

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**AVALIAÇÃO DA DOR E DO POTENCIAL ANALGÉSICO DO TRAMADOL PÓS-
INJEÇÃO INTRAOVARIANA DE CLORETO DE CÁLCIO EM RATAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

GABRIELLE CHRISTINE DE SOUZA CAMPOS

Uruguaiiana

2019

GABRIELLE CHRISTINE DE SOUZA CAMPOS

**AVALIAÇÃO DA DOR E DO POTENCIAL ANALGÉSICO DO TRAMADOL PÓS-
INJEÇÃO INTRAOVARIANA DE CLORETO DE CÁLCIO EM RATAS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Thiesen

Co-orientadora: Dr^a. Roberta Martins
Crivelaro

Uruguiana

2019

GABRIELLE CHRISTINE DE SOUZA CAMPOS

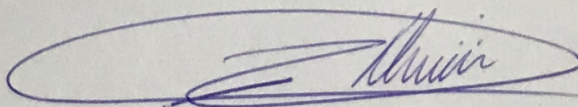
**AVALIAÇÃO DA DOR E DO POTENCIAL ANALGÉSICO DO TRAMADOL
PÓS-INJEÇÃO INTRAOVARIANA DE CLORETO DE CÁLCIO EM RATAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto sensu em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Sanidade Animal
Linha de Pesquisa: Clínica, Cirurgia e Anestesiologia Veterinária

Dissertação defendida e aprovada em: 21 de março de 2019.

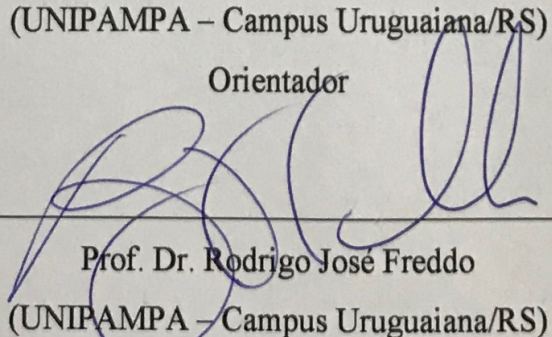
Banca examinadora:



Prof. Dr. Roberto Thiesen

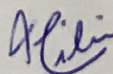
(UNIPAMPA – Campus Uruguaiana/RS)

Orientador



Prof. Dr. Rodrigo José Freddo

(UNIPAMPA – Campus Uruguaiana/RS)



Prof. Dra. Francielli Weber Santos Cibir

(UNIPAMPA – Campus Uruguaiana/RS)

RESUMO

A utilização de animais em pesquisas científicas ainda é frequente. Diversas são as situações onde não existem modelos experimentais *in vitro* que consigam atender os objetivos das pesquisas. Muitos desses estudos envolvem procedimentos cirúrgicos, os quais eticamente necessitam da identificação e do correto manejo da dor durante o período pós-operatório, visando o bem-estar animal. No entanto, a falta do componente verbal faz com que a avaliação de dor em animais seja mais difícil e os métodos menos precisos quando comparados aos empregados em humanos. Contudo, um sistema de codificação de dor em humanos não-verbais foi adaptado para a medicina veterinária. A escala ficou conhecida como *Grimace Scale*. Neste contexto, este estudo teve como objetivo identificar, por meio da *Rat Grimace Scale* (RGS), a presença de dor em ratas após a aplicação intraovariana de cloreto de cálcio em diferentes concentrações, assim como avaliar a eficácia analgésica do tramadol como analgesia de resgate, nos casos necessários. Para isso, foram utilizadas 30 ratas Wistar divididas aleatoriamente em três grupos: Grupo controle (GC, com aplicação intraovariana de cloreto de sódio 0,9%), Grupo 10 (G10, com aplicação intraovariana de cloreto de cálcio à 10%) e Grupo 20 (G20, com aplicação intraovariana de cloreto de cálcio à 20%). Os animais foram induzidos e mantidos anestesiados com isoflurano, para a aplicação dos tratamentos, guiada por ultrassom. Foi registrado o tempo de anestesia e de recuperação dos animais. A avaliação quanto a presença ou não de dor foi realizada aos 30 min e 1h, 1h30, 2h, 6h, 12h, 24h e 36 horas após a recuperação da anestesia, por dois avaliadores treinados no uso da escala e “cegos” aos tratamentos. Os animais que apresentaram escore final ≥ 1 em qualquer momento da avaliação receberam 10 mg/kg de tramadol por via SC, como resgate analgésico. Os resultados demonstraram que os escores obtidos foram significativamente maiores no G20 quando comparados aos do GC a partir de 1h30 de avaliação e de 1h no G10. No entanto, a partir das 12h após a recuperação da anestesia, não houve mais diferenças entre os grupos até o término das avaliações. Em relação ao resgate analgésico, a porcentagem de animais resgatados foi significativamente maior no G20 (60%) quando comparado ao GC (10%) e G10 (10%). Nenhum animal necessitou de mais de um resgate. O uso da RGS demonstrou ser efetivo na identificação da dor nas ratas após injeção de cloreto de cálcio, evidenciado pelas diferenças encontradas entre os grupos. Também a dose de 10mg/kg de tramadol demonstrou ser efetiva no controle da dor, independente do tratamento.

