




# PEIXES NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL



**Quem são os peixes???**



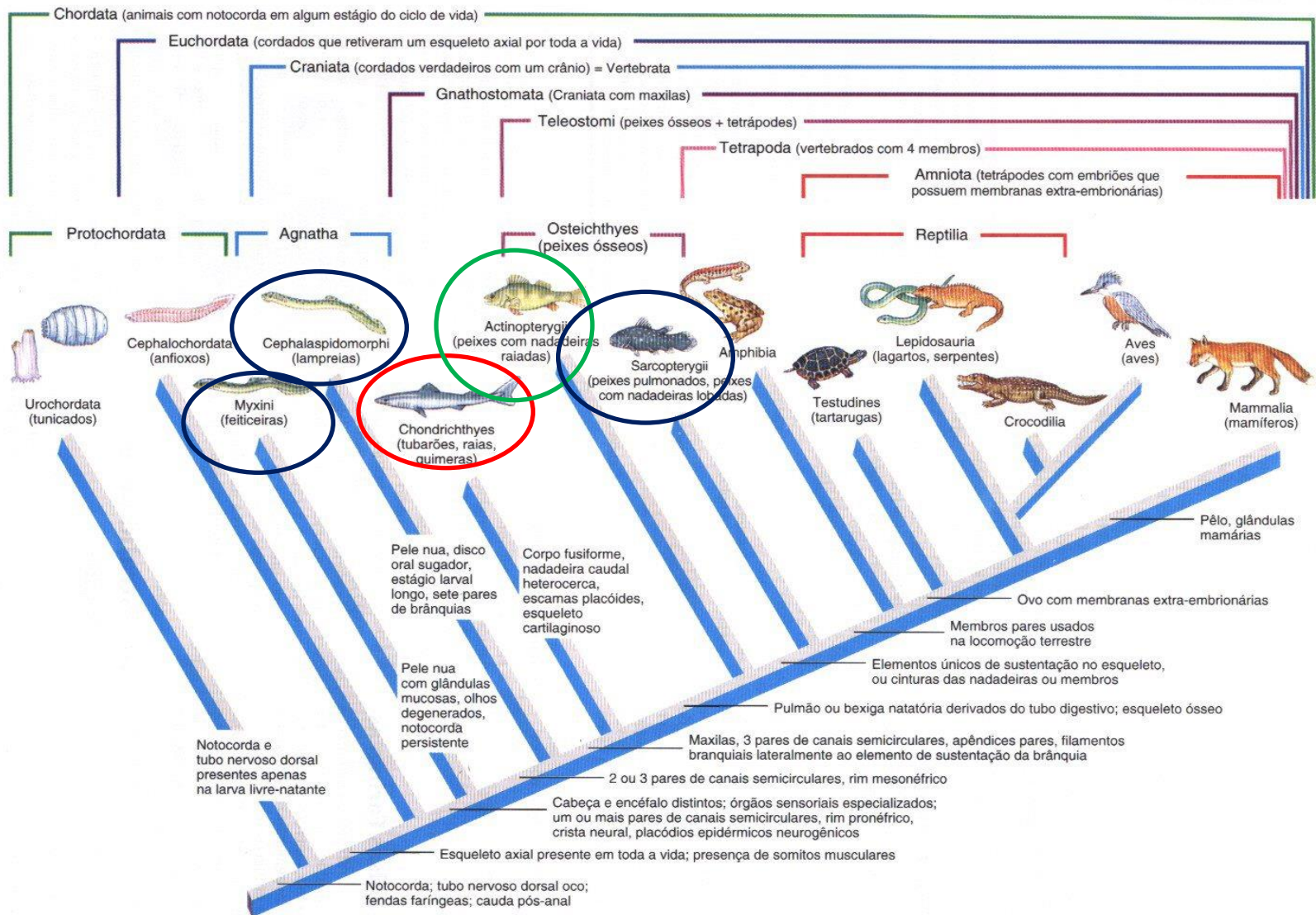
**Na linguagem comum podemos descreve-los como um “vertebrado aquático com brânquias, membros, se presentes, na forma de nadadeiras, e normalmente com escamas de origem dérmica no tegumento”.**

**ou....**

**Animais vertebrados, aquáticos, ectotérmicos, possuem corpo fusiforme, membros transformados em barbatanas ou nadadeiras (ausentes em alguns grupos) sustentadas por raios ósseos ou cartilagosos, guelras ou brânquias com as quais respiram o oxigênio dissolvido na água (dipnóicos - pulmões) e na sua maioria corpo recoberto por escamas.**

