2 % em água destilada por 5 minutos, lavadas em água corrente por 10 minutos e montadas seguindo-se os protocolos padrão tanto para historesina quanto parafina.

#### 4.7. Quantificação de cortisol plasmático

Os níveis plasmáticos de cortisol foram determinados utilizando-se o kit Cortisol ELISA Kit (Cayman Chemical, USA # 500360), respeitando-se as instruções do fabricante. A placa foi avaliada por leitura no espectrofotômetro SpectraMax<sup>®</sup> 190 (Molecular Devices, USA) sob luz em comprimento de onda de 405 nm, temperatura

de 20 °C (mesma da água da solução anestésica) após 120 min de revelação (Figura 1). O programa utilizado para aquisição dos resultados foi o Soft Max Pro 4.8 em que as concentrações foram adquiridas em  $\text{ng.mL}^{-1}$ .

Esta análise foi realizada no Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan, São Paulo/SP, de responsabilidade do Prof. Dr. Marcelo Santoro.



**Figura 1** - Placa de ELISA para quantificação de cortisol plasmático após a revelação por 120 min com reagente de Ellman à 4 °C.

#### 4.8. Extração de RNA de células sanguíneas

A extração de RNA foi realizada em células sanguíneas de quatro carpas-koi *C. carpio* de cada grupo, as quais foram coletadas em seringas e acondicionadas em tubos preparados com solução anticoagulante contendo 3 % de EDTA dissolvido em solução de NaCl a 0,65 % e armazenadas a -80 °C.

Anterior a qualquer passo do protocolo, todo o fluxo laminar foi esterilizado com lâmpada ultravioleta por 15 minutos e posteriormente higienizado com RNase Away (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA).

Para tal, as amostras foram descongeladas em ambiente refrigerado (caixa de isopor com gelo picado) e centrifugadas por 5 min, 12.000 x *g* à 4 °C. Após desprezar o sobrenadante, foram adicionados 300  $\mu\text{L}$  de trizol (Trizol Reagent,

Ambion, Thermo Fisher, USA) por 5 min. Com a complexação das proteínas, foram adicionados 60 µL de clorofórmio e as amostras foram incubadas por 3 min. Para a separação das fases, os tubos foram novamente centrifugados por 15 min, 12.000 x *g* à 4 °C e o sobrenadante foi coletado em um novo tubo com adição de 150 µL de isopropanol gelado e incubado por 10 min. Seguiu-se à centrifugação por 10 min, 12.000 x *g* à 4 °C com descarte de sobrenadante e adição de 300 µL de etanol 75 % para resuspensão do pellet formado. A centrifugação final para aquisição de RNA foi realizada por 15 min, 7.500 x *g* à 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi seco à temperatura ambiente por 5-10 min, com resuspensão final em 20-50 µL de água DEPC.

O RNA extraído de cada amostra foi purificado utilizando-se kit comercial (PureLink<sup>®</sup> RNA Mini Kit, Life Technologies, USA) seguindo-se as instruções do produto. Para tal, o RNA foi diluído em etanol a 70% e 700 µL desta solução foi transferida para a coluna de separação já encaixada ao tubo coletor. Estes foram centrifugados a 12.000 x *g* por 15 segundos à temperatura ambiente. Esta passagem foi repetida até que todo o volume de RNA foi centrifugado. Ao final, foi adicionado 700 µL de tampão de lavagem à coluna de separação. A coluna de separação encaixada ao tubo coletor foi centrifugada a 12.000 x *g* por 15 segundos à temperatura ambiente. Todo o lavado inicial foi descartado, e um novo tubo coletor foi encaixado à coluna de separação, à qual foi adicionado 500 µL de tampão de lavagem com etanol. Este conjunto foi centrifugado a 12.000 x *g* por 15 segundos à temperatura ambiente. O lavado foi novamente descartado e a coluna foi centrifugada a 12.000 x *g* por 1-2 minutos para secar a membrana com o RNA. O tubo coletor foi descartado e um tubo de recuperação de RNA (tubo RNase free) foi encaixado à coluna, à qual foi adicionada entre 30-100 µL de água RNA-free com posterior incubação por 1 minuto. Ao final, o conjunto foi centrifugado a 12.000 x *g* por 2 minutos à temperatura ambiente para eluição do RNA da membrana para dentro do tubo de recuperação. Os tubos de recuperação foram armazenados a -80 °C para a confecção do DNA complementar (cDNA).

Para a quantificação, foram utilizadas alíquotas de 3 µL do RNA purificado avaliadas em duplicata em um espectrofotômetro de microplacas (EPOCH, Agilent, USA), a fim de se determinar a concentração de RNA (ng/µL) e eficiência das extrações (relação A260/A280), obtidas utilizando-se o software Gen5 (Agilent, USA).

#### 4.9. Confeção de cDNA

Para a confecção de cDNA foi utilizado o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, USA), conforme instruções do fabricante. A partir da concentração de RNA extraído, foi calculado o volume da alíquota necessário para conter 2 µg de RNA e, conseqüentemente a quantidade de água ultrapura suficiente para um volume final de 10 µL.

Nas reações, a alíquota com 2 µg de RNA de cada amostra foi diluída com o volume necessário para 10 µL e foram adicionados 10 µL de 2x RT Master Mix (10x RT buffer, 25x dNTP Mix, 10x RT Random Primers, MultiScribe Reverse Transcriptase) e 1 µL de RNase Inhibitor (Applied Biosystems, Thermo Fisher, USA) em cada eppendorf. Estes foram levemente centrifugados para eliminação de bolhas de ar e então foram acondicionadas no termociclador (Veriti™ 96 well Thermal Cycler, Thermo Fisher, USA). O ciclo utilizado para carpas foi o seguinte: 25 °C por 10 min; 37 °C por 120 min; 85 °C por 5 min; 4°C até a retirada dos tubos. Os tubos eppendorfs foram armazenados a -80 °C para posterior análise da expressão dos genes.

#### 4.10. RT-qPCR de *hsp70* e *rpl10a* nas células sanguíneas de carpas *koi*

O *primer* para *hsp70* foi baseado no trabalho de Khosravi-Katuli et al. (2018) e o *primer* para o gene endógeno *rpl10a* que codifica a proteína L10 ribossomal (WILSON; NIERHAUS, 2005) foi desenhado a partir da sequência gênica depositada no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) (Quadro 1) utilizando-se o programa Primer-BLAST, disponível no endereço eletrônico do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Com testes de eficiência dos *primers* em *pools* de cDNA, foi determinado que a concentração ideal dos *primers* para o qPCR é de 400 nM para o *hsp70* e de 600 nM para o *rpl10a*, além da concentração para o cDNA de 25 ng.µL<sup>-1</sup>.

Para o RT-qPCR foram utilizados cDNA de quatro animais de cada grupo, em cada poço de placas de 96 poços (MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems, Thermo Fisher, USA) foram adicionados 3,2 µL de cDNA e 2,4 µL de cada um dos *primers forward* e *reverse* (Integrated DNA Technologies, Coralville, USA) em 8 µL de PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Applied BioSystems,

ThermoFisher, USA). Todas as reações foram corridas em triplicata e realizadas em termociclador QuantStudio™ 3 qPCR System (Applied Biosystems, Thermo Fisher, USA). As condições de amplificação utilizadas foram: 2 minutos a 50 °C, 10 minutos a 95 °C, seguidos de 50 ciclos a 95 °C por 15 segundos para a desnaturação da fita de cDNA e a 60 °C por 1 minuto.

**Quadro 1** - Sequências de bases dos primers para *hsp70* e *rpl10a*, com seus respectivos acessos no GenBank

Genes	Primers	Acesso GenBank
<i>hsp70</i>	Fw 5' – CCC AGA GGC AAG CGA CTA AA – 3'	JN544930.1
	Rv 5' – AGC CTC TGC CGT TGA AGA AA – 3'	
<i>rpl10a</i>	Fw 5' – TTC GAC GCA ACT TCC CTT CA – 3'	XM_019084206.2
	Rv 5' – AGT TCT TCC TCG GTC ATC CT – 3'	

A eficiência de amplificação dos genes foi calculada utilizando-se a inclinação da reta (*slope*), obtida a partir da amplificação de diluições decimais seriadas do cDNA, sendo plotados os valores da diluição em função dos valores do ciclo de limiar (Ct) obtidos em um curva padrão.

Desta forma, a eficiência de amplificação para cada gene foi calculada pela seguinte fórmula:

$$E = 10^{-\left(\frac{1}{\text{slope}}\right)}$$

Os valores de fluorescência emitida durante os ciclos de amplificação foram utilizados para a quantificação relativa da amplicação de *hsp70* e *rpl10a*. A expressão relativa ente os genes foi calculada pelo método Pfaffl (PFAFFL, 2001).

Para o cálculo da expressão relativa pelo método Pfaffl, utilizou-se a seguinte equação:

$$\text{Expressão relativa} = \frac{(E_{hsp70})^{\Delta C_T hsp70}}{(E_{rpl10a})^{\Delta C_T rpl10a}}$$

#### 4.11. Análise estatística

Todos os dados registrados na anestesia das carpas-koi e calculados posteriormente na análise hematológica foram tabulados e avaliados por testes de normalidade (Kolmogorov-Smirnov e D'Agostino-Pearson) com posteriores testes paramétricos (ANOVA com pós-teste de Tukey) e não-paramétricos (Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn).

Uma vez que os resultados para o cortisol plasmático não apresentaram distribuição normal, os valores foram analisados pelo Teste de Grubbs para eliminação de *outliers* e posteriormente avaliados por testes não-paramétricos (testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney,  $p < 0,05$ ) e teste t não-pareado ( $p < 0,05$ ) entre os grupos controle e anestesiados.

Para a expressão gênica relativa, os valores calculados pelo método Pfaffl foram analisados avaliados por testes de normalidade (Kolmogorov-Smirnov e D'Agostino-Pearson) com posteriores testes paramétricos teste F e one-way ANOVA com pós-teste de Fisher ( $p < 0,05$ ) com comparações múltiplas conforme recomendações de Yuan et al. (2006) e Tichopad et al. (2013).

Todas as avaliações estatísticas foram realizadas utilizando-se os pacotes estatísticos *GraphPad InStat 3* e *GraphPad Prism 6* (*GraphPad Software Inc.*, San Diego, Estados Unidos). Os resultados foram expressos com intervalo de confiança de 95 % ( $p < 0,05$ ).



## 5. RESULTADOS

### 5.1. Parâmetros físicos e químicos da água

Durante o período do estudo, os parâmetros físicos e químicos da água apresentaram os valores para temperatura de  $19,79 \pm 1,34$  °C; pH  $7,47 \pm 0,09$ ; oxigênio dissolvido  $10,52 \pm 1,10$  ppm; amônia total  $0,93 \pm 1,10$  ppm; amônia tóxica  $0,0015 \pm 0,0021$  ppm; nitrito  $1,32 \pm 0,75$  ppm. Estes parâmetros estão dentro do preconizado por Saint-Erne (2010) e Witeska et al. (2016) para a manutenção da fisiologia das carpas-koi *C. carpio*.

### 5.2. Análise bromatológica da ração

A análise bromatológica da ração resultou em ração com 91,68 % de matéria seca a 105 °C; 4381 cal.g<sup>-1</sup> de energia bruta; 37,39 % de proteína bruta; 23,79 % de amido; 8,79 % de extrato etéreo (componentes lipídicos); 8,94 % de matéria mineral; 1,85 % de cálcio e 1,19 % de fósforo.

Em relação à análise bromatológica, os resultados estão dentro do mínimo necessário para a nutrição ideal de carpas-koi, semelhante ao indicado por Takeuchi et al. (2002) para carpas-comuns, para as quais a ração que deve conter entre 3100 e 3600 cal.kg<sup>-1</sup> com até 40 % de amido como fonte de carboidrato e de 5 a 15 % de lipídio (extrato etéreo).

### 5.3. Análise de microminerais na ração

Os resultados da análise dos microminerais da ração estão dispostos na Tabela 1 abaixo.

Para os minerais e microminerais, o NRC (2011) indica para carpas os níveis de microminerais com importância fisiológica, tais como cálcio, fósforo, cobre, zinco, magnésio e manganês, com informações adicionais encontradas em Watanabe et al. (1997) e Prabhu et al. (2016). Outros microminerais terras raras como o arsênio, lantânio, rubídio e o escândio são provavelmente provenientes de fontes minerais naturais e carregados por outros minerais, tais como potássio, cobre e zinco.