Palavras-chave: analgesia, Grimace Scale, roedores, tramadol.

ABSTRACT

The use of animals in scientific research is still frequent. There are several situations where there are no *in vitro* experimental models that can fulfill the research objectives. Many of these studies involve surgical procedures, which ethically require the identification and correct management of pain during the postoperative period, aiming at animal welfare. However, the lack of the verbal component makes the evaluation of pain in animals more difficult and the methods less precise when compared to those employed in humans. However, a non-verbal human pain coding system has been adapted for veterinary medicine. The scale became known as *Grimace Scale*. In this context, the objective of this study was to identify, through *Rat Grimace Scale* (RGS), the presence of pain in rats after intraovarian application of calcium chloride in different concentrations, as well as to evaluate the analgesic efficacy of tramadol as rescue analgesia, where necessary. For this, 30 Wistar rats were randomly divided into three groups: Control group (GC, with 0.9% sodium chloride intraovarian application), Group 10 (G10, with 10% calcium chloride intraovarian application) and Group 20 (G20, with intraovarian application of 20% calcium chloride). The animals were induced and maintained anesthetized with isoflurane for the application of the treatments, guided by ultrasound. The time of anesthesia and recovery of the animals was recorded. The evaluation of the presence or absence of pain was performed at 30 min and 1h, 1h30, 2h, 6h, 12h, 24h and 36 hours after anesthesia recovery, by two evaluators trained in the use of the scale and "blind" to the treatments. Animals that presented a final score > 1 at any time of the evaluation received 10 mg / kg of tramadol via SC, as an analgesic rescue. The results showed that the scores obtained were significantly higher in the G20 when compared to the GC from the 1h30 evaluation and 1h in the G10. However, after 12 hours after recovery from anesthesia, there were no differences between the groups until the end of the evaluation. Regarding analgesic rescue, the percentage of rescued animals was significantly higher in G20 (60%) when compared to GC (10%) and G10 (10%). No animal needed more than one ransom. The use of RGS showed to be effective in the identification of pain in rats after calcium chloride injection, evidenced by the differences found between the groups. Also, the 10mg/kg dose of tramadol was effective in controlling pain, regardless of the treatment.

Keywords: analgesia, Grimace Scale, rodents, tramadol.

LISTA DE FIGURAS**REVISÃO DE LITERATURA**

Figura 1 - Prancha ilustrativa com imagens faciais da escala de avaliação de dor Grimace Scale para ratos Wistar. Fonte: SOTOCINA *et al.*, 2011.....6

ARTIGO

Figura 1. Imagem gráfica demonstrando o período de tempo em minutos, da duração da anestesia em ratos Wistar, anestesiados com Isoflurano 2% e tratados com aplicação intraovariana de Cloreto de Cálcio nas concentrações de 10% (G10), 20% (G20) e controle (GC). Uruguaiana, 2019.....19

Figura 2. Imagem gráfica demonstrando o tempo de recuperação anestésica em minutos, de ratos Wistar, anestesiados com Isoflurano 2% e tratados com aplicação intraovariana de Cloreto de Cálcio nas concentrações de 10% (G10), 20% (G20) e controle (GC). Uruguaiana, 2019.....20

Figura 3. Curva de sobrevivência demonstrando a quantidade de resgates analgésicos realizados em ratos Wistar anestesiados com Isoflurano 2% e tratados com aplicação intraovariana de Cloreto de Cálcio, nas concentrações de 10% (G10), 20% (G20) e controle (GC). Uruguaiana, 2019.....21

LISTA DE TABELAS**ARTIGO**

Tabela 1. Valores médios e desvio padrão da média dos momentos de avaliações dos grupos de ratos tratados com injeção intraovariana de cloreto de cálcio 10% (G10), 20% (G20) e controle (GC), Uruguaiana, 2019.	18
---	----

Sumário

1 – INTRODUÇÃO.....	1
2 – OBJETIVOS	3
2.1 GERAL	3
2.2 ESPECÍFICOS	3
3 – REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1 – Avaliação da dor.....	4
3.2 – Tramadol.....	8
4- ARTIGO CIENTÍFICO	10
Considerações quanto à ética	13
Animais	14
Delineamento Experimental	14
Anestesia	15
Pós-anestesia.....	16
Resgate Analgésico	17
Análise Estatística	17
DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES	25
FINANCIAMENTO	25
5- CONCLUSÃO	30
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

1 – INTRODUÇÃO

Podemos definir a experimentação animal como a prática de executar intervenções em animais vivos ou recém-abatidos, visando um maior domínio científico sobre o tema desejado (GUIMARÃES *et al.*, 2016). Entretanto, para que a prática ocorra devemos seguir princípios éticos e morais. Neste contexto, aplica-se o conceito das “Cinco Liberdades”, a quais visam o bem-estar animal (BROOM; MOLENTO, 2004), onde os animais devem estar livres de fome e de sede, livres de medo e estresse, livres de desconforto e dor, livres de doença e livres para expressar seu comportamento normal (UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO; FALEIROS; NETO, 2011). Portanto, a avaliação e quantificação da presença de dor após procedimentos invasivos torna-se necessária, sendo esta uma questão ética para com os animais.