**ou....**

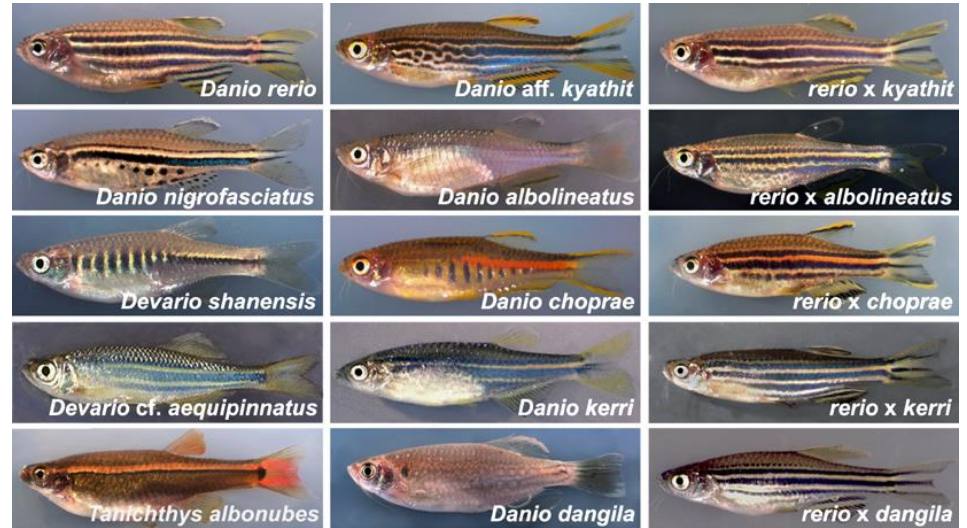
**Animais pertencentes ao reino animal, do Filo Chordata, Subfilo Vertebrata, Superclasse peixes.**



**Estima-se em 24.600 espécies atuais – mais do que a somatória de todas as outras espécies de vertebrados existentes. E...???????????**



*Oreochromis niloticus* (tilápia-do-Nilo)



*Danio* (paulistinha, zebrafish)



*Rhamdia quelen* (jundiá)

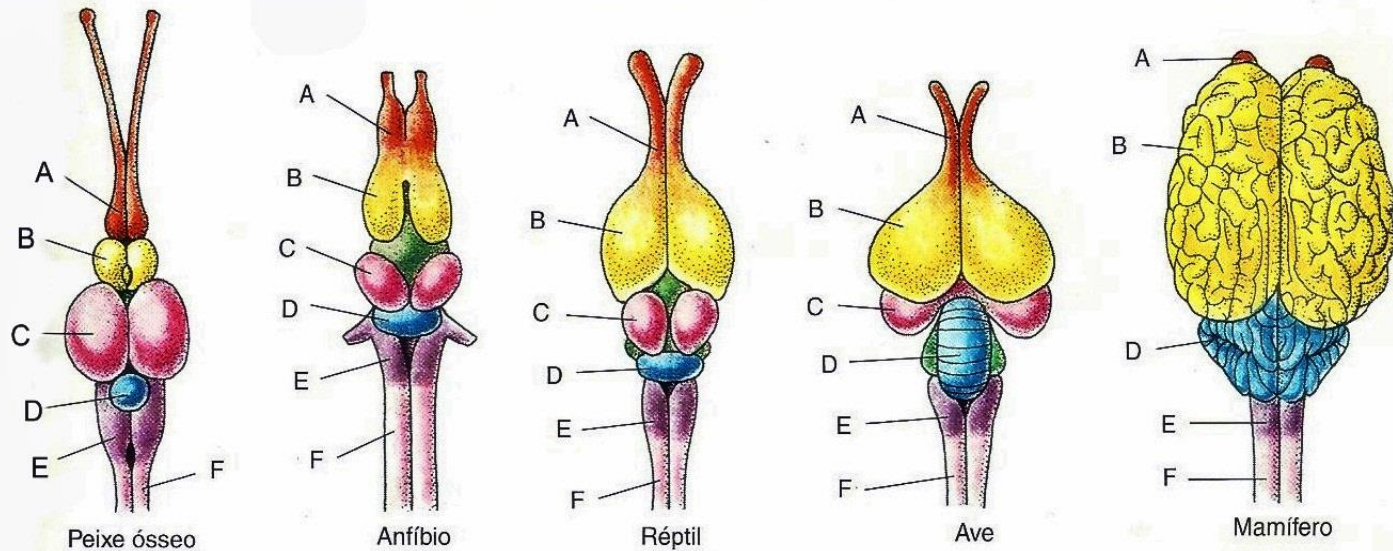


A) *Astyanax scabripinnis*. B) *Astyanax fasciatus*. C) *Astyanax bimaculatus* (Lambari)