**Tabela 1** - Análise de microminerais na ração utilizada para a alimentação das carpas-koi – ração 360-AM AMICIL com níveis mínimos exigidos para a alimentação de carpas e minerais-traço na nutrição de peixes

Mineral	Níveis na ração360-AM AMICIL	Níveis mínimos para ração de carpas <sup>1</sup>	Minerais-traço na nutrição de peixes <sup>2,3</sup>
Br	4,28±0,02 mg.kg <sup>-1</sup>	NR	NR
Ca	16771±167 mg.kg <sup>-1</sup>	0,34 g.100 g <sup>-1</sup> ração	0,3-9,7 mg.kg <sup>-1</sup> ração
P	NR	0,7 g.100 g <sup>-1</sup> ração	NR
Na	2999±6 mg.kg <sup>-1</sup>	NR	NR
K	9265±78 mg.kg <sup>-1</sup>	NR	NR
Cu	NR	3 mg.kg <sup>-1</sup> ração	1-5 mg.kg <sup>-1</sup> ração
As	124±8 mg.kg <sup>-1</sup>	NR	NR
La	0,233±0,042 mg.kg <sup>-1</sup>	NR	NR
Fe	536±6 mg.kg <sup>-1</sup>	150 mg.kg <sup>-1</sup> ração	30-170 mg.kg <sup>-1</sup> ração
Zn	172±0,7 mg.kg <sup>-1</sup>	15 mg.kg <sup>-1</sup> ração	15-40 mg.kg <sup>-1</sup> ração
Mg	2,832±0,521 g.kg <sup>-1</sup>	0,06 g.100 g <sup>-1</sup> ração	0,08-3,2 mg.kg <sup>-1</sup> ração
V	1,50±0,39 mg.kg <sup>-1</sup>	NR	NR
Mn	93,9±1,1 mg.kg <sup>-1</sup>	12 mg.kg <sup>-1</sup> ração	2-20 mg.kg <sup>-1</sup> ração
Se	1098±109 ng.kg <sup>-1</sup>	NR	0,15-0,5 mg.kg <sup>-1</sup> ração
Co	655±6 ng.kg <sup>-1</sup>	NR	0,05-1,0 mg.kg <sup>-1</sup> ração
Rb	10,9±0,2 ng.kg <sup>-1</sup>	NR	NR
Sc	484±22 ng.kg <sup>-1</sup>	NR	NR

OBS: NR – níveis não registrados.

Fonte: 1 – NRC (2011); 2 - Watanabe et al. (1997); 3 - Prabhu et al. (2016).

#### 5.4. Fatores fisiológicos relacionados à anestesia, estímulo doloroso e hemograma

Dados de frequência respiratória, frequência cardíaca e glicemia sérica foram aferidos no decorrer da anestesia das carpas-koi *C. carpio* e estão apresentados na Tabela 2.

Os resultados do eritrograma e do leucograma estão apresentados na Tabela 3. Os parâmetros hematimétricos estão apresentados na Tabela 4. Durante a contagem não foram contabilizados os trombócitos e eritroblastos.

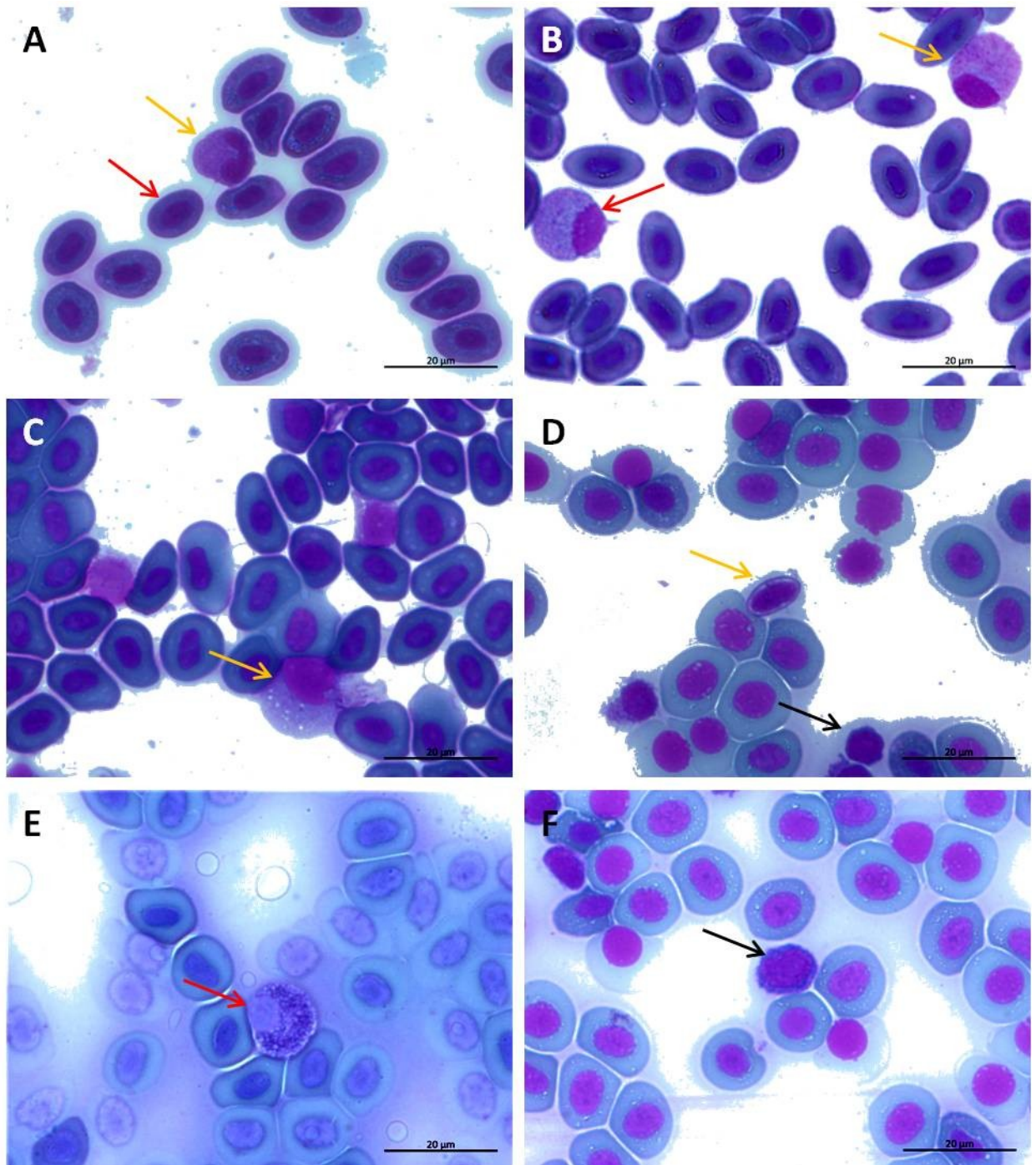
Durante o uso da solução de eugenol a  $20 \text{ mg.L}^{-1}$ , nenhuma das carpas-koi *C. carpio* atingiu o plano anestésico esperado, apresentando apenas tranquilização após 15 minutos. Também se observou que as carpas-koi *C. carpio* anestesiadas nas soluções de  $40 \text{ mg.L}^{-1}$  (E40) e  $60 \text{ mg.L}^{-1}$  (E60) apresentaram resposta motora durante a aplicação da preensão da nadadeira caudal, que se refletiu também em aumento da frequência cardíaca detectada (Tabela 2).

Os níveis séricos de glicose circulante também apresentaram alterações em relação às concentrações utilizadas tanto para a benzocaína quanto para o eugenol. No caso da benzocaína, o grupo que foi anestesiado em solução com concentração de  $130 \text{ mg.L}^{-1}$  (B130) mostrou glicemia elevada em comparação aos grupos com menor concentração do fármaco (Tabela 2). A análise hematológica do grupo B70 também revelou resposta inespecífica a agente irritante, com o aumento na contagem de leucócitos totais circulantes, com predominância de neutrófilos, e elevação nos valores do hematócrito (Tabelas 3 e 4).

Carpas-koi *C. carpio* anestesiadas com eugenol mostraram comportamento distinto se comparados aos grupos anestesiados com benzocaína, com níveis médios de glicemia mais altos no grupo E20 e E60 do que daqueles encontrados nas carpas do grupo E40 (Tabela 2). Assim como visto nas carpas anestesiadas com benzocaína, carpas-koi *C. carpio* anestesiadas com a menor concentração de eugenol (E20) mostraram uma resposta similar com valores elevados para a contagem de eritrócitos e para monócitos quando comparados com os valores dos outros grupos anestesiados com eugenol (Tabela 3).

Em relação aos tempos de recuperação, observou-se que as carpas-koi *C. carpio* anestesiadas tanto em solução de eugenol quanto de benzocaína apresentaram tempos longos (Tabela 2). A avaliação em 24, 48 e 72 horas pós-anestesia revelou que, já após as primeiras 24 horas, todas as carpas-koi *C. carpio* que receberam analgesia apresentaram apetite. No grupo controle, após 24 horas, observaram-se os animais em letargia, e sem apetite aparente, mas que retornou após as primeiras 48 horas. Tal comportamento é semelhante ao relatado por Harms et al. (2005) ao utilizar butorfanol em carpas-koi *C. carpio*.

**Figura 1** - Componentes celulares sanguíneos de carpas-koi *C. carpio*. **A**, neutrófilo bilobulado (seta laranja) e eritrócito (seta vermelha). **B**, eosinófilo (seta laranja) e neutrófilo (seta vermelha). **C**, monócito (seta laranja). Observar a presença de vacúolos em seu citoplasma. **D**, trombócito (seta laranja) e linfócito (seta preta). **E**, basófilo. **F**, eritroblasto. Coloração por panótico rápido para hematologia. Objetiva de 100x com óleo de imersão. Barras – 20 µm.



Fonte: autoria própria.

**Tabela 2** - Parâmetros fisiológicos aferidos durante a anestesia antes e após o pinçamento da nadadeira caudal de carpas-koi *C. carpio*.

	Controle	B70	B100	B130	E20	E40	E60
FC (bpm) antes	104±23,49	94±21,49	91,5±25,52	73,75±34,89	99,50±6,21	104,5±9,66	108,5±11,40
FC (bpm) após		84±21,80a	69,50±27,37a	63±14,77a		102,5±11,69b	108,5±12,36c
FR/min antes	104,5±11,19	96,5±25,24	103,25±23,32	101,75±26,26	77,5±21,58	99±12,96	118,75±9,96
FR/min após		100,5±36,99	110,25±26,08	103±20,02		72±14,81	91±19,47
Glicemia sérica	192,37±95,93a	84,12±51,61b	80,25±49,83b	158,37±65,99a	102,5±70,22a	79,5±26,26b	134,25±52,80a
Tempo de indução (s)		165,5±64,15a	157,37±60,51a	153,12±41,77a		465,12±238,69b	162,62±48,37a
Tempo de recuperação (s)		1961±1280a	2234,87±1000,36b	1574,37±566,87a	857,12±898,74b,c	1937,87±676,67a,d	1619,6212±737,86a

OBS: nas linhas, letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos avaliados por ANOVA com pós teste de Tukey ou Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn e  $p < 0.05$ .

**Tabela 3** - Eritrograma e leucograma do sangue de carpas-koi *C. carpio* coletado após o pinçamento da nadadeira caudal.

Grupo	Eritrócitos ( $10^6 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	Leucócitos totais ( $10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	Linfócitos ( $10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	Neutrófilos ( $10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	Monócitos ( $10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	Eosinófilos ( $10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	Basófilos ( $10^3 \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )
Controle	1,93±0,88	52,7±19,28	34,16±19,75	17,54±8,14	0,31±0,08a	0,56±0,97a	0,15±0,45
B70	2,26±0,89	70,78±46,28	27,81±22,74	31,76±22,81	7,58±3,85b	2,9±1,35b	0,71±1,32
B100	1,33±0,36	34,1±21,1	21,01±16,59	8,08±5,87	3,29±3,16a	1,27±0,35a	0,45±0,63
B130	1,85±0,76	52,95±58,39	35,47±39,29	12,77±20,88	2,75±3,03a	1,17±0,78a	0,16±0,46
E20	2,01±0,53	44,91±17,37	27,95±16,59	12,39±4,64	2,30±2,82a	2,05±1,5a	0,20±0,57
E40	1,81±0,37	42,25±12,56	28,16±14,46	10,60±3,75	0,8±1,30a	1,8±0,36a	0,88±0,99
E60	1,82±0,57	43,73±21,19	23,31±14,46	18,28±21,1	0,63±0,74a	1,31±0,98a	0,14±0,41

OBS: nas colunas, letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos avaliados por ANOVA com pós teste de Tukey ou Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn e  $p < 0.05$ .

**Tabela 4** – Parâmetros hematimétricos do sangue de carpas-koi *C. carpio* coletado após o pinçamento da nadadeira caudal.

Grupo	Hematócrito (%)	Hemoglobina (g.dL <sup>-1</sup> )	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (g.dL <sup>-1</sup> )
Controle	24,62±7,78	6,74±2,48	141,64±57,79	37,68±15,26	27,29±7,67a
B70	25,31±5,49	6,25±1,94	137,31±76,51	30,26±9,18	24,88±7,37a
B100	33,0±11,67	5,81±2,47	251,51±91,83	44,50±20,33	17,66±4,19b
B130	37,5±6,25	7,0±1,07	223,63±72,09	41,92±13,35	18,86±2,39a
E20	28,9±10,02	7,0±2,37	149,64±66,55	35,07±9,46	24,64±5,18a
E40	32,12±7,0	8,48±0,61	181,63±42,77	48,26±9,86	27,77±7,84a
E60	30,93±9,38	6,98±1,26	186,48±75,99	41,76±13,86	23,51±3,93a

OBS: nas colunas, letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos avaliados por ANOVA com pós teste de Tukey ou Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn e  $p < 0.05$ .

### 5.5. Histologia da pele das carpas

A pele das carpas-koi *C. carpio* é composta por duas camadas, uma epiderme externa e uma derme subjacente (Figura 2A).