Contudo, a identificação da dor em animais é considerada desafiadora, tendo em vista que eles não são capazes de expressar verbalmente essa sensação. Neste sentido, diferentes métodos subjetivos e objetivos vêm sendo utilizados e estudados, para que se possa cada vez mais evitar o sofrimento animal desnecessário. Uma escala desenvolvida recentemente tem sido empregada para a avaliação de dor em ratos, frente à diferentes estímulos, como dor neuropática (PHILIPS *et al.*, 2017) movimentação dentária (LIAO *et al.*, 2014) e vasectomia (MILLER *et al.*, 2016). Esta escala é chamada de *Rat Grimace Scale* (RGS), a qual avalia a presença e a intensidade da dor baseada em alterações nas expressões faciais dos animais (SOTOCINA *et al.*, 2011).

Após a correta identificação e quantificação da dor, é importante também tratá-la de maneira eficaz e com o mínimo de efeitos colaterais possíveis. Diversos são os fármacos utilizados com tal propósito na medicina veterinária, sendo estes de diferentes classes farmacológicas, incluindo opioides, anti-inflamatórios não esteroidais, corticoides, anestésicos locais, dentre outros (FLECKNELL, 2001). Nesse contexto, o tramadol é um fármaco que é amplamente utilizado no tratamento de dor pós operatória em animais de companhia, por ter um mecanismo de ação que envolve a modulação do estímulo doloroso por mais de uma via, sendo elas a ação em receptores opioides do tipo μ e também na via descendente da dor, inibindo a recaptação de noradrenalina e serotonina na fenda sináptica (VALLE *et al.*, 2003).

A castração química com uso de cloreto de cálcio injetado por via intraovariana já foi utilizada em vacas e, apesar de nenhuma escala específica para avaliação da dor ter sido utilizada, foram observados comportamentos compatíveis com dor, como o coiceamento do flanco, o que é frequentemente observado em animais com cólica (CAVALIERI; HAYES,

2017). O cloreto de cálcio também já foi utilizado para injeções intratesticulares em cães (JANA; KUMAR SAMANTA, 2007) e gatos (PARANZINI *et al.*, 2018) para castração química, mas novamente nenhuma avaliação específica quanto a presença de dor foi realizada, porém os autores citam que os animais tinham desconforto à palpação além de outros sinais de dor.

Sendo assim, acredita-se que a aplicação de cloreto de cálcio, com objetivo de esterilização química, seja um estímulo algico em qualquer espécie e sexo, sendo imprescindível uma avaliação quanto a presença e intensidade de dor, preferencialmente por meio de escalas espécie-específicas, como é o caso da RGS. Somente a partir dessa ação é possível realizar um tratamento adequado, livrando os animais experimentais da presença de dor e desconforto.

2 – OBJETIVOS

2.1 GERAL

O objetivo geral do presente trabalho foi identificar a presença e quantificar a intensidade de dor nos animais após a castração química, assim como avaliar a eficácia da terapia analgésica.

2.2 ESPECÍFICOS

- Utilizar os parâmetros da *Rat Grimace Scale* para a identificação e quantificação da dor após a aplicação intraovariana de cloreto de cálcio a 10% e 20%;
- Avaliar a eficácia analgésica do tramadol, quando utilizado como resgate analgésico, nos animais que apresentarem sinais de dor moderada ou intensa;

3 – REVISÃO DE LITERATURA

3.1 – Avaliação da dor

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), a dor é definida como “uma experiência emocional e sensorial associada à um dano tecidual real ou potencial”. Todos os mamíferos processam os componentes neuroanatômicos e neurofarmacológicos envolvidos nas etapas de transmissão do impulso doloroso, portanto é esperado que os animais experienciem a dor, mesmo que não consigam percebê-la ou comunicá-la da mesma forma que os humanos (ALLWEILER, 2019).

Diretrizes têm sido desenvolvidas visando sempre o bem-estar de animais de pesquisa, especialmente roedores, sendo que a maioria dos periódicos exige que normas de bem-estar tenham sido seguidas durante o estudo para que o mesmo seja aceito e publicado. Essas diretrizes são embasadas na questão dos 3Rs (*Refinement, Reduction, Replacement*), sendo que a avaliação da dor e seu tratamento estaria relacionado ao refinamento da pesquisa (McGRATH *et al.*, 2010).

Considera-se como um dos maiores desafios em relação a mensuração da dor em animais, o desenvolvimento de instrumentos que sejam cientificamente robustos e que sirvam ao propósito. Associado a isso, temos a impossibilidade de o animal reportar ao avaliador a própria dor, além das diferenças entre as espécies e até raças, dentro da medicina veterinária (REID *et al.*, 2014). Adicionalmente, não existe uma concordância na comunidade científica quanto à um método objetivo que possa ser usado em qualquer situação para a identificação confiável da dor em animais, além da sua severidade (KOHN *et al.*, 2006).