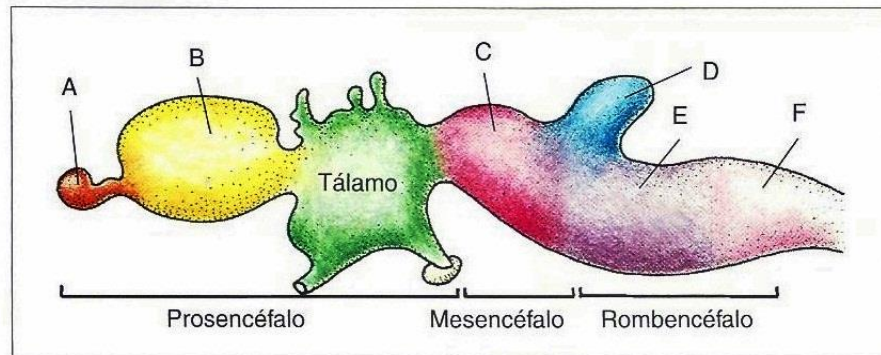


# Por que tratar dos peixes em particular?

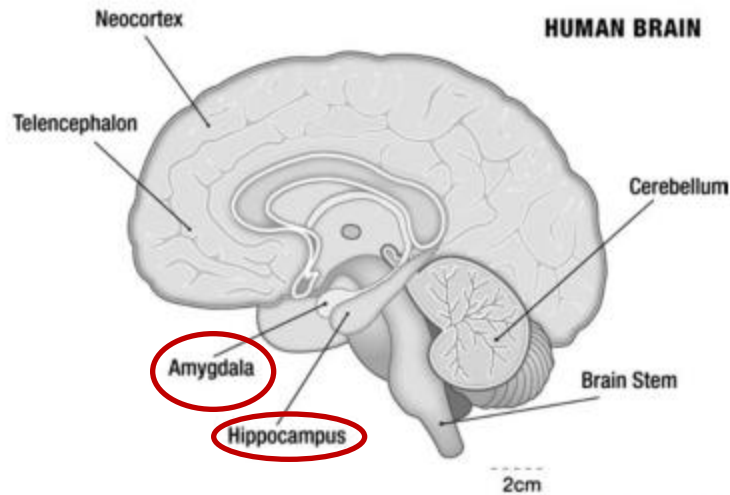
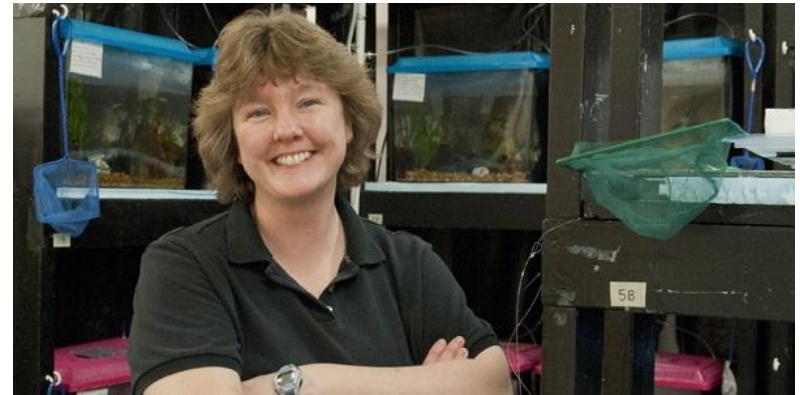
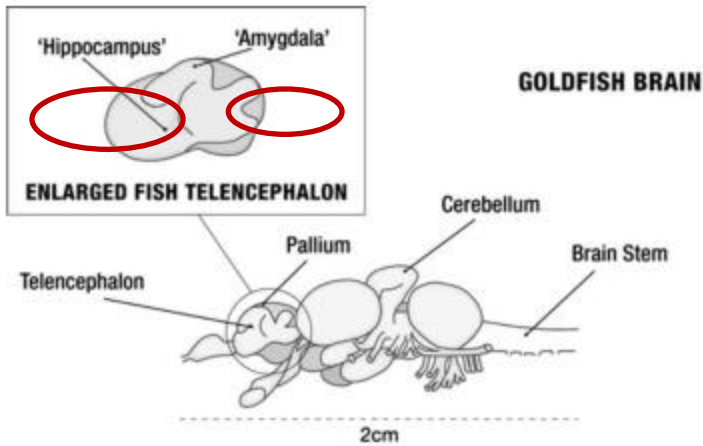
Peixes – dor - seres sencientes?



(A) Lobo olfativo    (B) Cérebro    (C) Lobo óptico    (D) Cerebelo    (E) Bulbo raquidiano    (F) Medula espinhal



**Representação esquemática de encéfalo dos principais grupos de vertebrados, em vista dorsal, mostrando o tamanho relativo das diversas regiões encefálicas. No detalhe, representação esquemática, em vista lateral, da sequência de regiões do encéfalo de um vertebrado.**



**Figure 1** Schematic drawing comparing a human brain to that of a goldfish brain. The human brain is drawn with the external neocortex of the temporal lobe removed to reveal the hippocampus and the amygdala underneath. The Goldfish brain telencephalon has been redrawn to a larger scale on the left to allow the 'hippocampus' and 'amygdala' regions to be labelled.



do  
fish **feel**  
pain?

VICTORIA BRAITHWAITE



# PROCEEDINGS B

[rspb.royalsocietypublishing.org](http://rspb.royalsocietypublishing.org)

Research



CrossMark  
click for updates

**Cite this article:** Rey S, Huntingford FA, Boltaña S, Vargas R, Knowles TG, Mackenzie S. 2015 Fish can show emotional fever: stress-induced hyperthermia in zebrafish. *Proc. R. Soc. B* **282**: 20152266. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2015.2266>

Received: 18 September 2015

Accepted: 28 October 2015

**Subject Areas:**

behaviour, evolution, physiology

**Keywords:**

## Fish can show emotional fever: stress-induced hyperthermia in zebrafish

Sonia Rey<sup>1,2</sup>, Felicity A. Huntingford<sup>1</sup>, Sebastian Boltaña<sup>1,2</sup>, Reynaldo Vargas<sup>2</sup>, Toby G. Knowles<sup>3</sup> and Simon Mackenzie<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Aquaculture, School of Natural Sciences, University of Stirling, Stirling FK9 4LA, UK