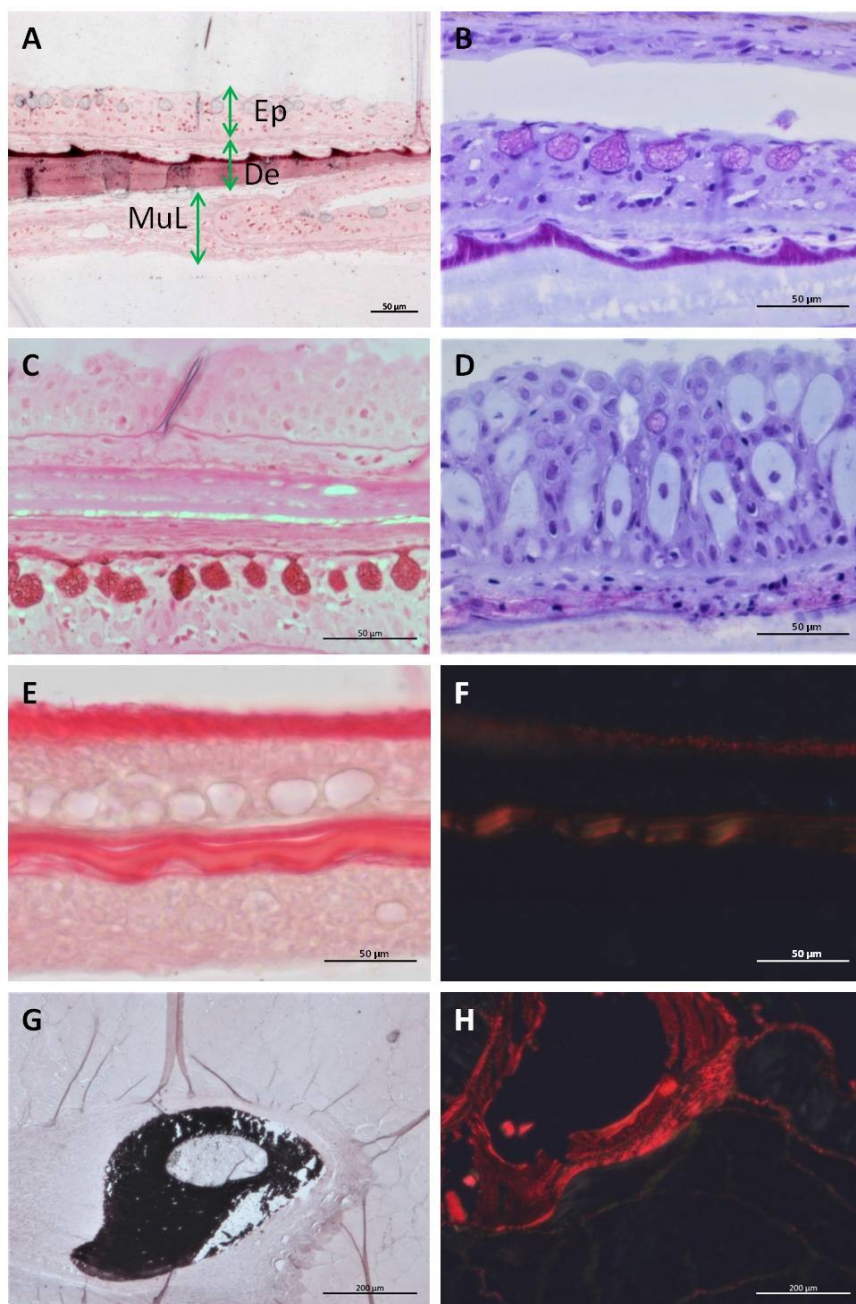
A epiderme das carpas-koi *C. carpio* apresenta epitélio pavimentoso estratificado não queratinizado com espessura de 6-8 células. São observadas na epiderme as células de Malpighi (ou malpighianas) que representam o componente principal, células mucosas responsáveis por secretar principalmente glicoproteínas ácidas (Figura 2B) e neutras (Figura 2C) que formam uma camada protetora viscosa (SHEPHARD, 1994). Além dos componentes estruturais e de proteção individual, são encontradas *club cells* (Figura 2D) entre as camadas de células de Malpighi, as quais secretam substâncias que sinalizam a ameaça (*fright substances*) para os membros do cardume quando são rompidas (PFEIFFER, 1977).

A derme contém dois estratos: esponjoso e o compacto. O estrato esponjoso situado na base da epiderme contém fibras colágenas evidenciadas com a coloração de picrosírius e reticulares, nervos, capilares, fibroblastos e células pigmentares. O estrato compacto é mais desenvolvido que o estrato esponjoso e é formado por um feixe densamente comprimido de fibras colágenas que correm paralelas à superfície da pele (GENTEN et al., 2009) (Figuras 2E e 2F). Entre as camadas de fibras colágenas foram observadas estruturas saculares, as *scale-pockets* (Figura 2E), que originam as escamas ctenoiodes dos peixes ósseos (RAKERS et al., 2010).

Abaixo da pele (epiderme + derme) está a hipoderme, composta por tecido adiposo com pequena espessura, o que a torna difícil de ser visualizada nos cortes. Nas camadas mais profundas foi observada a camada de musculatura com fibras em orientação longitudinal e circular. Na camada circular foi detectado um dos ossos intermusculares (Figura 2G), estruturas responsáveis pela delimitação do formato dos miômeros da musculatura axial (PATTERSON; JOHNSON, 1995). No interior do osso intermuscular é possível observar seu esqueleto cartilaginoso e, externamente, as fibras colágenas da matriz óssea, do periósteo e do perimísio (Figura 2H).



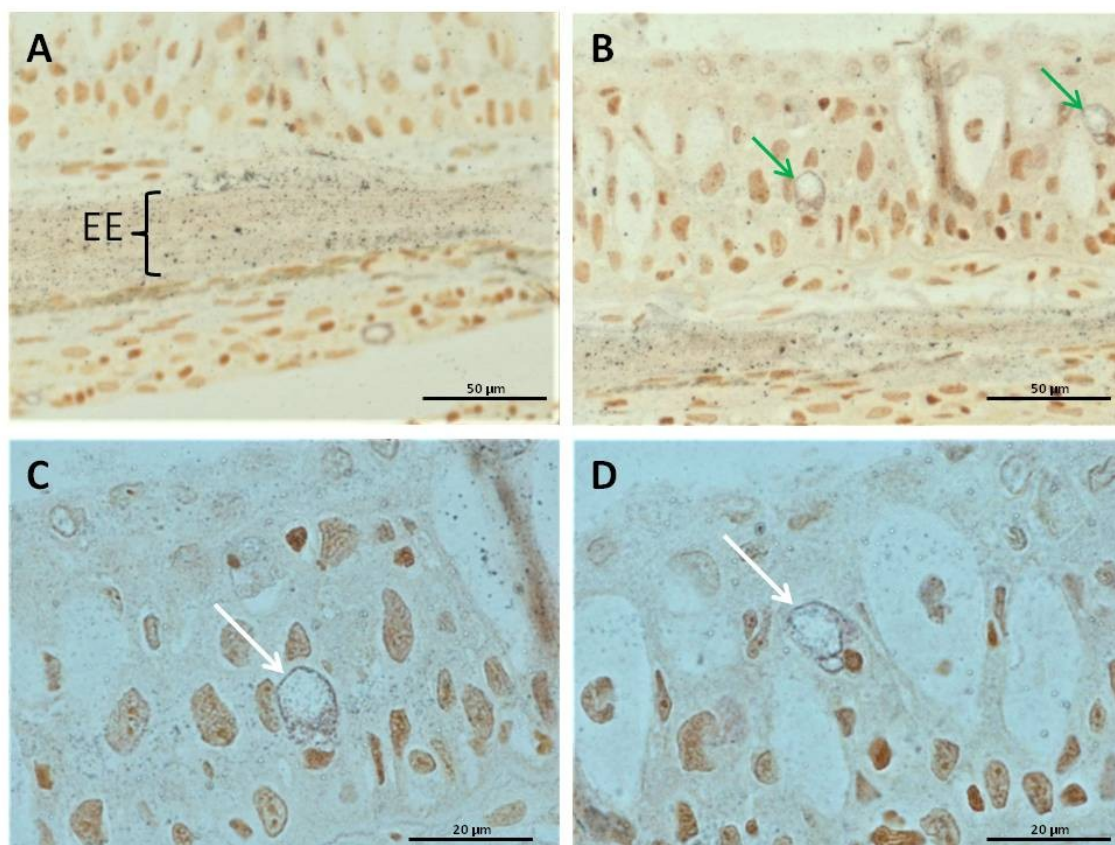
**Figura 2** - Fotomicrografias da pele de carpas-koi *C. carpio*. **A**, a pele da carpa com epiderme (Ep), derme (De), hipoderme e fibras musculares longitudinais (MuL). Von Kossa **B** e **C**, células mucosas com seu conteúdo ácido e neutro. Azul de toluidina e ácido periódico de Schiff. **D**, células de Malpighi e *club cells* como grandes células secretoras. Azul de toluidina. **E**, derme compacta e derme esponjosa com *scale-pockets*. Picosirius. **F**, fibras colágenas. Picosirius sob luz polarizada. **G**, osso intermuscular, Von Kossa. **H**, osso intermuscular com presença de fibras colágenas em sua matriz óssea e no perimísio adjacente. Picosirius sob luz polarizada. Barra: A até F – 50  $\mu\text{m}$ , G e H – 200  $\mu\text{m}$ .



Fonte: autoria própria.

Com a impregnação por prata de Grimelius, foi possível detectar as neurofibrilas no estrato esponjoso da derme (Figura 3A) e a delimitação de células ovoides na epiderme que tiveram a deposição da prata principalmente na membrana plasmática (Figura 3B). Pelas suas características morfológicas, foram definidas como sendo as células de Merkel (Figuras 3C e 3D).

**Figura 3** - Fotomicrografias da pele de carpas-koi *C. carpio*. **A**, neurofibrilas evidenciadas pelos grânulos de prata localizadas no estrato esponjoso (EE) da derme. **B**, na epiderme a prata se depositou na membrana plasmática de células ovoides observadas entre as células de Malpighi e as *club cells*. **C** e **D**, maior aumento das células da figura B revelou que estas são células de Merkel. Impregnação por prata de Grimelius. Barras: A e B – 50  $\mu\text{m}$ . C e D – 20  $\mu\text{m}$ . Uso de objetiva de 100x com óleo de imersão.



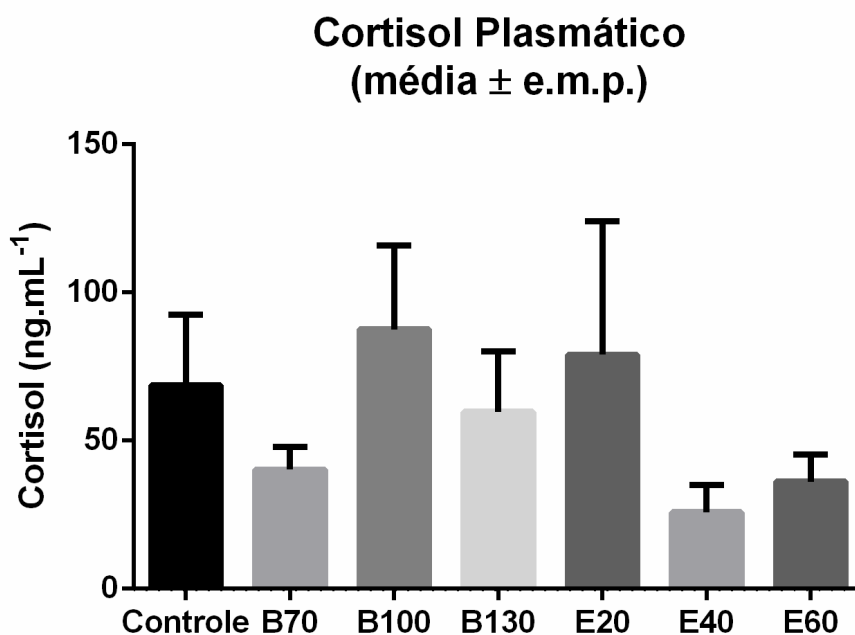
Fonte: autoria própria.

### 5.6. Níveis plasmáticos de cortisol

Os valores de cortisol estão apresentados como média  $\pm$  erro médio padrão (Figura 4).

De forma não esperada, os níveis plasmáticos de cortisol atingiram valores máximos em carpas-koi *C. carpio* anestesiadas em solução de benzocaína na concentração de 100 mg.L<sup>-1</sup> e eugenol em 20 mg.L<sup>-1</sup> quando comparadas às concentrações encontradas em carpas-koi *C. carpio* do grupo controle sem anestesia prévia (87,57  $\pm$  28,42 e 36,10  $\pm$  9,13 ng.mL<sup>-1</sup> vs 68,68  $\pm$  23,79 ng.mL<sup>-1</sup>, respectivamente). Valores mais baixos para o cortisol foram detectados em carpas-koi *C. carpio* anestesiadas em soluções com 130 mg.L<sup>-1</sup> de benzocaína e 40 mg.L<sup>-1</sup> de eugenol (59,69  $\pm$  20,39 e 25,83  $\pm$  9,15 ng.mL<sup>-1</sup>, respectivamente). Porém, não houve diferença estatística tanto entre os grupos quanto para análise entre o grupo controle e anestesiados avaliados pelos testes t (Figura 4).

**Figura 4** - Níveis plasmáticos de cortisol avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis (média  $\pm$  erro médio padrão). Não houve diferença estatística entre os grupos anestesiados em soluções com diferentes concentrações de benzocaína e eugenol e carpas-koi *C. carpio* não anestesiadas



Fonte: autoria própria.