Roedores são amplamente utilizados em estudos dos mecanismos patofisiológicos da dor, visto que estudos em humanos encontram sua limitação no componente ético. A dor não pode ser mensurada diretamente em roedores, ao invés disso, a presença de dor é “inferida” a partir de comportamentos que remetam a dor como, por exemplo, o comportamento de retirada de um membro frente a um estímulo nociceptivo. Nesse contexto, diversos métodos foram desenvolvidos para tentar identificar e quantificar tais alterações de comportamento que remetam a dor ou à nocicepção (DEUIS *et al.*, 2017).

Os principais métodos comportamentais utilizados para a avaliação de dor em roedores podem ser divididos em duas grandes classes: os provocados por estímulos e os espontâneos (DEUIS *et al.*, 2017). Os provocados por estímulo também podem ser chamados de reflexos. Estes tipos de teste ativam nociceptores no local do estímulo desencadeando

respostas motoras estereotipadas e locais. Os tipos de estímulos utilizados nestas avaliações incluem os térmicos (calor ou frio), mecânicos e elétricos (GREGORY *et al.*, 2013).

Já os espontâneos, ou não-reflexos, irão incluir os de expressão espontânea de comportamentos de dor, geralmente após a injeção de um composto inflamatório em uma das patas, como o formaldeído, onde serão observadas respostas como a de levantamento ou lambedura da pata (TSIKLAURI *et al.*, 2017). De maneira semelhante, avaliação de dor visceral pode ser realizada pela injeção intraperitoneal de compostos irritantes, como o ácido acético, observando-se a intensidade e quantidade de contrações abdominais em um determinado período de tempo (GAWADE, 2012).

Outra maneira de avaliar a dor é observar como o animal evita o estímulo algico, como por exemplo, observar o comportamento de fuga frente a um estímulo térmico (GREGORY *et al.*, 2013). Um dos testes utilizados para tal fim consiste em um ambiente com duas câmaras onde a temperatura do chão de cada câmara pode ser manipulada individualmente, fazendo com que seja possível observar a preferência do animal por uma determinada câmara ou a latência na qual ele muda de ambiente (MAUDERLI *et al.*, 2000).

Por fim, a análise da qualidade de vida dos animais e de suas funções também pode ser utilizada como um indicativo de dor. Uma avaliação geral quanto ao nível de atividade, postura, ingestão hídrica e sólida, “grooming”, marcha e interação social, pode indicar se o animal está com dor (CORTRIGHT *et al.*, 2008).

Outra maneira de avaliar a dor e desconforto de um paciente é por meio das escalas de expressões faciais, as quais já tem sua utilidade conhecida e que codificam e quantificam a dor em populações humanas não-verbais (WILLIAMS, 2002). Esse tipo de escala é conhecida como *Grimace Scale*. Mais recentemente, foram desenvolvidas escalas desse tipo para roedores, sendo chamadas de *Mouse Grimace Scale* (MGS) para camundongos (LANGFORD *et al.*, 2010) e *Rat Grimace Scale* (RGS) para ratos (SOTOCINA *et al.*, 2011).

A RGS utiliza quatro unidades de avaliação, ou parâmetros faciais, sendo elas o cerramento palpebral, o achatamento da ponte do nariz e das bochechas, a posição das orelhas e a posição dos bigodes. No momento da avaliação, para cada um destes parâmetros o avaliador atribui um valor de 0 (zero), 1 (um) ou 2 (dois), sendo que o escore 0 significa que existe um alto nível de confiança que não há alterações no parâmetro avaliado em relação ao basal; o escore 1 indica uma alta confiança de que a unidade avaliada apresenta uma alteração moderada em relação ao basal; e o escore 2 indica a detecção de uma alteração óbvia na unidade avaliada em relação ao basal (SOTOCINA *et al.*, 2011). Após o avaliador atribuir os escores para cada uma das unidades avaliadas, é feita uma média simples e o valor resultante

será utilizado como um indicativo da presença de dor. Nesse sentido, os valores abaixo de 1 representariam a presença de dor leve, e os valores entre 1 e 2, presença de dor moderada à severa (MILLER; LEACH, 2016). A Figura 1 exemplifica a Grimace Scale.