<sup>2</sup>Institut de Biotecnologia i Biomedicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

<sup>3</sup>School of Veterinary Science, University of Bristol, Langford, Bristol BS40 5DU, UK

SR, 0000-0002-3406-3291

Whether fishes are sentient beings remains an unresolved and controversial question. Among characteristics thought to reflect a low level of sentience in fishes is an inability to show stress-induced hyperthermia (SIH), a transient rise in body temperature shown in response to a variety of stressors. This is a real fever response, so is often referred to as 'emotional fever'. It has been suggested that the capacity for emotional fever evolved only in amniotes (mammals, birds and reptiles), in association with the evolution of consciousness in these groups. According to this view, lack of emotional fever in fishes reflects a lack of consciousness. We report here on a study in which six zebrafish groups with access to a temperature gradient were either left as undisturbed controls or subjected to a short period of confinement. The results were striking: compared to controls, stressed zebrafish spent significantly more time at higher temperatures, achieving an estimated rise in body temperature of about 2–4°C. Thus, zebrafish clearly have the capacity to show emotional fever. While the link between emotion and consciousness is still debated, this finding removes a key argument for lack of consciousness in fishes.

# FISH and FISHERIES



FISH and FISHERIES, 2014, **15**, 97–133

---

## Can fish really feel pain?

*J D Rose<sup>1</sup>, R Arlinghaus<sup>2,3</sup>, S J Cooke<sup>4\*</sup>, B K Diggles<sup>5</sup>, W Sawynok<sup>6</sup>, E D Stevens<sup>7</sup> & C D L Wynne<sup>8</sup>*

**Nociception is not pain and emotions are not feelings**

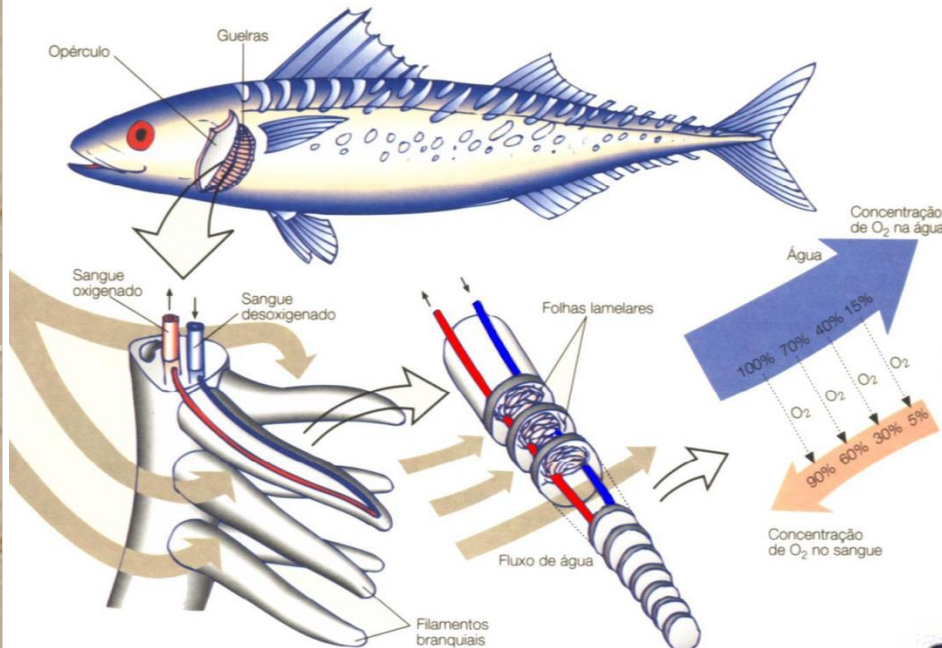


# PUBLICAÇÃO DA RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 34, DE 27 JULHO DE 2017.

O Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA informa que foi publicada, no Diário Oficial da União (31/07/2017), seção I, a [Resolução Normativa nº 34, de 27 de junho de 2017](#), que institui o Capítulo "Peixes mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica para fins de estudo biológico ou biomédico I - [Lambari \(Astyanax\)](#), [Tilápia \(Tilapia, Sarotherodon e Oreochromis\)](#) e [Zebrafish \(Danio rerio\)](#)" no Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica.