### 5.7. Extração de RNA das células sanguíneas

A extração de RNA das amostras resultou em níveis de RNA de pureza de  $2,59 \pm 1,44$  com concentração de  $10.968,94 \pm 13.959,43 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ . A pureza está acima do limite mínimo indicado pelos fabricantes quando a extração é realizada com trizol. Mesmo com algumas amostras que sofreram geleificação após a adição de trizol ou amostra em pequeno volume, a concentração de RNA foi satisfatória após sua purificação. O desvio padrão acima da média de concentração de RNA se deu por algumas amostras apresentarem alta concentração, aumentando a dispersão dos valores ao redor da média.

### 5.8. RT-qPCR para *hsp70* e *rpl10a*

Os cálculos das eficiências de amplificação dos *primers* resultaram em valores para *hsp70* igual a 0,32 e para *rpl10a* de 0,54. Os resultados das análises por RT-qPCR estão apresentados na Tabela 5 e Figura 5.

As análises estatísticas para a expressão relativa de *hsp70* demonstraram resultados com distribuição gaussiana pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, os quais foram analisados pela ANOVA com pós-teste de Fisher (p-valor = 0,0003) e teste F (8,928; p-valor < 0,0001) (Tabela 5).

Com a análise dos resultados calculados através do método Pfaffl, observou-se a elevação das expressões relativas de *hsp70* nas células sanguíneas das carpas-koi dos grupos E20 (ANOVA Controle x E20; p = 0,04) e E60 (ANOVA Controle x E60; p-valor = 0,03) após anestesia e estímulo doloroso (Figura 5), contrastando ao observado em carpas anestesiadas em soluções à base de benzocaína (B70, B100 e B130) e em carpas anestesiadas em solução de eugenol a  $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  (grupo E40).

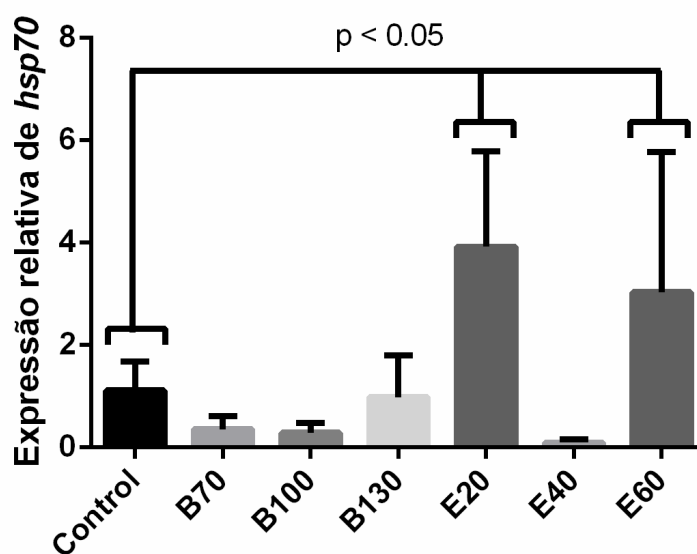
**Tabela 5** – Expressão relativa de *hsp70* nas células sanguíneas de carpas-koi *C. carpio* coletadas após o pinçamento da nadadeira caudal

Grupo	Média ± desvio padrão	Intervalo de confiança	Mediana
Controle	1,11 ± 0,53a	0,54 – 1,6	1,11
B70	0,35 ± 0,20a	0,09 – 0,61	0,21
B100	0,28 ± 0,22a	0,10 – 0,47	0,28
B130	0,98 ± 0,78a	0,16 – 1,80	1,04
E20	3,92 ± 1,77b	2,06 – 5,78	3,81
E40	0,09 ± 0,06a	0,03 – 0,16	0,09
E60	3,03 ± 3,27b	0,30 – 5,77	2,17

OBS: nas colunas, letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos avaliados por ANOVA com pós-teste de Fisher e  $p < 0.05$ .

**Figura 5** – Expressão relativa de *hsp70* nas células sanguíneas de carpas-koi após anestesia seguida de pinçamento da nadadeira caudal.

### Expressão relativa de *hsp70* nas células sanguíneas



Fonte: autoria própria.

## 6. DISCUSSÃO

As células de Merkel são células cutâneas mecanorreceptoras encontradas na epiderme de peixes ósseos e estão distribuídas por toda a superfície corpo e no epitélio oral (ZACCONE et al., 1994). Pela microscopia eletrônica de transmissão são descritas vesículas núcleo densas e adjacentes à membrana plasmática que são compostas por serotonina, enolase neuroespecífica, metencefalina e polipeptídeo intestinal vasoativo (ZACCONE et al., 1994). A presença dos grânulos na periferia das células de Merkel da pele de carpas descritos na microscopia eletrônica de transmissão (TACHIBANA et al., 1984) também foi visualizada na microscopia de luz em cortes de historresina. Ao se utilizar o método de impregnação por nitrato de prata em tampão ácido à base de acetato de sódio (GRIMELIUS, 2004), observou-se a avidéz da ligação de sais de prata (carga positiva) aos grânulos, principalmente pela presença de serotonina (carga negativa) (LUNDQVIST et al., 1990). Assim, a impregnação de Grimelius permitiu a reação argirofílica uma vez que substâncias ou proteínas nas células reduzem a solução de prata a prata metálica após a exposição a um agente redutor externo (RAMÍREZ; DE LOS MONTEROS, 2019), como soluções reveladoras à base de hidroquinona ou sulfito de sódio (GRIMELIUS, 2004), ou qualquer outro revelador fotográfico como metol, pirogalol ou fenidona.

A leucocitose por linfocitose e neutrofilia também foi observado por Ferreira et al. (1981) ao estudarem a anestesia de carpas-comuns *C. carpio* em banhos anestésicos com benzocaína, os quais relacionaram a elevação da contagem de eritrócitos, hematócrito e hemoglobina à liberação simpática de eritrócitos dos vários reservatórios sanguíneos com o uso de benzocaína em baixas concentrações (80 mg.L<sup>-1</sup>) e que, com o uso de altas concentrações (100 mg.L<sup>-1</sup>), o efeito é reduzido devido ao menor tempo de exposição ao ambiente aquático alterado (FERREIRA et al., 1979a). Fato também observado nos grupos B70 e E20 foi a hemoconcentração, que também afeta os valores derivados como o VCM, HCM e CHCM (FERREIRA et al., 1981), sem relação com hipóxia (SOIVIO et al., 1977). A ação da hipóxia foi evitada pela oxigenação constante das soluções anestésicas e bombeamento para as brânquias via oral durante todo o período em que as carpas-koi *C. carpio* foram

mantidas fora das soluções anestésicas, assim se descartando a hipóxia como fator primário para as alterações dos parâmetros hematológicos observados nas carpas-koi *C. carpio* nesta pesquisa.

Ferreira et al. (1981) concluem que o estresse causado pelo uso do anestésico produz efeitos na qualidade da água que estimulam os quimiorreceptores dos peixes com resposta do sistema nervoso autônomo (FERREIRA et al., 1979ab), indicando a distinção entre o estresse fisiológico ocorrido durante o manuseio - resposta autônoma levando à reação de alarme (BARTON; IWAMA, 1991), e aquele resultante de estresse químico com o uso de baixas concentrações de benzocaína causando desvio da zona de conforto ambiental, conforme Harper e Wolf (2009). Ademais, as carpas-koi *C. carpio* anestesiadas com eugenol tiveram menor flutuação dos parâmetros hematológicos em relação aos do grupo controle do que as carpas-koi *C. carpio* anestesiadas com benzocaína. Isto sugere uma maior tolerância ao eugenol possivelmente pelo seu caráter lipofílico, o qual facilita sua absorção branquial.

Os níveis plasmáticos de glicose circulante também apresentaram alterações em relação às concentrações utilizadas tanto para a benzocaína quanto para o eugenol. As concentrações intermediárias tanto da benzocaína quanto de eugenol levaram aos menores valores de glicemia registrados, fato também observado na anestesia de carpa-comum *C. carpio* com benzocaína por Ferreira et al. (1981). Contudo, deve-se levar em consideração não apenas as concentrações dos anestésicos, mas também a presença do estímulo doloroso.

A elevação da glicemia é uma consequência da ação do cortisol liberado pelo tecido interrenal do rim cranial (TORT, 2011) diante de qualquer fator estressante atuando sobre a homeostase dos peixes. Neste caso, o estímulo doloroso atuou sobre as células de Merkel, levando à resposta neuroendócrina do eixo hipotálamo – hipófise – tecido interrenal (COCKREN, 2013)

No caso da anestesia com benzocaína, o grupo B130 mostrou glicemia elevada em comparação aos grupos com menor concentração do fármaco, semelhante ao relatado por Heo e Shin (2010) para peixes-dourados *Carassius auratus*. Isto pode ser indiretamente interpretado como possível consequência do estresse causado pela hipóxia da anestesia profunda (WENDELAAR



BONGA, 1997). Ferreira et al. (1981) observaram que o aumento das concentrações de benzocaína causam redução da  $pO_2$  e elevação da  $pCO_2$  sanguíneas em carpas-comuns *C. carpio*, fato também observado por Parker-Graham et al. (2020) na anestesia de carpas-koi *C. carpio* com altas concentrações de MS-222.

Em relação aos tempos de indução e recuperação anestésica para carpas-comuns *C. carpio*, a literatura traz que concentrações maiores tanto de eugenol quanto de benzocaína reduzem o tempo de indução e elevam o tempo de recuperação, com redução dos movimentos operculares (FERREIRA et al., 1984; HIKASA et al., 1986) fato também observado no uso de óleo de cravo (VELISEK et al., 2005) e isoeugenol (GLADDEN et al., 2010). No presente trabalho, observou-se que as carpas-koi *C. carpio* anestesiadas tanto em solução de eugenol quanto de benzocaína apresentaram tempos longos de recuperação. Este fato é consequência da associação entre a atividade anestésica do eugenol e da benzocaína em via inalatória e do uso da lidocaína via intramuscular utilizado como tratamento analgésico pós-preensão da nadadeira caudal, bem como da temperatura da água da recuperação. Um fator que necessita ser controlado é a temperatura da água do aquário de recuperação pós-anestesia, pois a velocidade das reações fisiológicas dos peixes sofre influência direta da temperatura da água (BALDISSEROTTO, 2013). Em suma, em água em temperaturas mais elevadas, espera-se que os tempos de recuperação sejam menores do que o encontrado.

O cortisol está presente nos peixes desde as primeiras horas pós-fertilização dos ovos e, doravante, as larvas podem responder a estímulos ambientais com elevação dos seus níveis. Flik et al. (2006), em comentário sobre seu trabalho anterior (FLIK et al., 2002), discutiram sobre o fato de que as larvas de carpa-comum *C. carpio* em seus primeiros estágios, ainda protegidas pela membrana do ovo, são capazes de produzir cortisol quando o embrião é perturbado pela manipulação do ovo com fórceps. Assim, a ação direta de compressão desencadeou a produção de cortisol, que não é armazenado, mas sempre produzido de acordo com a necessidade do embrião. A gema também abriga fontes maternas de cortisol, mas, no ovo em desenvolvimento, o declínio nos níveis pode resultar do consumo e o aumento apenas pode ser explicado pela síntese embrionária (FLIK et al., 2006).



Por outro lado, a anestesia de ciprinídeos *Pimephales promelas* em solução anestésica de eugenol na concentração de 30 mg.L<sup>-1</sup> não altera os níveis plasmáticos de cortisol (PALIĆ et al., 2006). Diferentemente do observado nesta pesquisa, o uso da maior concentração de eugenol reduziu os níveis plasmáticos de cortisol em híbridos cachadia *Pseudoplatystoma reticulatum* × *Leiarius marmoratus*, e não houve alteração nos níveis plasmáticos de glicose (DE OLIVEIRA, 2019). Para robalos *Dicentrarchus labrax*, os níveis de cortisol variaram de forma não linear com o aumento das concentrações de eugenol utilizadas (FILICIOTTO et al., 2012). Isto é semelhante ao observado com as carpas-koi, em que as concentrações intermediárias de eugenol revelaram os menores níveis de cortisol. Mesmo assim, todos os grupos anestesiados com eugenol apresentaram níveis de cortisol próximos aos de seus respectivos grupos controle (FILICIOTTO et al., 2012).

Em peixes adultos expostos a ambientes, atividades ou agentes estressores, ocorre a secreção de catecolaminas e corticosteroides que levam à elevação da frequência respiratória, aumento do fluxo sanguíneo branquial e aumento do débito cardíaco (WENDELAAR BONGA, 1997). Além disso, a perfusão das lamelas branquiais aumenta e as lamelas que, em estado normal de repouso são pouco ou nada perfundidas, são recrutadas e se expande a área da superfície respiratória com consequente elevação da taxa de difusão. Consequentemente, um peixe em estado de estresse agudo anestesiado por banho de imersão provavelmente absorve o anestésico mais rapidamente e possivelmente também uma quantidade maior, obtendo assim indução mais rápida, uma anestesia mais profunda e atraso na recuperação (Z AHL et al., 2009). Esta situação foi confirmada por Zahl et al. (2009) ao anestésiar bacalhaus-do-Atlântico *G. morhua* em banhos à base de MS-222 após estresse agudo por exposição aérea, para os quais necessitou reduzir as concentrações do anestésico para evitar mortalidades. Kiessling et al. (2009) descreveram um quadro intrincado ao usar MS-222, benzocaína ou isoeugenol em salmão-do-Atlântico *Salmo salar*. Os níveis de cortisol plasmático sofrem influência direta em peixes ventilados com bombas submersas quando comparados aos não ventilados, com picos de cortisol após 60 minutos de recuperação e elevação da frequência cardíaca. Assim, o uso de um tubo para ventilação branquial é

um fator de estresse durante a anestesia de peixes e pode alterar os níveis de cortisol plasmático. Nesta pesquisa com anestesia de carpas-koi, todos os grupos anestesiados sofreram diretamente a ação estressora de bomba submersa, não podendo se excluir este fator nos níveis plasmáticos de cortisol e, conseqüentemente, nos de glicemia encontrados.