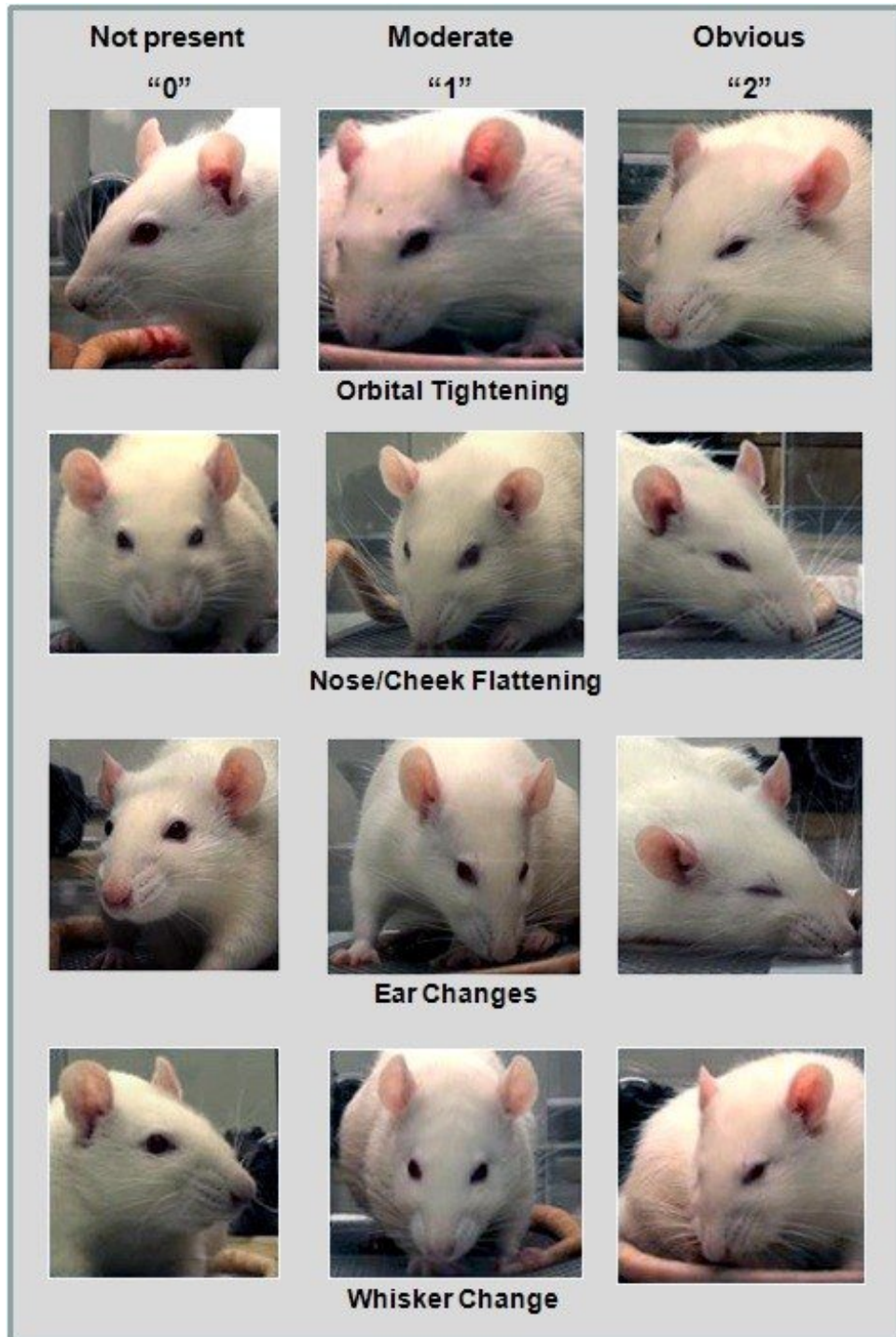


Figura 1 - Prancha ilustrativa com imagens faciais da escala de avaliação de dor Grimace Scale para ratos Wistar. Fonte: SOTOCINA *et al.*, 2011.

A escala vem sendo utilizada com sucesso em diferentes modelos experimentais, com estímulos de diferentes naturezas. Modelos de dor neuropática tipicamente baseiam-se nas respostas de retirada frente à um estímulo álgico, para a avaliação da dor. Contudo, o estudo de Schneider *et al.* (2016) aplicou a RGS para a avaliação de dor supraespinhal após uma lesão contusa da medula espinhal à nível da quinta vértebra cervical. Os autores observaram que, após 5 semanas, os animais lesionados tiveram escores de RGS significativamente maiores que os animais controles, sugerindo a presença de dor neuropática espontânea. Esses dados suportam a hipótese de que a RGS pode ser utilizada para a avaliação desse tipo de dor.

Em outro estudo envolvendo dor neuropática, a RGS foi utilizada para a avaliação de dor neuropática em um modelo de radiculopatia cervical, sendo que um dos pontos investigados pelos autores foi a consistência da RGS entre os avaliadores. A conclusão a qual chegaram foi de que a RGS possui uma confiabilidade interobservadores considerada muito boa e uma consistência interna excelente, sugerindo que a RGS é uma abordagem útil da identificação e monitoramento de neuropatias agudas em ratos (SCHNEIDER *et al.*, 2017).

Em outro modelo de dor ortodôntica, a RGS foi utilizada para a quantificação da dor e comparação entre os tratamentos analgésicos utilizados. A correlação entre os escores de RGS foi forte em relação aos tratamentos utilizados. As maiores doses de analgésicos utilizados tiveram os menores valores de RGS, demonstrando que a escala reflete bem a reação dos animais frente ao uso de analgésicos (LIAO *et al.*, 2014).

Um ponto a ser considerado é a maneira que a RGS é aplicada. O método padrão para a avaliação é retrospectivo, limitando sua aplicação a estudos de dor (LEUNG *et al.*, 2016). Quando foi criada, os desenvolvedores da escala criaram um sistema onde os animais eram gravados em vídeo e a avaliação das alterações das expressão facial feita a partir de imagens capturadas por meio de um software específico (Rodent Face Finder®), o qual já fazia a avaliação em comparação à imagens basais de cada animal, fornecendo os escores (SOTOCINA *et al.*, 2011). No entanto, Leung *et al.* (2016) utilizaram a escala em tempo real objetivando avaliar se o uso em tempo real da RGS poderia avaliar de maneira acurada e confiável a dor em ratos. Baseados nos resultados, os autores concluíram que o uso em tempo real da RGS é viável e efetivo, permitindo um refinamento do bem-estar dos animais no laboratório, a partir de uma rápida identificação e tratamento de condições dolorosas.