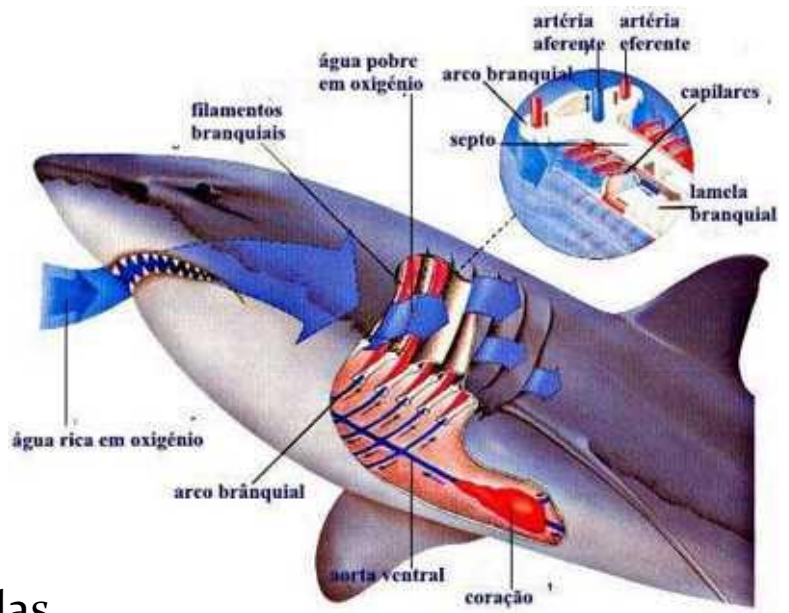
# Onde vivem

	ÁGUA	AR	RAZÃO: ÁGUA/AR
Concentração de O <sub>2</sub> (litro/litro)	0,007	0,209	1:30
Densidade (kg/litro)	1,000	0,0013	800:1
Viscosidade dinâmica (cP)	1	0,02	50:1
Capacidade térmica (cal/litro °C)	1.000	0,31	3.000:1
Condutividade térmica (cal/s cm °C)	0,0014	0,000057	25:1
Coefficiente de difusão, DO <sub>2</sub> (cm <sup>2</sup> /s)	0,000025	0,198	1:8.000
Coefficiente de difusão DCO <sub>2</sub> (cm <sup>2</sup> /s)	0,000018	0,155	1:9.000
Constante de difusão, K <sub>O<sub>2</sub></sub> (cm <sup>2</sup> / atm min)	34x10 <sup>-6</sup>	11	1:1.300.000
Constante de difusão, K <sub>CO<sub>2</sub></sub> (cm <sup>2</sup> / atm min)	850x10 <sup>-6</sup>	9,4	1:11.000
Litros de meio por litro de O <sub>2</sub>	143	4,8	30:1
Quilogramas de meio por litro de O <sub>2</sub>	143	0,0062	23.000:1

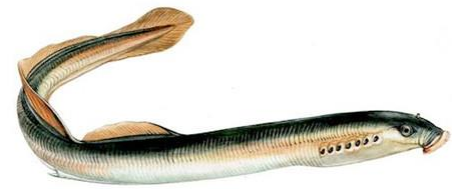


# Osteichthyes

# Chondrichthyes



\***Agnatos ou ciclóstomos:** sem mandíbulas (lampréias, feiticeiras).



# CONSIDERAÇÕES

- **1. Espécie a ser utilizada**
  - Expressam as características (respostas) que o experimentado requer
  - Disponibilidade
  - Obtenção dos animais
  - Informações pré-existentes
- **2. Coleta no ambiente natural – SisBio**
- **3. Compra de criadouros ou lojas**
  - Licença de funcionamento e comercialização

# Acomodação

1. Espaço (densidade) – espécie-específica
2. Qualidade da água – sistema fechado (filtros)
3. Temperatura – aquecedor/termostato
4. Luminosidade – ciclo claro/escuro
5. Alimentação – habito alimentar e origem do lote



# QUALIDADE DA ÁGUA

## APPENDIX D WATER QUALITY CRITERIA FOR OPTIMUM FISH HEALTH – FOR COLDWATER, WARMWATER AND MARINE SPECIES OF FISH

(mg/L except for pH, temperature and salinity)

Characteristics	Coldwater	Warmwater	Marine	Monitoring frequency		Comments
				Recirculation	Open Flow Through	
Temperature	9 to 15°C	20 to 32°C	Species-specific, range too broad to state definitively	daily	daily	
Oxygen	7 to saturation	5 to saturation	5.5 to saturation	at least daily	daily	Oxygen may need to be checked more frequently if other values change or if fish are in high density situations (above 15 kg/m <sup>3</sup> )
pH	6.5 to 8	7.5 to 9	7.5 to 8.5	daily	weekly	pH may need to be checked more frequently if other values change or if fish are in high density situations (above 15 kg/m <sup>3</sup> )
Ammonia (un-ionized)	0 to 0.0125	0 to 0.02	0 to 0.0125	twice a week	monthly (unless high density)	If system has a biofilter should be checked daily during start-up
Nitrate	0 to 3.0	0 to 3.0	species-specific	twice a week	monthly (unless high density)	If system has a biofilter should be checked daily during start-up



Characteristics	Coldwater	Warmwater	Marine	Monitoring frequency		Comments
				Recirculation	Open Flow Through	
Nitrite	0 to 0.2	0 to 0.1	0 to 0.2	twice a week	monthly (unless high density)	If system has a biofilter should be checked daily during start-up
Chlorine	0 to 0.01	0 to 0.01	not applicable	annually	daily (if using municipal water)	Chlorine should be checked daily if taken from municipal water sources which use chlorine as a disinfectant
Total hardness (CaCO <sub>3</sub> )	20 to 450	50 to 450	>125 mg/L	twice a week	twice a week	Total hardness is a measure of calcium and magnesium but may contain other hardness producing minerals; changes in total hardness can relate to changes in total alkalinity and pH
Total alkalinity (CaCO <sub>3</sub> )	10 to 450	50 to 450	>150 mg/L	twice a week	twice a week	Alkalinity should be monitored as the processes of recirculation cause a reduction in alkalinity and may reduce pH
Nitrogen (gas saturation)	<100%	<100%	<100%	weekly	weekly	Values are for adult fish and may be less in early life stages; should also be checked during any suspected fish health problems
Salinity	0.1 to 3.0g/L	0.1 to 3.0g/L	28 to 35ppt	weekly	weekly	

Adapted from Plumb (1999) and Fisher (2000)

#### References:

- Fisher J.P. (2000) Facilities and husbandry (large fish models). In: *The Laboratory Fish*. (ed. G.K. Ostrander), pp. 13-39. San Diego CA: Academic Press.
- Plumb J.A. (1999) Principles of health maintenance. In: *Health Maintenance and Principal Microbial Diseases of Cultured Fishes*. pp. 1-23. Ames: Iowa State University.