Os corticosteróides agem diretamente nos leucócitos mamíferos pela sua ligação a receptores de glicocorticoides. Da mesma forma, os receptores de cortisol foram descritos em células imunológicas de peixes (STOLTE et al., 2008a,b), componentes necessários para o cortisol induzir a expressão de *hsp70* (STOLTE et al., 2009). A injeção intracelomática de cortisol tanto de forma aguda como crônica levam à redução da expressão de *hsp70* em espécies tropicais e de águas temperadas (BASU et al., 2001; NARDOCCI et al., 2014). Porém, Le et al. (2019) observaram que em exemplares de peixe-dourado *Carassius auratus* anestesiados com solução de eugenol a  $20 \text{ mg.L}^{-1}$  apresentaram níveis de cortisol plasmático superiores quando comparados ao grupo anestesiado com solução de MS-222 e por atordoamento percussivo, porém os peixes anestesiados com eugenol mostraram os menores índices de expressão gênica relativa para o gene *hsp 70* no sangue demonstrando possível ação irritativa do MS-222. Contudo, foi observado que a benzocaína nas concentrações de 100 e  $130 \text{ mg.L}^{-1}$  reduziu os níveis relativos da expressão de *hsp70* em relação ao grupo controle não anestesiado, com conseqüente vantagem ao seu uso pela eficiência ao anestésiar e bloquear as reações diante do estímulo doloroso, indiretamente observadas nas frequências cardíaca e respiratória e na análise hematológica. Além disto, a análise da expressão de *hsp70* nas células sanguíneas de peixes mostrou-se um método seguro para detecção primária da defesa do organismo perante inflição dolorosa. Também se observou que o banho anestésico com eugenol na concentração de  $40 \text{ mg.L}^{-1}$  também reduziu a expressão de *hsp70*, porém concentrações tanto maiores quanto menores acarretaram em elavação deste fator. Ademais, carpas-koi anestesiadas em solução de eugenol mantiveram respostas motoras e frequências cardíaca e respiratória elevadas, refletindo ausência de relaxamento muscular. Assim, o uso de eugenol na anestesia de peixes em intervenções cirúrgicas deve ser desaconselhado a fim de se evitarem conseqüências à economia do organismo dos peixes.

Portanto, diante dos avanços deste trabalho e de outras pesquisas, é necessário que a Resolução Normativa 44/2019 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea/MTCI) (BRASIL, 2019) passe por revisões a fim de fornecer e esclarecer formas de monitoração de peixes anestesiados e orientações nos cuidados para intervenções cirúrgicas nestes animais.

A questão final é a análise dos resultados obtidos pela RT-qPCR. Observa-se na literatura que este ponto é de extrema importância na área da biologia molecular, uma vez que se procuram formas para se reduzir o erro e seus resíduos nos resultados finais. Estratégias diferentes são descritas para a normalização dos resultados (HUGGETT et al., 2005), utilizando-se principalmente a expressão de genes endógenos (PFAFFL et al., 2004) ou ainda ser realizada por métodos matemáticos (KITCHEN et al., 2010). Em nosso caso, foi utilizado um gene de proteína ribossomal semelhante ao utilizado em diferentes artigos que avaliaram a expressão gênica em células sanguíneas de carpas-comuns (CHADZINSKA et al., 2012; STOLTE et al., 2008ab; STOLTE et al., 2009). Também são descritos métodos matemáticos para calcular a quantificação relativa. Os dois métodos mais utilizados são o  $\Delta\Delta Ct$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e o método Pfaffl (PFAFFL, 2001), sendo este último o mais utilizado, pois as eficiências calculadas não estão próximas a dois, requisito mínimo para o uso do primeiro método. Finalmente, para a análise estatística, muitos autores exploraram os dados obtidos da quantificação e sua normalização. Para Yuan et al. (2006), os dados calculados pelo  $\Delta\Delta Ct$  para grupos com muitas amostras podem ser avaliados por análise multivariada ou análise de covariância (ANCOVA), e para casos com poucas amostras pode-se utilizar teste-t de *Student* ou Wilcoxon. Contudo, a distribuição normal dos dados direciona a análise a ser escolhida, e Yuan et al. (2006) indicam o uso do teste de Wilcoxon para dois grupos (Wilcoxon – Mann – Whitney), pois este é independente da distribuição. Para valores calculados para as eficiências relativas, Tichopad et al. (2013) indicam tanto o uso do teste-t de Student com teste de Grubbs para *outliers* quanto a análise de variância (ANOVA), porém sem a correção de Bonferroni. Tanto Yuan et al. (2006) quanto Tichopad et al. (2013) sugerem relatar o *p-valor* e o intervalo de confiança nos resultados estatísticos, respeitando o mínimo de informação

necessária para a publicação de ensaios de qPCR (BUSTIN et al., 2009). Nesta pesquisa, todas as orientações expostas anteriormente foram respeitadas a fim de revelar resultados que garantam a análise e a repetibilidade experimental, pois os primers não apresentaram eficiência máxima de 100%, semelhante ao observado na literatura (CHADZINSKA et al., 2012; STOLTE et al., 2008ab; STOLTE et al., 2009). Para não existirem resultados distantes da realidade, o método  $\Delta\Delta C_t$  não foi empregado na análise dos dados da RT-qPCR.

## 7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados encontrados nesta pesquisa, conclui-se que:

- A anestesia com benzocaína seguida de estímulo doloroso foi eficiente para reduzir a expressão de *hsp70* nas células sanguíneas;
- As concentrações de benzocaína a  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  para uso na anestesia por imersão levam ao relaxamento muscular e redução na resposta ao pinçamento, favorecendo a recuperação das carpas-koi;
- As concentrações de eugenol indicadas na literatura para anestesia por imersão não bloqueiam as consequências do estímulo doloroso, desaconselhando seu uso;
- A monitoração seguida da análise hematológica pode ser utilizada como método indireto para avaliação da dor em peixes anestesiados;
- O uso de lidocaína via intramuscular como agente analgésico favorece o retorno de apetite das carpas-koi após a recuperação.

**REFERÊNCIAS \***

ACKERMAN, P. A.; FORSYTH, R. B.; MAZUR, C. F.; IWAMA, G. K. Stress hormones and the cellular stress response in salmonids. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 23, n. 4, p. 327-336, 2000.

AIRAKSINEN, S.; RÅBERGH, C. M.; SISTONEN, L.; NIKINMAA, M. Effects of heat shock and hypoxia on protein synthesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cells. **The Journal of Experimental Biology**, v. 201, n. 17, p. 2543-2551, 1998.

ALTUN, T.; HUNT, A. Ö.; USTA, F. Effects of clove oil and eugenol on anaesthesia and some hematological parameters of European eel *Anguilla anguilla*, L., 1758. **Journal of Applied Animal Research**, v. 30, n. 2, p. 171-176, 2006.

ANTUNES, M. I. P. P.; SPURIO, R. S.; GODOI, D. A.; GRUMADAS, C. E. S.; ROCHA, M. A. Cloridrato de benzocaína na anestesia de carpas (*Cyprinus carpio*). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 1, p. 151-155, 2008.

AOAC. **Official methods of analysis**. Washington: Association of Official Analytical Chemists. 16.ed. 1025p. 1995.

AOSHIMA, H.; HAMAMOTO, K. Potentiation of GABAA receptors expressed in *Xenopus* oocytes by perfume and phytoncid. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 63, n. 4, p. 743-748, 1999.

ARMELIN, M. J. A. Aplicações da análise por ativação neutrônica para determinações multielementares em diferentes materiais. In: SILVA, P. S. C.; ZAHN, G. S.; SOUZA, F. A. (eds.). **Contribuições do reator IEA-R1 para a pesquisa nuclear**. Blucher Open Access, p. 413-420, 2022.

\*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002, 24p.

BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. 3. ed. Santa Maria: Editora UFSM. 2013. 353p.

BALDISSEROTTO, B.; PARODI, T. V.; STEVENS, E. D. Lack of postexposure analgesic efficacy of low concentrations of eugenol in zebrafish. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v. 45, n. 1, p. 48-56, 2018.

BALON, E. K. Origin and domestication of the wild carp, *Cyprinus carpio*: from Roman gourmets to the swimming flowers. **Aquaculture**, v. 129, n. 1-4, p. 3-48, 1995.

BARBAS, L. A. L.; TORRES, M. F.; DA COSTA, B. M. P.; FEITOSA, M. J. M.; MALTEZ, L. C.; AMADO, L. L.; TODA, Y. P. S.; BATISTA, P. S.; CABRAL, D. A. C.; HAMOY, M. Eugenol induces body immobilization yet evoking an increased neuronal excitability in fish during short-term baths. **Aquatic Toxicology**, v. 231, p. 105734, 2021.

BARTON, B. A.; IWAMA, G. K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 1, p. 3-26, 1991.

BARTON, B. A. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, v. 42, n. 3, p. 517-525, 2002.

BERNARDES JÚNIOR, J. J.; NAKAGOME, F. K.; MELLO, G. L. D.; GARCIA, S.; AMARAL JÚNIOR, H. Eugenol as an anesthetic for juvenile common snook. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, p. 1140-1144, 2013.

BIENZ, M.; PELHAM, H. R. B. Mechanisms of heat-shock gene activation in higher eukaryotes. **Advances in Genetics**, v. 24, p. 31-72, 1987.

BOLASINA, S. N.; DE AZEVEDO, A.; PETRY, A. C. Comparative efficacy of benzocaine, tricaine methanesulfonate and eugenol as anesthetic agents in the guppy *Poecilia vivipara*. **Aquaculture Reports**, v. 6, p. 56-60, 2017.

BRAITHWAITE, V. A.; BOULCOTT, P. Pain perception, aversion and fear in fish. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 75, n. 2, p. 131-138, 2007.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa nº 44, de 01 de agosto de 2019. Anexo. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 5 ago. 2019. Seção 1. Disponível em: < [http://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes\\_normativas/Anexo-RN-Peixes-ii.pdf](http://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Anexo-RN-Peixes-ii.pdf) >. Acesso: 25 fev. 2023.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C. T. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.

CAMERON, A. A.; PLENDERLEITH, M. B.; SNOW, P. J. Organization of the spinal cord in four species of elasmobranch fish: cytoarchitecture and distribution of serotonin and selected neuropeptides. **Journal of Comparative Neurology**, v. 297, n. 2, p. 201-218, 1990.

CARROLL, G. L. Analgesics and pain. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 29, n. 3, p. 701-717, 1999.

CARSTENS, E.; MOBERG, G. P. Recognizing pain and distress in laboratory animals. **Ilar Journal**, v. 41, n. 2, p. 62-71, 2000.



CERVERO, F.; WOOD, J. N. A history of pain research. In: WOOD, J. N. (ed.). **The Oxford Handbook of the Neurobiology of Pain**. New York: Oxford University Press, p. 1-28, 2020.

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

CHATIGNY, F.; CREIGHTON, C. M.; STEVENS, E. D. Intramuscular infiltration of a local anesthetic, lidocaine, does not result in adverse behavioural side effects in rainbow trout. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2018.

CHEN, J. History of pain theories. **Neuroscience Bulletin**, v. 27, n. 5, p. 343, 2011.

CHEZIK, K. A.; LESTER, N. P.; VENTURELLI, P. A. Fish growth and degree-days I: selecting a base temperature for a within-population study. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 71, n. 1, p. 47-55, 2013.

CHISTIYAKOV, D.; VORONOVA, N. Genetic evolution and diversity of common carp *Cyprinus carpio* L. **Central European Journal of Biology**, v. 4, n. 3, p. 304-312, 2009.

COCKREM, J. F. Individual variation in glucocorticoid stress responses in animals. **General and Comparative Endocrinology**, v. 181, p. 45-58, 2013.

COGGESHALL, R. E. et al. Organization of peripheral nerves and spinal roots of the Atlantic stingray, *Dasyatis sabina*. **Journal of Neurophysiology**, v. 41, n. 1, p. 97-107, 1978.

COYLE, S. D.; Durborow, R. M.; Tidwell, J. H. Anesthetics in aquaculture. **Texas: Southern Regional Aquaculture Center**, v. 3900, p. 1-6, 2004.

CROSBY, T. C.; PETTY, B. D.; HAMLIN, H. J.; GUILLETTE JR, L. J.; HILL, J. E.; HARTMAN, K. H.; YANONG, R. P. Plasma cortisol, blood glucose, and marketability of koi transported with metomidate hydrochloride. **North American Journal of Aquaculture**, v. 72, n. 2, p. 141-149, 2010.