3.2 – Tramadol

O tramadol é um hipnoanalgésico sintético de ação central estruturalmente relacionado à outros opioides, como a morfina e a codeína, possuindo dois enantiômeros que contribuem para sua ação analgésica (GROND & SABLLOTZKI, 2004), atuando em receptores opioides do tipo μ (GRIMM *et al.*, 2015) e tendo ainda uma fraca afinidade por receptores kappa e delta (RAFFA *et al.*, 1992), sendo classificado como analgésico agonista de ação central.

Sua ação analgésica se dá por dois mecanismos principais, sendo eles a ligação aos receptores opioides, especialmente os do tipo μ , mas também por meio da inibição da recaptação de monoaminas na fenda sináptica, conforme sugerido por Raffa *et al.* (1992). Por esse fato, a “Food and Drug Administration (FDA) classifica o tramadol como sendo um analgésico de ação central não-tradicional (GROND & SABLLOTZKI, 2004). A ação agonista em receptores opioides é decorrente da ligação dos enantiômeros positivos (+) tanto do tramadol quanto o seu metabólito M1, o O-desmetil-tramadol, enquanto a inibição da recaptação de serotonina é realizada pelo (+)tramadol e da noradrenalina pelo (-)tramadol, potencializando os efeitos inibitórios na transmissão da dor na medula espinhal (RAFFA *et al.*, 1992).

Quanto a farmacocinética, o fármaco apresenta comportamentos distintos de acordo com a espécie utilizada. Em ratos, o comportamento do tramadol no plasma e no líquido cefalorraquidiano (LCR) foi avaliado após a administração intra-nasal do mesmo e comparado às administrações pelas vias intravenosa e oral. Os autores encontraram valores de biodisponibilidade absolutos, após a aplicação intranasal, de 66,7% no plasma e 87,3% no LCR, sendo que o valores de concentração máxima (C_{max}) foram maiores, tanto no plasma quanto no LCR, após a administração intranasal quando comparada a via oral, demonstrando que a via nasal pode ser uma boa opção para uso desse fármaco nessa espécie (ZHAO, *et al.*, 2008).

Ainda pensando na via de aplicação, o uso do tramadol pela via subcutânea (SC) foi comparada com o uso pela via intravenosa (IV) (3mg/kg por ambas as vias) após a realização de ovariectomia (OV) em cadelas. Os autores relatam a diminuição no limiar mecânico de dor dentro de cada grupo, mas ambos os grupos responderam de maneira semelhante, sugerindo que nessa espécie, a administração pela via SC foi tão efetiva quanto pela via IV, atingindo eficácia analgésica comparável por ambas as vias, nessa situação (BUHARI *et al.*, 2012).

Em ratos, um estudo comparando o efeito analgésico do tramadol em quatro doses

diferentes e por três vias diferentes foi conduzido por um grupo de pesquisadores. As vias oral, SC e intraperitoneal (IP) foram utilizadas, nas doses de 4, 12,5, 25 e 50 mg/kg de peso. Os estímulos álgicos aos quais os animais foram submetidos foram o “hot-plate test” e o “tail-flick test”. Dentre os resultados, os autores descrevem que o uso do tramadol por via oral na espécie, não foi efetivo, independente da dose. Em relação a via SC, as doses de 25 e 50 mg/kg foram consideradas efetivas nos testes, mas também causaram efeitos colaterais como sonolência e lesões de pele. Já quanto ao uso pela via IP, as doses de 12,5, 25 e 50 mg/kg foram eficazes em relação a analgesia, tendo sido observado sedação com as duas doses maiores. Isso sugere que a via IP pode ser uma boa opção para o uso deste fármaco nesta espécie (CANNON *et al.*, 2010).

Contudo, Taylor *et al.* (2016) testaram diferentes doses de tramadol e buprenorfina em fêmeas de rato por via oral (20, 30 e 40 mg/kg), sendo que neste caso o estímulo álgico utilizado foi térmico, com uso de um creme de capsaicina em uma região sem pelos da face dos animais. Os autores concluíram que a administração oral do tramadol resultou em analgesia, em todas as doses, superior à da buprenorfina.

Além da ação analgésica, o tramadol também demonstrou ação anti-inflamatória local em ratos, quando injetado na articulação temporo-mandibular (ATM). O fármaco inibiu a resposta nociceptiva induzida pela injeção de solução à 1,5% de formalina. Juntamente com essa resposta nociceptiva, o tramadol também inibiu os níveis de citocinas inflamatórias e a migração e extravasamento de leucócitos do plasma, demonstrando a ação anti-inflamatória periférica (LAMANA *et al.*, 2017).