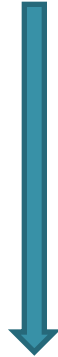
# SINAIS CLÍNICOS DOS PEIXES ENVOLVIDOS EM PESQUISA OU TESTES

**Table 1: Evaluation of Clinical Signs for Fishes Involved in Research or Testing**

<i>Physical Appearance</i>	normal/abnormal
	eye condition
	fin and skin condition (Turnball <i>et al.</i> , 1998)
	mucus production
	colour change (usually a darkening associated with disease or bilateral blindness)
<i>Measurable Clinical Signs</i>	feed consumption
	respiratory rate
	posture in water column, i.e. the individual's position in the water (upright, upside down, tilted, etc.)
<i>Unprovoked Behavior</i>	position in the water column (e.g., crowding near the inlet or outlet pipe, shoaling, etc.)
	social interactions <ul style="list-style-type: none"> <li>• direct attack, domination of choice tank locations, schooling</li> <li>• social isolation, i.e. fish either socially isolated or choosing to isolate themselves from the group</li> <li>• not responsive to external stimulation</li> </ul>
	hyperactivity/hypoactivity (Juell, 1995; Holm <i>et al.</i> , 1998) <ul style="list-style-type: none"> <li>• movement (abnormal movements such as flashing or scraping the body) (Furevik <i>et al.</i>, 1993)</li> <li>• unexpected jumping or escape behavior</li> </ul>
<i>Provoked Behavior</i>	feeding activity
	threat response
	avoidance reaction to mechanical prod
	avoidance reaction to light beam

# Manipulação

**Animal fora da água**



**ESTRESSE**

# Estratégias para reduzir ou evitar o estresse

- Reduzir duração do tempo de exposição;
- Trabalhar em temperatura mais baixa;
- Prevenir estressores simultâneos;
- Utilizar salinidade moderada (para animais dulcícolas) – 12-15 ppt (partes por trilhão)
- Suspender a alimentação (reduz oxigênio requerido e melhora qualidade da água);
- Reduzir a densidade de estoque (reduz a interação);
- Usar anestesia leve (reduz atividade metabólica e injúria decorrente de agitação)
- Reduzir iluminação;
- Evitar mudança abrupta de temperatura;
- Evitar alteração de pH;
- Evitar transportá-los fora da água;
- Evitar lesão da pele, perda de escama, retirada de muco.

# ANESTESIA EM PEIXES

Tabela 1. Estágios de anestesia e recuperação. Existem estágios de anestesia intermediários porém nos deteremos aos aqui apresentados por serem os mais importantes do ponto de vista prático.

<b>Estágio de anestesia</b>	<b>Descrição do comportamento</b>
Sedação leve	Perda de reação a movimentos visuais e ao toque
Anestesia leve	Perda parcial do equilíbrio
Anestesia profunda	Perda total de equilíbrio
Anestesia cirúrgica I	Diminuição dos movimentos operculares
Anestesia cirúrgica II	Mínimo movimento opercular, o peixe fica estático
Colapso medular	Overdose (dose em excesso) ou tempo excessivo de anestesia
Recuperação	Recuperação do equilíbrio e natação normal

Robach R. e Gomes LC.

# Fatores que afetam a eficácia dos anestésicos em peixes

## **BIOLÓGICOS:**

1. **Espécie – tamanho e formato do corpo, área das brânquias**
2. **Diferenças genéticas – variabilidade fisiológica**
3. **Tamanho e/ou peso – variabilidade na taxa metabólica**
4. **Sexo e maturidade sexual – conteúdo de lipídeos**
5. **Conteúdo de lipídeos – drogas lipolíticas = acumulação e recuperação mais lenta**
6. **Condição corporal – animais exaustos, pós cruzamentos**
7. **Condição de saúde e estresse**

## **AMBIENTAL:**

1. **Temperatura – coeficiente térmico nos ectodérmicos**
2. **pH – ionização de moléculas**
3. **Salinidade – efeito tampão**
4. **Conteúdo de minerais – antagonistas de cálcio, por exemplo.**