CUNHA, M. A.; ZEPPENFELD, C. C.; GARCIA, L. D. O.; LORO, V. L.; FONSECA, M. B. D.; EMANUELLI, T.; VEECK, A. P. L.; COPATTI, C. E.; BALDISSEROTTO, B. Anesthesia of silver catfish with eugenol: time of induction, cortisol response and sensory analysis of fillet. **Ciência Rural**, v. 40, p. 2107-2114, 2010.

CURRIE, S.; TUFTS, B. Synthesis of stress protein 70 (Hsp70) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) red blood cells. **The Journal of Experimental Biology**, v. 200, n. 3, p. 607-614, 1997.

DAHLHOFF, E. P. Biochemical indicators of stress and metabolism: applications for marine ecological studies. **Annual Reviews of Physiology**, v. 66, p. 183-207, 2004.

DAWSON, V. K.; GILDERHUS, P. A. Ethyl-p-aminobenzoate (benzocaine): efficacy as an anesthetic for five species of freshwater fish. **U.S. Fish and Wildlife Service Investigations in Fish Control**, v. 87, p. 1-5, 1979.

DEANE, E. E.; KELLY, S. P.; LO, C. K. M.; WOO, N. Y. S. Effects of GH, prolactin and cortisol on hepatic heat shock protein 70 expression in a marine teleost *Sparus sarba*. **Journal of Endocrinology**, v. 161, n. 3, p. 413-422, 1999.

DEANE, E. E.; KELLY, S. P.; CHOW, I. N. K.; WOO, N. Y. S. Effect of a prolactin pharmacological stimulant (sulpiride) and suppressant (bromocriptine) on heat shock protein 70 expression in silver sea bream, *Sparus sarba*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 22, n. 2, p. 125-133, 2000.

DE OLIVEIRA, C. P. B. **Eugenol no manejo de pintado amazônico (*Pseudoplatystoma reticulatum* x *Leiarius marmoratus*) e no transporte de acará-bandeira (*Pterophyllum scalare*)**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal da Bahia. 69p. 2018.

DINIZ, L. S. M. Imobilização química em animais silvestres. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIAC, S.L.; BERNARDI, M.M. (eds). **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 4. ed. p.193-214, 2006.

DRABKIN, D. L.; AUSTIN, J. H. Preparation from washed blood cells; nitric oxide hemoglobin and sulphemoglobin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 112, n. 4, p. 51, 1935.

DUNLOP, R.; LAMING, P. Mechanoreceptive and nociceptive responses in the central nervous system of goldfish (*Carassius auratus*) and trout (*Oncorhynchus mykiss*). **The Journal of Pain**, v. 6, n. 9, p. 561-568, 2005.

EMERSON, K.; RUSSO, R. C.; LUND, R. E.; THURSTON, R. V. Aqueous ammonia equilibrium calculations: effect of pH and temperature. **Journal of the Fisheries Board of Canada**, v. 32, n. 12, p. 2379-2383, 1975.

FEDER, M. E.; HOFMANN, G. E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. **Annual Review of Physiology**, v. 61, n. 1, p. 243-282, 1999.

FERREIRA, J. T.; SMIT, G. L.; SCHOONBEE, H. J. The effect of the anaesthetic benzocaine hydrochloride on freshwater quality. **Water SA**, v. 5, n. 3, p. 123-127, 1979a.

FERREIRA, J. T.; SMIT, G. L.; SCHOONBEE, H. J.; HOLZAPFEL, C. W. Comparison of anesthetic potency of benzocaine hydrochloride and MS-222 in two freshwater fish species. **The Progressive Fish-Culturist**, v. 41, n. 3, p. 161-163, 1979b.

FERREIRA, J. T.; SMIT, G. L.; SCHOONBEE, H. J. Haematological evaluation of the anaesthetic benzocaine hydrochloride in the freshwater fish *Cyprinus carpio* L. **Journal of Fish Biology**, v. 18, n. 3, p. 291-297, 1981.

FERREIRA, J. T.; SCHOONBEE, H. J.; SMIT, G. L. The uptake of the anaesthetic benzocaine hydrochloride by the gills and the skin of three freshwater fish species. **Journal of Fish Biology**, v. 25, n. 1, p. 35-41, 1984.

FILICIOTTO, F.; BUSCAINO, G.; BUFFA, G.; BELLANTE, A.; MACCARRONE, V.; MAZZOLA, S. Anaesthetic qualities of eugenol and 2-phenoxyethanol and their effect on some haematological parameters in farmed European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 11, n. 4, p. 494-502, 2012.

FLAJŠHANS, M.; HULATA, G. Common carp - *Cyprinus carpio*. In: SVÅSAND, T., CROSETTI, D., GARCÍA-VÁZQUEZ, E., VERSPOOR, E. **Genetic Impact of Aquaculture Activities on Native Populations**. European Commission. p. 32-39. 2007.

FLIK, G.; STOUTHART, X. J.; SPANINGS, F. T.; LOCK, R. A.; FENWICK, J. C.; BONGA, S. E. W. Stress response to waterborne Cu during early life stages of carp, *Cyprinus carpio*. **Aquatic Toxicology**, v. 56, n. 3, p. 167-176, 2002.

FLIK, G.; KLAREN, P. H.; VAN DEN BURG, E. H.; METZ, J. R.; HUISING, M. O. CRF and stress in fish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 146, n. 1, p. 36-44, 2006.

FRICKE, R.; ESCHMEYER, W. N.; VAN DER LAAN, R. **Eschmeyer's catalog of fishes: genera, species, references**. 2023. Disponível em: <<https://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>>. Acesso: 23 maio 2023.

GENTEN, F.; TERWINGHE, E.; DANGUY, A. **Atlas of fish histology**. United Kingdom: Taylor and Francis. 2009. 224p.

GESTO, M.; LÓPEZ-PATIÑO, M. A.; HERNÁNDEZ, J.; SOENGAS, J. L.; MÍGUEZ, J. M. Gradation of the stress response in rainbow trout exposed to stressors of different severity: the role of brain serotonergic and dopaminergic systems. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 27, n. 2, p. 131-141, 2015.

GLADDEN, J. N.; BRAINARD, B. M.; SHELTON, J. L.; CAMUS, A. C.; DIVERS, S. J. Evaluation of isoeugenol for anesthesia in koi carp (*Cyprinus carpio*). **American Journal of Veterinary Research**, v. 71, n. 8, p. 859-866, 2010.

GOMES, A.; BERGAMIN, G. T.; DA SILVA, T. B.; VEIVERBERG, C. A.; NEIS, A. S. K. T. Validação do glicosímetro portátil na dosagem de glicose sanguínea em peixes: resultados preliminares. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, Universidade Federal do Pampa – campus Santana do Livramento, v. 9, n. 2, 2017.

GOMULKA, P.; WŁASOW, T.; VELÍŠEK, J.; SVOBODOVÁ, Z.; CHMIELINSKA, E. Effects of eugenol and MS-222 anaesthesia on Siberian sturgeon *Acipenser baerii* Brandt. **Acta Veterinaria Brno**, v. 77, n. 3, p. 447-453, 2008.

GRIMELIUS, L. Silver stains demonstrating neuroendocrine cells. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 79, n. 1, p. 37-44, 2004.

GROFF, J. M.; ZINKL, J. G. Hematology and clinical chemistry of cyprinid fish: common carp and goldfish. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 2, n. 3, p. 741-776, 1999.

GUÉNETTE, S. A.; UHLAND, F. C.; HÉLIE, P.; BEAUDRY, F.; VACHON, P. Pharmacokinetics of eugenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 266, n. 1-4, p. 262-265, 2007.

GUERRA, R. R.; SANTOS, N. P.; CECARELLI, P.; SILVA, J. R. M. C.; HERNANDEZ BLAZQUEZ, F. J. Healing of skin wounds in the African catfish *Clarias gariepinus*. **Journal of Fish Biology**, v. 73, p. 572-583, 2008.

HALATA, Z.; GRIM, M.; BAUMAN, K. I. Friedrich Sigmund Merkel and his "Merkel cell", morphology, development, and physiology: review and new results. **The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology: An Official Publication of the American Association of Anatomists**, v. 271, n. 1, p. 225-239, 2003.

HARMS, C. A.; LEWBART, G. A.; SWANSON, C. R.; KISHIMORI, J. M.; BOYLAN, S. M. Behavioral and clinical pathology changes in koi carp (*Cyprinus carpio*) subjected to anesthesia and surgery with and without intra-operative analgesics. **Comparative Medicine**, v. 55, n. 3, p. 221-226, 2005.

HARPER, C.; WOLF, J. C. Morphologic effects of the stress response in fish. **ILAR Journal**, v. 50, n. 4, p. 387-396, 2009.

HAYTON, W. L.; SZOKE, A.; KEMMENOE, B. H.; VICK, A. M. Disposition of benzocaine in channel catfish. **Aquatic Toxicology**, v. 36, n. 1-2, p. 99-113, 1996.

HE, R.; LEI, B.; SU, Y.; WANG, A.; CUI, K.; SHI, X.; CHEN, X. Effectiveness of eugenol as an anesthetic for adult spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*). **Aquaculture**, v. 523, p. 735180, 2020.

HELMS, J. E.; BARONE, C. P. Physiology and treatment of pain. **Critical Care Nurse**, v. 28, n. 6, p. 38-49, 2008.

HEO, G. J.; SHIN, G. Efficacy of benzocaine as an anaesthetic for Crucian carp (*Carassius carassius*). **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v. 37, n. 2, p. 132-135, 2010.

HIKASA, Y.; TAKASE, K.; OGASAWARA, T.; OGASAWARA, S. Anesthesia and recovery with tricaine methanesulfonate, eugenol and thiopental sodium in the carp, *Cyprinus carpio*. **The Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 48, n. 2, p. 341-351, 1986.

HISHIYA, A.; TAKAYAMA, S. Molecular chaperones as regulators of cell death. **Oncogene**, v. 27, n. 50, p. 6489-6506, 2008.

HOSEINI, S. M.; RAJABIESTERABADI, H.; TARKHANI, R. Anaesthetic efficacy of eugenol on iridescent shark, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage, 1878) in different size classes. **Aquaculture Research**, v. 46, n. 2, p. 405-412, 2015.

HRUBEC, T. C.; SMITH, S. A. **Hematology of fishes**. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. (eds). Schalm's Veterinary Hematology. Ames: Wiley-Blackwell. 6. ed. p. 994-1003. 2010.

HUEY, D. W.; BEITINGER, T. L. Methemoglobin levels in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, exposed to nitrite and tricaine methanesulfonate. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 39, n. 4, p. 643-645, 1982.

HUGGETT, J.; DHEDA, K.; BUSTIN, S.; ZUMLA, A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. **Genes & Immunity**, v. 6, n. 4, p. 279-284, 2005.

IMAGAWA, T.; HASHIMOTO, Y.; KITAGAWA, H.; KON, Y.; KUDO, N.; SUGIMURA, M. Morphology of blood cells in carp (*Cyprinus carpio* L.). **The Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 51, n. 6, p. 1163-1172, 1989.

IWAMA, G. K.; VIJAYAN, M. M.; FORSYTH, R. B.; ACKERMAN, P. A. Heat shock proteins and physiological stress in fish. **American Zoologist**, v. 39, n. 6, p. 901-909, 1999.

JENSCH-JUNIOR, B. E.; PRESSINOTTI, L. N.; BORGES, J. C.; SILVA, J. R. M. C. Characterization of Macrophages Phagocytosis of the Tropical Fish *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881). **Aquaculture**, v. 251, p. 509-515, 2005.

JONES, R. S. A history of veterinary anaesthesia. **Anales de Veterinaria** (Murcia), vol. 18, p. 7-15, 2002.

JUNQUEIRA, L. C. U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **The Histochemical Journal**, v. 11, n. 4, p. 447-455, 1979.

KEY, B. Fish do not feel pain and its implications for understanding phenomenal consciousness. **Biology & Philosophy**, v. 30, n. 2, p. 149-165, 2015.

KHANI, M.; SOLTANI, M.; MEHRJAN, M. S.; FOROUDI, F.; GHAENI, M. The effect of *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Volvocales) microalga on some hematological and immune system parameters of Koi carp (*Cyprinus carpio*). **Iranian Journal of Ichthyology**, v. 4, n. 1, p. 62-68, 2017.

KHAIR-UL-BARIYAH, S.; ARSHAD, M.; ALI, M.; DIN, M. I.; SHARIF, A.; AHMED, E. Benzocaine: Review on a Drug with Unfold Potential. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 1, p. 3-11, 2020.

KHOSRAVI-KATULI, K.; SHABANI, A.; PAKNEJAD, H.; IMANPOOR, M. R. Comparative toxicity of silver nanoparticle and ionic silver in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*): accumulation, physiology and histopathology. **Journal of Hazardous Materials**, v. 359, p. 373-381, 2018.

KIANG, J. G.; TSOKOS, G. C. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 80, n. 2, p. 183-201, 1998.

KIESSLING, A.; JOHANSSON, D.; ZAHL, I. H.; SAMUELSEN, O. B. Pharmacokinetics, plasma cortisol and effectiveness of benzocaine, MS-222 and isoeugenol measured in individual dorsal aorta-cannulated Atlantic salmon (*Salmo salar*) following bath administration. **Aquaculture**, v. 286, n. 3-4, p. 301-308, 2009.

KITCHEN, R. R.; KUBISTA, M.; TICHOPAD, A. Statistical aspects of quantitative real-time PCR experiment design. **Methods**, v. 50, n. 4, p. 231-236, 2010.



KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. Patofisiologia da dor. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, n. 1, 2008.

KONDERA, E. Haematopoiesis in the head kidney of common carp (*Cyprinus carpio* L.): a morphological study. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 37, n. 3, p. 355-362, 2011.

KUMAR, M. V. Morphometric studies of blood cells in *Cyprinus carpio*, *Ctenopharyngodon idella* and *Hypophthalmichthys molitrix* cultured fish in west Godavari region of Andhra Pradesh. **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**, v. 4, n. 5, p. 489-493, 2016.

LAI, N. C.; SHABETAI, R.; GRAHAM, J. B.; HOIT, B. D.; SUNNERHAGEN, K. S.; BHARGAVA, V. Cardiac function of the leopard shark, *Triakis semifasciata*. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 160, n. 3, p. 259-268, 1990.

LAMONT, L. A.; TRANQUILLI, W. J.; GRIMM, K. A. Physiology of pain. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 30, n. 4, p. 703-728, 2000.

LE, Q.; HU, J.; CAO, X.; KUANG, S.; ZHANG, M.; YU, N.; ZHENG, H.; WANG, Y.; LIU, H.; YAN, X. Transcriptomic and cortisol analysis reveals differences in stress alleviation by different methods of anesthesia in Crucian carp (*Carassius auratus*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 84, p. 1170-1179, 2019.

LEONARD, R. B. Primary afferent receptive field properties and neurotransmitter candidates in a vertebrate lacking unmyelinated fibers. **Progress in Clinical and Biological Research**, v. 176, p. 135-145, 1985.

LEONARDI, F.; ZANICHELLI, S.; BOTTI, P. Pain in the animals: diagnosis, treatment and prevention. **Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Parma**, v. 26, p. 45-66, 2006.

LI, J.; ZHANG, J.; LIU, Y. Optimization of solid-phase-extraction cleanup and validation of quantitative determination of eugenol in fish samples by gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 21, p. 6563-6568, 2015.

LIU, C. C.; LI, L.; LAM, Y. W.; SIU, C. W.; CHENG, S. H. Improvement of surface ECG recording in adult zebrafish reveals that the value of this model exceeds our expectation. **Scientific Reports**, v. 6, p. 25073, 2016.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LIVINGSTON, A. Ethical issues regarding pain in animals. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 221, n. 2, p. 229-232, 2002.

LUNDQVIST, M.; ARNBERG, H.; CANDELL, J.; MALMGREN, M.; WILANDER, E.; GRIMELIUS, L.; ÖBERG, K. Silver stains for identification of neuroendocrine cells. A study of the chemical background. **The Histochemical Journal**, v. 22, p. 615-623, 1990.

MACHIN, K. L. Fish, amphibian, and reptile analgesia. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 4, n. 1, p. 19-33, 2001.

MARK, F.C.; BOCK, C.; PORTNER, H. O. Oxygen-limited thermal tolerance in Antarctic fish investigated by MRI and <sup>31</sup>P-MRS. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 283, n. 5, p. R1254-R1262, 2002.

MARTINS, T.; VALENTIM, A.; PEREIRA, N.; ANTUNES, L. M. Anaesthetics and analgesics used in adult fish for research: A review. **Laboratory Animals**, v. 53, n. 4, p. 325-341, 2019.

MAYER, M. P.; BUKAU, B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, n. 6, p. 670-684, 2005.

MEINERTZ, J. R.; GINGERICH, W. H.; ALLEN, J. L. Metabolism and elimination of benzocaine by rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Xenobiotica**, v. 21, n. 4, p. 525-533, 1991.

MEINERTZ, J. R.; STEHLY, G. R.; GINGERICH, W. H. Metabolism, elimination, and pharmacokinetics of the fish anesthetic benzocaine. In: SMITH, D. J.; GINGERICH, W. H.; BECONI-BARKER, M. G. **Xenobiotics in Fish**. Boston: Springer, 1999. p. 189-200.

MOHAMED, S. J. Comparative efficacy of four anesthetics on common carp *Cyprinus carpio* L. **Acta Ichthyologica et Piscatoria**, v. 29, n. 2, p. 91-97, 1999.

MONTEIRO, B. P.; LASCELLES, B. D. X.; MURRELL, J.; ROBERTSON, S.; STEAGALL, P. V. M.; WRIGHT, B. 2022 WSAVA guidelines for the recognition, assessment and treatment of pain. **Journal of Small Animal Practice**, 2022 (no prelo).

MORIMOTO, R. I.; SARGE, K. D.; ABRAVAYA, K. Transcriptional regulation of heat shock genes. A paradigm for inducible genomic responses. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 31, p. 21987-21990, 1992.

NARDOCCI, G.; NAVARRO, C.; CORTÉS, P. P.; IMARAI, M.; MONTOYA, M.; VALENZUELA, B.; JARA, P.; ACUÑA-CASTILLO, C.; FERNÁNDEZ, R. Neuroendocrine mechanisms for immune system regulation during stress in fish. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 40, n. 2, p. 531-538, 2014.

NORDGREEN, J.; HORSBERG, T. E.; RANHEIM, B.; CHEN, A. C. Somatosensory evoked potentials in the telencephalon of Atlantic salmon (*Salmo salar*) following galvanic stimulation of the tail. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 193, n. 12, p. 1235-1242, 2007.

NRC. **Nutrient requirements of fish and shrimp**. National Research Council. Washington: The National Academies Press, 378p, 2011.

ÖĞRETMEN, F.; GÖLBASI, S.; KUTLUYER, F. Efficacy of clove oil, benzocaine, eugenol, 2-phenoxyethanol as anaesthetics on shabbout fish (*Barbus grypus* Heckel, 1843). **Iranian Journal of Fisheries Sciences**, v. 15, n. 1, p. 470-478, 2016.

PALIĆ, D.; HEROLT, D. M.; ANDREASEN, C. B.; MENZEL, B. W.; ROTH, J. A. Anesthetic efficacy of tricaine methanesulfonate, metomidate and eugenol: effects on plasma cortisol concentration and neutrophil function in fathead minnows (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820). **Aquaculture**, v. 254, n. 1-4, p. 675-685, 2006.

PALMEIRO, B. S.; ROSENTHAL, K. L.; LEWBART, G. A.; SHOFER, F. S. Plasma biochemical reference intervals for koi. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 230, n. 5, p. 708-712, 2007.

PANKHURST, N. W. The endocrinology of stress in fish: an environmental perspective. **General and Comparative Endocrinology**, v. 170, n. 2, p. 265-275, 2011.

PARKER-GRAHAM, C. A.; LIMA, K. M.; SOTO, E. The effect of anesthetic time and concentration on blood gases, acid-base status, and electrolytes in koi (*Cyprinus carpio*) anesthetized with buffered tricaine methanesulfonate (MS-222). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 51, n. 1, p. 102-109, 2020.

PATTANASIRI, T.; TAPARHUDEE, W.; SUPPAKUL, P. Acute toxicity and anaesthetic effect of clove oil and eugenol on Siamese fighting fish, *Betta splendens*. **Aquaculture International**, v. 25, n. 1, p. 163-175, 2017.

PATTERSON, C.; JOHNSON, G. D. **The intermuscular bones and ligaments of teleostean fishes**. Washington: Smithsonian Institute Press. 1995.

PFAFFL, M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. e45, 2001.

PFAFFL, M. W.; TICHOPAD, A.; PRGOMET, C.; NEUVIANS, T. P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters**, v. 26, p. 509-515, 2004.

PFEIFFER, W. The distribution of fright reaction and alarm substance cells in fishes. **Copeia**, v. 1977, n. 4, p. 653-665, 1977.

PICKERING, A. D. Endocrine-induced pathology in stressed salmonid fish. **Fisheries Research**, v. 17, n. 1-2, p. 35-50, 1993.

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**, v. 57, n. 3-4, p. 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**, v. 24, n. 9, p. 2335-2342, 2004.

POTTINGER, T. G. Changes in blood cortisol, glucose and lactate in carp retained in anglers' keepnets. **Journal of Fish Biology**, v. 53, n. 4, p. 728-742, 1998.

PRABHU, P. A. J.; SCHRAMA, J. W.; KAUSHIK, S. J. Mineral requirements of fish: a systematic review. **Reviews in Aquaculture**, v. 8, n. 2, p. 172-219, 2016.

RADU, D.; OPREA, L.; BUCUR, C.; COSTACHE, M.; OPREA, D. Characteristics of haematological parameters for carp culture and Koi (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758) reared in an intensive system. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 66, p. 1-2, 2009.

RAKERS, S.; GEBERT, M.; UPPALAPATI, S.; MEYER, W.; MADERSON, P.; SELL, A. F.; KRUSE, C.; PAUS, R. 'Fish matters': the relevance of fish skin biology to investigative dermatology. **Experimental Dermatology**, v. 19, n. 4, p. 313-324, 2010.

RAMÍREZ, G. A.; DE LOS MONTEROS, A. E. Study on the Role of Histochemical Stains in Identifying Merkel Cells in Dogs. **The Anatomical Record**, v. 302, n. 8, p. 1458-1464, 2019.

RINK, E.; WULLIMANN, M. F. Connections of the ventral telencephalon (subpallium) in the zebrafish (*Danio rerio*). **Brain Research**, v. 1011, n. 2, p. 206-220, 2004.

ROSE, J. D.; ARLINGHAUS, R.; COOKE, S. J.; DIGGLES, B. K.; SAWYNOK, W.; STEVENS, E. D.; WYNNE, C. D. L. Can fish really feel pain? **Fish and Fisheries**, v. 15, n. 1, p. 97-133, 2014.

ROSS, L. G.; ROSS, B. **Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals**. Oxford: Blackwell Publishing Inc. 2008. 240p.

ROUBACH, R.; GOMES, L. C.; LEÃO FONSECA, F. A.; VAL, A. L. Eugenol as an efficacious anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier). **Aquaculture Research**, v. 36, n. 11, p. 1056-1061, 2005.

SAHOO, G.; SINHA, M. K.; NAYAK, Y. Studies on biology, seed production and rearing of *Cyprinus carpio robrofuscus* (Koi carp). **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**, v. 8, n. 2, p. 633-638, 2020.

SAINT-ERNE, N. Diagnostic techniques and treatments for internal disorders of koi (*Cyprinus carpio*). **Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice**, v. 13, n. 3, p. 333-347, 2010.

SAUNDERS, J.; SPEARE, D. J.; MCCONKEY, S. Methemoglobin concentrations in three salmonid species following exposure to benzocaine or tricaine methanesulfonate. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 6, p. 2257-2263, 2020.

SCHAIBLE, H-G; RICHTER, F. Pathophysiology of pain. **Langenbeck's Archives of Surgery**, v. 389, p. 237-243, 2004.

SCHNEIDER, M.; LANGENMAYER, M.; HOEDT, W.; KÖLLE, P. Physiologic laboratory parameters of adult pond-kept koi (*Cyprinus carpio*) in Southern Germany –Influence of season and sex. **Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift**, v. 134, 2021.

SCHRECK, C. B. Immunomodulation: endogenous factors. Em: IWAMA, G.; NAKANISHI, T. (Eds). **Hoar and Randall's Fish Physiology**, vol. 15, p. 311-337. Nova Iorque: Academic Press. 1996.

SELYE, H. Stress and the general adaptation syndrome. **British Medical Journal**, v. 1, n. 4667, p. 1383-1392, 1950.

SHEPHARD, K. L. Functions for fish mucus. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 4, n. 4, p. 401-429, 1994.

SHORT, C. E. Fundamentals of pain perception in animals. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 59, n. 1-3, p. 125-133, 1998.

SILVA, J. R. M. C.; STAINES, N. A.; PARRA, O. M.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J. Experimental studies on the response of the fish (*Notothenia coriiceps* Richardson, 1844) to parasite (*Pseudoterranova decipiens* Krabbe, 1878) and other irritant stimuli at Antarctic temperatures. **Polar Biology**, v. 22, p. 417-424, 1999.

SILVA, J. R. M. C.; STAINES, N. A.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J.; PORTO-NETO, L. R.; BORGES, J. C. S. Phagocytosis and giant cell formation at 0 °C by macrophage (MØ) of *Notothenia coriiceps*. **Journal of Fish Biology**, v. 60, n. 2, p. 466-478, 2002.

SILVA, J. R. M. C.; SINHORINI, I. L.; JENSCH-JUNIOR, B. E.; PORTO-NETO, L. R.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J.; VELLUTINI, B. C.; PRESSINOTTI, L. N.; PINTO, F.A.C; COOPER, E. L.; BORGES, J. C. S. Kinetics of induced wound repair at 0 °C in the Antarctic fish (Cabeçuda) *Notothenia coriiceps*. **Polar Biology**, v. 27, p. 458-465, 2004.

SILVA, J. R. M. C.; COOPER, E. L.; SINHORINI, I. L.; BORGES, J.C.S; JENSCH-JUNIOR, B. E.; PORTO-NETO, L. R.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, B. E. VELLUTINI; B. C.; PRESSINOTTI, L. N.; COSTA-PINTO, B. C. Microscopical Study of Experimental Wound Healing in (Cabeçuda) *Notothenia coriiceps* at 0°C. **Cell and Tissue Research**, v. 321, n. 3, 401-410, 2005a.

SILVA, J. R. M. C.; PORTO-NETO, L.; BORGES, J. C. S.; JENSCH-JUNIOR, B. E. Germicide Capacity of Macrophages in the Antarctic Fish *Notothenia coriiceps* (Richardson, 1844) at 0 °C. Short Communication. **Polar Biology**, v. 28, n. 4, p. 326-328, 2005.