Em relação aos efeitos colaterais é relatado que, em humanos, o tramadol apesar de ser preferencialmente um agonista de receptores opioides do tipo μ , não produz efeitos clinicamente significativos sobre a respiração, quando utilizado nas doses recomendadas. O fármaco também não apresenta efeitos hemodinâmicos clinicamente significativos. Também, em contraste aos outros opioides agonistas μ , possui apenas um pequeno efeito no trânsito gastrointestinal (GROND & SABLITZKI, 2004).

Recentemente, foi demonstrado que em ratos, o tramadol quando utilizado como analgésico (4 mg/kg, via SC, BID por 5 dias) em cirurgias de laminectomia e lesão medular ao nível da oitava vértebra torácica, atenuou a dor sem no entanto alterar a avaliação funcional do membro afetado, além de não influenciar na recuperação funcional após a lesão espinhal aguda (CHAVES *et al.*, 2018).

4- ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico. As seções Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões e Referências Bibliográficas encontram-se no manuscrito a seguir. O manuscrito está formatado de acordo com as normas do periódico *Laboratory Animals*, ISSN:0023-6772 (impresso) e 1758-1117 (on-line), para o qual será transcrito para o inglês e submetido.

Avaliação da Dor e da Eficácia do Resgate Analgésico com Tramadol Pós-Castração Química em Ratas

Gabrielle Christine de Souza Campos^{1*}, Roberta Martins Crivelaro², Eteie Maldonado
Gomes¹, Endreo Alan Pail¹, Maria Ligia Mistieri³, Ingrid Rios Lima Machado³, Roberto
Thiesen³

¹Discentes do Programa Pós-Graduação em Ciência Animal – Universidade Federal do Pampa
(UNIPAMPA); ²Discente Residência Multiprofissional – UNIPAMPA; ³Docentes do
Programa Pós-Graduação em Ciência Animal – UNIPAMPA.

*Autor para correspondência: gabicampos_pg@hotmail.com

RESUMO

A dor em animais muitas vezes é subdiagnosticada, acarretando em quebra das “Cinco Liberdades”. Entretanto, a identificação dos sinais de dor em animais apresenta certa limitação e dificuldade para os Médicos Veterinários. Neste estudo, foi avaliada a dor e a eficácia do resgate analgésico pós-castração química em ratas, por meio da utilização da *Rat Grimace Scale* (RGS) e tramadol 10 mg/kg, respectivamente. Para isso, foram utilizadas 30 ratas fêmeas da raça Wistar, divididas em três grupos (n=10): GC sendo controle (solução fisiológica), G10 sendo grupo cloreto de cálcio 10% e G20 sendo grupo cloreto de cálcio 20%. As injeções foram realizadas guiadas por ultrassom e com os animais sob anestesia. Após 30 minutos da recuperação anestésica, deu-se início às avaliações de dor por meio da análise das alterações nas expressões faciais dos ratos, realizadas por dois avaliadores sem conhecimento prévio dos tratamentos utilizados, obtendo os escores da RGS. A avaliação foi

realizada em tempos pré-definidos e se prorrogou por até 36 horas. Os animais demonstraram que a injeção intraovariana de cloreto de cálcio a 20% causa mais dor, visto que 60% dos animais do G20 receberam resgate analgésico. A analgesia com uso de 10 mg/kg de tramadol por via subcutânea foi efetiva e os parâmetros identificados através da RGS foram reduzidos ao longo do tempo em todos os ratos resgatados. Nenhum outro método de analgesia foi necessário.

Palavras-chave: cloreto de cálcio, Rat Grimace Scale, tramadol, Wistar

INTRODUÇÃO

A dor é um mecanismo complexo e engloba elementos sensoriais e afetivos. A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) define dor como uma “experiência sensorial e emocional desagradável associada ao dano tecidual potencial ou real” (“IASP Terminology - IASP”, 2017). Entretanto a incapacidade de expressar verbalmente essa sensação não significa a impossibilidade de existir a sensação dolorosa e que a intervenção analgésica não se faz necessária. Na Medicina Veterinária, a avaliação de dor ocorre de maneira mais subjetiva quando comparada a humana, pelo fato da ausência de verbalização dos pacientes. No entanto, métodos de avaliação de dor e nocicepção vem sendo explorados e estudados com o intuito de auxiliar os profissionais e garantir o bem-estar aos animais (MOLENTO, 2007).

A Grimace Scale surgiu através da codificação das expressões faciais, originando uma escala para humanos não-verbais que foi adaptada para a medicina veterinária (MATSUMIYA *et al.*, 2010). Posteriormente, Sotocina *et al.* (2011) codificaram a escala para

utilização em ratos. Atualmente a Grimace Scale vem auxiliando a identificar a dor em diversas espécies animais, como coelhos (DIVINCENTI; MEIRELLES; WESTCOTT, 2016), cavalos (DALLA COSTA *et al.*, 2016), camundongos (FALLER *et al.*, 2015), suínos (DI GIMINIANI *et al.*, 2016) e ferrets (REIJGWART *et al.*, 2017). As vantagens da utilização da Grimace Scale incluem a possibilidade de avaliar as respostas mediadas pelo cérebro, não exigem um treinamento prévio dos animais, além de ser uma forma não invasiva de monitoração e também não sofrer interferência por deficiências motoras (SCHNEIDER *et al.*, 2017).