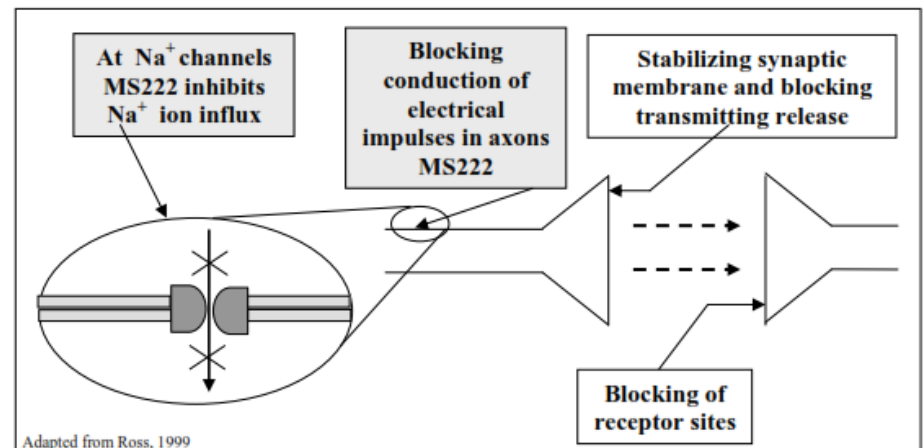
# PROCEDIMENTOS UTILIZADOS:

- Imersão
- Injeção
- Aspersão sobre brânquias

**Avaliação do efeito do anestésico** = perda de equilíbrio parcial ou total.

# Anestésicos mais utilizados

- **Metanosulfonato de tricaina(MS222)**
  - Bloqueia entrada de sódio nos neurônios = reduzem excitabilidade.
  - Aceito para uso em peixes destinados ao consumo humano pelo FDA (Food and Drug Administration – USA).
  - Possui alta solubilidade.
  - Anestesia rápida (1-5min.) e recuperação também rápida (3-5 min.).
  - É ACEITO PELO CONCEA.







- **Benzocaína (ethyl-p-aminobenzoato)**

- **Pode ser usada para imersão e sistema de recirculação para peixes e anfíbios em solução tamponada até o pH 7. A forma isolada de benzocaína não é hidrossolúvel e deve ser preparada em álcool;**
- **O mais utilizado no Brasil (fácil de obter, barato e seguro para o usuário);**
- **Quimicamente similar ao MS-222 (mesmo mecanismo de ação), porém é uma solução neutra, o que gera menos agitação e irritação nos peixes comparado ao MS222;**
- **É ACEITO PELO CONCEA**



# **Eugenol (extrato vegetal, óleo de cravo da Índia)**

- inibição de canais de cálcio voltagem dependentes.
- Baixo custo
  
- **É ACEITO PELO CONCEA**

# Eutanásia

Recomenda-se duas etapas:


1. Anestesia até perda de equilíbrio
2. Método físico ou químico que cause a morte cerebral

# Método físico – concussão (atordoamento) somente após anestesia, exceto se o animal está sob estresse intenso --- sofrimento prolongado (aceito com restrição quando não acompanhado de anestesia)

## Congelamento – imersão em nitrogênio líquido para peixes pequenos, que não ultrapassem 200gr de peso.

- Espécies de médio e grande porte pode ser usado somente para embriões, larvas e pós-larvas até 200gr.

### Eletrocussão – realizada com corrente alternada, causa morte por fibrilação cardíaca, seguido de hipóxia cerebral. Usado em combinação com método que cause inconsciência prévia. (\*eletronarcole = atordoamento elétrico).



As drogas utilizadas como anestésicos por imersão - MS222, Benzocaína e Eugenol podem ser usados para eutanásia, mas são ineficazes para peixes que respiram ar ambiente ou que retém a respiração.

Para peixes grandes, esses podem ser retirados da água e pode-se esguichar uma solução concentrada da substância sobre as brânquias.

### ***9.7.4. Métodos físicos***

A maior parte de peixes, anfíbios e répteis pode ser submetida à perfuração craniana ou outro método físico, apenas após a indução da inconsciência. A secção ou perfuração da medula espinhal caudal ao crânio pode ser usada em alguns animais ectotérmicos. Entretanto, a morte só ocorre quando o cérebro é perfurado. Para estes animais, esta técnica deveria ser seguida de decapitação e perfuração craniana ou por outro método. A perfuração necessita de destreza e habilidade e deve ser realizada apenas por executor com garantida qualificação e competência para tal. Em anfíbios, o ponto de perfuração é o *foramen magnum*, que é identificado por uma leve depressão da pele na linha média dorsal, com o pescoço flexionado.

#### ***9.7.4.1. Resfriamento e congelamento***

Apesar da refrigeração à temperatura de 4 °C, reduzir o metabolismo e facilitar o manuseio, não há evidência que este processo minimize a dor. Não é um método aceito nem sob a forma de congelamento rápido, dada à formação de cristais de gelo na pele e tecidos, o que causa dor e sofrimento. O congelamento rápido só é aceito quando os animais já tiverem sido anestesiados e, por conseguinte, estando inconscientes.