SILVA, J. R. M. C.; PRESSINOTTI, L. N.; JENSCH-JUNIOR, B. E.; COSTA-PINTO, B. C.; BORGES, J. C. S. Angiogenesis at 0°C induced lesion in the cornea of the Antarctic fish - *Notothenia coriiceps* (Richardson, 1844). **Revista Antártica Brasileira**, v. 5, p. 153-162, 2012.



SNEDDON, L. U.; BRAITHWAITE, V. A.; GENTLE, M. J. Do fishes have nociceptors? Evidence for the evolution of a vertebrate sensory system. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1520, p. 1115-1121, 2003a.

SNEDDON, L. U.; BRAITHWAITE, V. A.; GENTLE, M. J. Novel object test: examining nociception and fear in the rainbow trout. **The Journal of Pain**, v. 4, n. 8, p. 431-440, 2003b.

SNEDDON, L. U. Pain in aquatic animals. **Journal of Experimental Biology**, v. 218, n. 7, p. 967-976, 2015.

SNOW, P. J.; PLENDERLEITH, M. B.; WRIGHT, L. L. Quantitative study of primary sensory neurone populations of three species of elasmobranch fish. **Journal of Comparative Neurology**, v. 334, n. 1, p. 97-103, 1993.

SNOW, P. J.; RENSHAW, G. M.C.; HAMLIN, K. E. Localization of enkephalin immunoreactivity in the spinal cord of the long-tailed ray *Himantura fai*. **Journal of Comparative Neurology**, v. 367, n. 2, p. 264-273, 1996.

SOIVIO, A.; NYHOLM, K.; HUHTI, M. Effects of anaesthesia with MS 222, neutralized MS 222 and benzocaine on the blood constituents of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Journal of Fish Biology**, v. 10, n. 1, p. 91-101, 1977.

STEHLY, G. R.; MEINERTZ, J. R.; GINGERICH, W. H. Effect of temperature on the pharmacokinetics of benzocaine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after bath exposures. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 21, n. 2, p. 121-127, 1998.

STOLTE, E. H.; DE MAZON, A. F.; LEON-KOOSTERZIEL, K. M.; JESIAK, M.; BURY, N.; STURM, A.; SVELKOU, H. F. J.; LIDY VERBURG VAN KEMENADE, B. M.; FLIK, G. Corticosteroid receptors involved in stress regulation in common carp, *Cyprinus carpio*. **Journal of Endocrinology**, v. 198, p. 403-417, 2008a.

STOLTE, E. H.; NABUURS, S. B.; BURY, N. R.; STURM, A.; FLIK, G.; SAVELKOUL, H. F.; VERBURG-VAN KEMENADE, B. L. Stress and innate immunity in carp: corticosteroid receptors and pro-inflammatory cytokines. **Molecular Immunology**, v. 46, n. 1, p. 70-79, 2008b.

STOLTE, E. H.; CHADZINSKA, M.; PRZYBYLSKA, D.; FLIK, G.; SAVELKOUL, H. F.; VERBURG-VAN KEMENADE, B. L. The immune response differentially regulates Hsp70 and glucocorticoid receptor expression in vitro and in vivo in common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 27, n. 1, p. 9-16, 2009.

STRIEDTER, G. F. **Principles of Brain Evolution**. 1ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2005.

TACHIBANA, T.; ISHIZEKI, K.; SAKAKURA, Y.; NAWA, T. Ultrastructural evidence for a possible secretory function of Merkel cells in the barbels of a teleost fish, *Cyprinus carpio*. **Cell and Tissue Research**, v. 235, p. 695-697, 1984.

TAGO, A.; YOKOYAMA, S.; ISHIKAWA, M.; KOSHIO, S. Pharmacokinetics of eugenol in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 49, n. 4, p. 780-787, 2018.

TAKEUCHI, T.; SATOH, S.; KIRON, V. Common carp, *Cyprinus carpio*. In: WEBSTER, C. D.; LIM, C. **Nutrient Requirements and Feeding of finfish for Aquaculture**. New York: CAB International, p. 245-261, 2002.

TARKHANI, R.; IMANI, A.; JAMALI, H.; MOGHANLOU, K. S. Anaesthetic efficacy of eugenol on Flowerhorn (*Amphilophus labiatus* x *Amphilophus trimaculatus*). **Aquaculture Research**, v. 48, n. 6, p. 3207-3215, 2017.

TICHOPAD, A.; BAR, T.; EDLING, M.; SVANBERG, B.; NOLAN, T.; BERGKVIST, A. Experiment design, data management, and univariate statistical analysis of gene-expression data obtained by Real-Time quantitative PCR. In: NOLAN, T.; BUSTIN, S. A. (eds.). **PCR Technologies: Current Innovations**. Boca Raton: CRC Press, 3 rd. ed., p. 245-258, 2013.

TORT, L. Stress and immune modulation in fish. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 35, n. 12, p. 1366-1375, 2011.

TRANQUILLI, W. J.; GRIMM, K. A. Introduction: use, definitions, history, concepts, classification, and considerations for anesthesia and analgesia. In: GRIMM, K. A.; LAMONT, L. A.; TRANQUILLI, W. J.; GREENE, S. A.; ROBERTSON, S. A. (eds.). **Veterinary Anesthesia and Analgesia: The Fifth Edition of Lumb and Jones**. New Jersey: John Wiley & Sons, p. 1-10, 2015.

TREVES-BROWN, K. M. **Applied Fish Pharmacology**. Dordrecht: Springer, p. 206-219, 2000.

TRIPATHI, N. K.; LATIMER, K. S.; BURNLEY, V. V. Hematologic reference intervals for koi (*Cyprinus carpio*), including blood cell morphology, cytochemistry, and ultrastructure. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 33, n. 2, p. 74-83, 2004.

UCHIMURA, T.; HARA, S.; YAZAWA, T.; KAMEI, Y.; KITANO, T. Involvement of heat shock proteins on the transcriptional regulation of corticotropin-releasing hormone in medaka. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, p. 520-529, 2019.

UENO, S.; YOSHIKAWA, H.; ISHIDA, Y.; MITSUDA, H. Electrocardiograms recorded from the body surface of the carp, *Cyprinus carpio*. **Comparative Biochemistry and Physiology. A, Comparative Physiology**, v. 85, n. 1, p. 129-133, 1986.

VAN DER LINDEN, A.; VAN CAMP, N.; RAMOS-CABRER, P.; HOEHN, M. Current status of functional MRI on small animals: application to physiology, pathophysiology, and cognition. **NMR in Biomedicine: An International Journal Devoted to the Development and Application of Magnetic Resonance In vivo**, v. 20, n. 5, p. 522-545, 2007.

VELÍŠEK, J.; SVOBODOVÁ, Z. Anaesthesia of common carp (*Cyprinus carpio* L.) with 2-phenoxyethanol: acute toxicity and effects on biochemical blood profile. **Acta Veterinaria Brno**, v. 73, n. 2, p. 247-252, 2004.

VELISEK, J.; SVOBODOVÁ, Z.; PIACKOVA, V.; GROCH, L.; NEPEJHALOVA, L. Effects of clove oil anaesthesia on common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Veterinarni Medicina**, v. 50, n. 6, p. 269-275, 2005.

VELÍŠEK, J.; STEJSKAL, V.; KOUŘIL, J.; SVOBODOVÁ, Z. Comparison of the effects of four anaesthetics on biochemical blood profiles of perch. **Aquaculture Research**, v. 40, n. 3, p. 354-361, 2009.

VIDAL, L. V. O.; ALBINATI, R. C. B.; ALBINATI, A. C. L.; DE MECÊDO, G. R. Utilização do eugenol como anestésico para o manejo de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 28, n. 3, p. 275-279, 2006.

VIDAL, L. V. O.; FURUYA, W. M.; GRACIANO, T. S.; SCHAMBER, C. R.; DOS SANTOS, L. D.; SOARES, C. M. Concentrações de eugenol para anestesia profunda e toxicidade aguda em juvenis de piavuçu (*Leporinus macrocephalus*). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 29, n. 4, p. 357-362, 2007a.

VIDAL, L. V. O.; ALBINATI, R. C. B.; SANTOS NETO, E. B.; DEUS, B. T.; ALBINATI, A. C. L. Influência do peso de juvenis de matrinxã (*Brycon cephalus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*) à ação anestésica do eugenol. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.8, n.3, p. 212-216, 2007b.

VIDAL, L. V. O.; ALBINATI, R. C. B.; ALBINATI, A. C. L.; DE LIRA, A. D.; DE ALMEIDA, T. R.; SANTOS, G. B. Eugenol como anestésico para a tilápia-do-Nilo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 8, p. 1069-1074, 2008.

WATANABE, T.; KIRON, V.; SATOH, S. Trace minerals in fish nutrition. **Aquaculture**, v. 151, n. 1-4, p. 185-207, 1997.

WEARY, D. M. NIEL, L.; FLOWER, F. C.; FRASER, D. Identifying and preventing pain in animals. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 100, n. 1-2, p. 64-76, 2006.

WEBER, E. S. Fish analgesia: pain, stress, fear aversion, or nociception? **Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice**, v. 14, n. 1, p. 21-32, 2011.

WEDEMEYER, G. Stress of anesthesia with MS 222 and benzocaine in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Journal of the Fisheries Board of Canada**, v. 27, n. 5, p. 909-914, 1970.

WENDELAAR BONGA, S. E. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, v. 77, n. 3, p. 591-625, 1997.

WHITEAR, M. Merkel cells in lower vertebrates. **Archives of Histology and Cytology**, v. 52, n. Supplement, p. 415-422, 1989.

WILSON, D. N.; NIERHAUS, K. H. Ribosomal proteins in the spotlight. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, n. 5, p. 243-267, 2005.

WITESKA, M. Erythrocytes in teleost fishes: a review. **Zoology and Ecology**, v. 23, n. 4, p. 275-281, 2013.

WITESKA, M.; DUDYK, J.; JARKIEWICZ, N. Haematological effects of 2-phenoxyethanol and etomidate in carp (*Cyprinus carpio* L.). **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v. 42, n. 5, p. 537-546, 2015.

WITESKA, M.; LUGOWSKA, K.; KONDERA, E. Reference values of hematological parameters for juvenile *Cyprinus carpio*. **Bulletin of the European Association of Fish Pathologists**, v. 36, n. 4, p. 169-180, 2016.

WITESKA, M.; KONDERA, E.; ŁUGOWSKA, K.; BOJARSKI, B. Hematological methods in fish—Not only for beginners. **Aquaculture**, v. 547, p. 737498, 2022.

WOJTASZEK, J.; DZIEWULSKA-SZWAJKOWSKA, D.; ŁOZIŃSKA-GABSKA, M.; ADAMOWICZ, A.; DŻUGAJ, A. Hematological effects of high dose of cortisol on the carp (*Cyprinus carpio* L.): cortisol effect on the carp blood. **General and Comparative Endocrinology**, v. 125, n. 2, p. 176-183, 2002.

YANG, B. H.; PIAO, Z. G.; KIM, Y. B.; LEE, C. H.; LEE, J. K.; PARK, K.; KIM, J. S.; OH, S. B. Activation of vanilloid receptor 1 (VR1) by eugenol. **Journal of Dental Research**, v. 82(10), p. 781-785, 2003.

YARON, Z. Endocrine control of gametogenesis and spawning induction in the carp. **Aquaculture**, v. 129, n. 1-4, p. 49-73, 1995.

YUAN, J. S.; REED, A.; CHEN, F.; STEWART, C. N. Statistical analysis of real-time PCR data. **BMC Bioinformatics**, v. 7, p. 1-12, 2006.

YUE, S.; MOCCIA, R. D.; DUNCAN, I. J. H. Investigating fear in domestic rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, using an avoidance learning task. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 87, n. 3-4, p. 343-354, 2004.

YUE, S.; DUNCAN, I. J. H.; MOCCIA, R. D. Investigating fear in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using the conditioned-suppression paradigm. **Journal of Applied Animal Welfare Science**, v. 11, n. 1, p. 14-27, 2008.

ZACCONE, G. Neuron-specific enolase and serotonin in the Merkel cells of conger-eel (*Conger conger*) epidermis. **Histochemistry**, v. 85, n. 1, p. 29-34, 1986.

ZACCONE, G.; FASULO, S.; AINIS, L. Distribution patterns of the paraneuronal endocrine skin, gills and the airways of fishes as by immunohistochemical and methods. **Histochemical Journal**, v. 26, p. 609-629, 1994.

ZAHL, I. H.; KIESSLING, A.; SAMUELSEN, O. B.; HANSEN, M. K. Anaesthesia of Atlantic cod (*Gadus morhua*) - effect of pre-anaesthetic sedation, and importance of body weight, temperature and stress. **Aquaculture**, v. 295, n. 1-2, p. 52-59, 2009.

ZAHL, I. H.; KIESSLING, A.; SAMUELSEN, O. B.; HANSEN, M. K. Anaesthesia of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). Effect of pre-anaesthetic sedation, and importance of body weight and water temperature. **Aquaculture Research**, v. 42, n. 9, p. 1235-1245, 2011.

ZAHL, I. H.; SAMUELSEN, O.; KIESSLING, A. Anaesthesia of farmed fish: implications for welfare. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 1, p. 201-218, 2012.