## Invertebrate welfare: where is the real evidence for conscious affective states?

Georgia J. Mason

Anesthesia, Analgesia, and Euthanasia of Invertebrates

*John E. Cooper*

Ann Ist Super Sanità 2013 | Vol. 49, No. 1: 9-17  
DOI: 10.4415/ANN\_13\_01\_04

## Invertebrate welfare: an overlooked issue

Kelsey Horvath<sup>(a)</sup>, Dario Angeletti<sup>(b)</sup>, Giuseppe Nascetti<sup>(b)</sup> and Claudio Carere<sup>(b)</sup>

© 2016. Published by The Company of Biologists Ltd | Biology Open (2016) 5, 883-888 doi:10.1242/bio.019216



### RESEARCH ARTICLE

## No discrimination shock avoidance with sequential presentation of stimuli but shore crabs still reduce shock exposure

Barry Magee and Robert W. Elwood\*

Nociceptive Behavior and Physiology of Molluscs: Animal Welfare Implications

*Robyn J. Crook and Edgar T. Walters*

**Suíça proíbe que lagostas sejam cozidas vivas, mas ninguém sabe dizer se elas sentem dor ou não. (UOL 17/01/2018)**

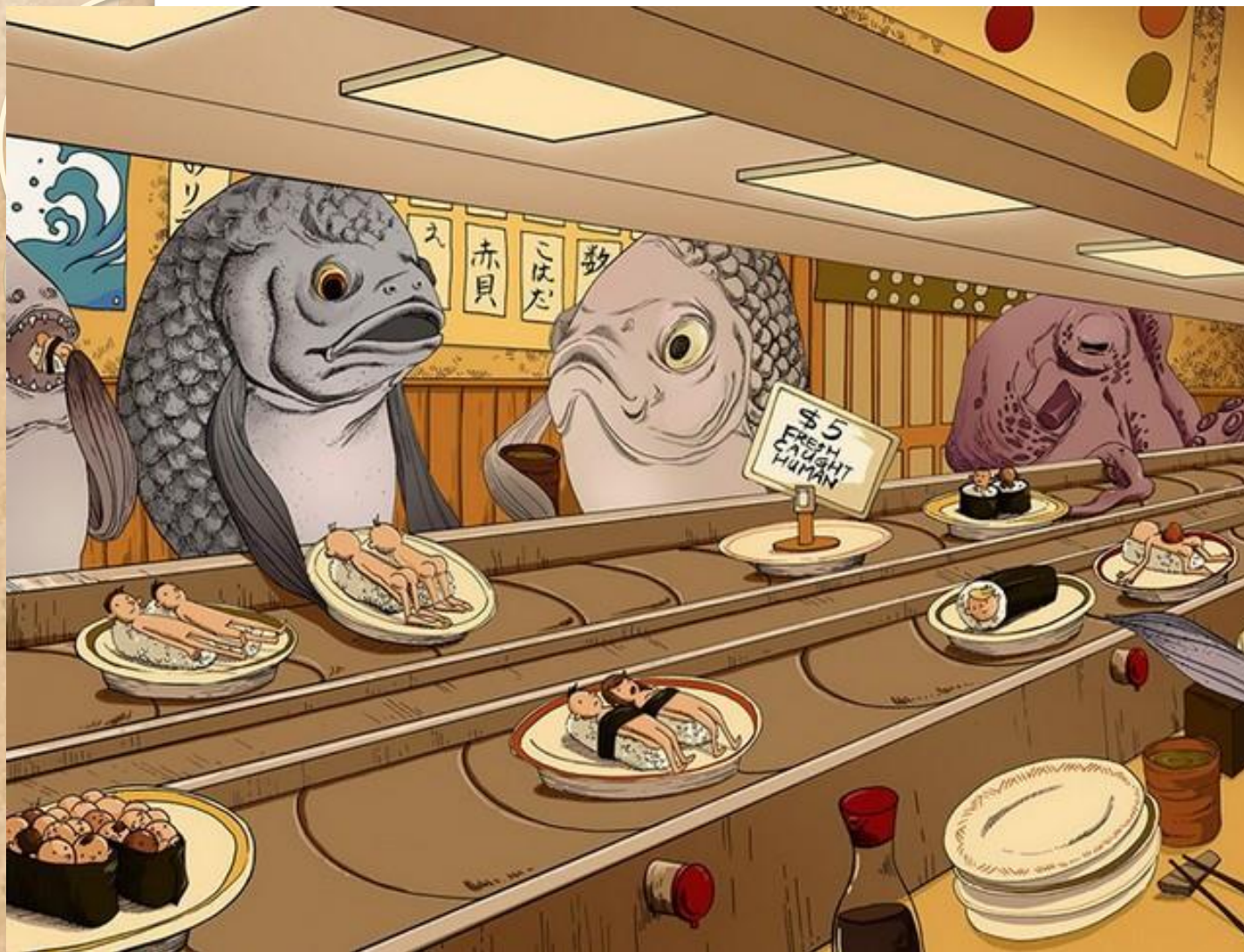


Uma nova lei que proíbe animais de serem preparados ainda vivos foi aprovada na Suíça no início deste ano. A ideia por trás da legislação é evitar o sofrimento animal, em especial o das lagostas, que costumam ser cozidas ainda vivas – mas ninguém sabe afirmar com certeza se as lagostas sentem dor ou não.



**“...., even if we cannot be certain that some species experience pain, they should be treated with respect for reasons that do not hinge on whether or not they experience pain.”**  
**(Sneddon et al., 2014)**





**Dra. Marisa Fernandes de Castilho**  
**Depto. Fisiologia**  
**Lab. de estudos em Estresse Animal**  
**mafernandes@ufpr.br**