O tramadol é um fármaco analgésico de ação central, empregado há mais de duas décadas para o tratamento da dor e amplamente utilizado em diversas espécies como humanos (WU; MCKOWN; LIAO, 2002), cães, ratos (WU *et al.*, 2001) e gatos (MONTEIRO *et al.*, 2017). Estudos envolvendo a administração dos metabólitos de O-Desmetil-tramadol em ratos descreve a farmacocinética semelhante as descritas anteriormente (VALLE *et al.*, 2003), possuindo uma boa ação nociceptiva e podendo ser administrado por via oral, subcutânea, intramuscular, intraperitoneal e intravenosa (GARRIDO *et al.*, 2003).

O objetivo do presente trabalho foi realizar a avaliação da dor após a aplicação intraovariana de solução de cloreto de cálcio, utilizando a *Rat Grimace Scale* e testar a eficácia analgésica do tramadol por via subcutânea, nos animais que apresentaram sinais de dor moderados a intensos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Considerações quanto à ética

O trabalho foi realizado sob a expressa autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA - da Faculdade Federal do Pampa sob o número de protocolo 020/2018.

Animais

Foram utilizados 30 ratos Wistar fêmeas, de 60 dias de idade e aproximadamente 200 gramas de peso, provenientes do biotério da Universidade Federal de Santa Maria – RS. Todos os animais passaram por um período de adaptação de 7 dias após a chegada, para posteriormente iniciar-se os estudos.

Os animais foram alojados no biotério da Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA em Uruguaiana, em grupos de 3, em caixas contendo maravalha. A alimentação foi fornecida com 20 gramas/dia/animal de ração comercial, água *ad libitum* e a limpeza ocorreu 3 vezes na semana.

Delineamento Experimental

Os animais foram divididos em 3 grupos, contendo 10 animais cada. Nos grupos G10 e G20 foi aplicada solução de Cloreto de Cálcio em concentrações de 10% e 20%, respectivamente. No grupo controle (GC) foi feita a aplicação de solução de cloreto de sódio 0,9%.

O ensaio ocorreu de maneira randomizada, sendo que os animais foram divididos aleatoriamente, e os avaliadores não tiveram conhecimento do tratamento empregado, para que não houvesse interferência nas classificações segundo a escala.

Caixa de avaliação

Duas caixas de vidro transparentes foram confeccionadas para comportar um rato por avaliação, nas medidas sugeridas pelo manual RGS THE MANUAL (“I. VIDEO & FRAME CAPTURE PROCEDURES”, 2011) (21 x 10,5 x 9 cm). As caixas foram plotadas com papel adesivo preto nas laterais, acima e abaixo, deixando visível somente as partes frontal e traseira, minimizando os estímulos visuais dos animais, facilitando assim a visualização da face dos animais para a avaliação das alterações na mesma.

Para que os ratos tivessem adaptados, no momento do estudo, com a caixa de avaliação, no dia anterior ao início dos procedimentos, imagens basais foram obtidas mantendo-se os ratos por 5 minutos dentro das caixas de avaliação.

No momento do experimento, a permanência dos animais na caixa de avaliação foi de 5 minutos, pois é descrito que em tempos mais prolongados, superiores a 30 minutos, há a tendência de os ratos dormirem, devido ao ciclo circadiano e fisiologia da espécie (SOTOCINA *et al.*, 2011).

Anestesia

A indução anestésica fora realizada em câmara de indução fechada, com inalação de Isoflurano a 4%. Os animais eram colocados individualmente na câmara e mantidos até que o reflexo de endireitamento do corpo fosse perdido. Em ato contínuo, os animais eram retirados da caixa e posicionados em uma mesa cirúrgica específica para a espécie, a qual possuía um cone facial de acrílico embutida para a colocação de fonte do gás anestésico. Assim, o animal pode ser posicionado de maneira adequada e mantido anestesiado com Isoflurano a 2%.

Durante todo o tempo que os animais permaneceram anestesiados, foi realizada a monitoração dos mesmos por meio da ausculta da frequência cardíaca, número de respirações

por minuto e temperatura retal. Quando necessário, recebiam bolsas térmicas para minimizar a ocorrência de hipotermia. O tempo de anestesia foi registrado e comparado entre os grupos.

Pós-anestesia

A recuperação anestésica compreendeu o tempo entre a interrupção do fornecimento do anestésico inalatório e o retorno do reflexo de endireitamento de cada animal. Este tempo foi anotado e comparado entre os grupos.

Durante o pós-operatório, a *Rat Grimace Scale* (RGS) foi empregada para a classificação do nível de dor dos animais, conforme o RGS THE MANUAL (“I. VIDEO & FRAME CAPTURE PROCEDURES”, 2011).

Para as avaliações, os animais foram posicionados dentro das caixas de avaliação, onde permaneceram por 5 minutos para a avaliação. Os momentos das avaliações foram classificados como M, variando de M1 a M8. As primeiras quatro avaliações (M1, M2, M3 e M4) ocorreram a cada 30 minutos, sendo que para a inicial (M1, 30 minutos após a recuperação anestésica), o animal já estava completamente recuperado da anestesia. A quinta avaliação (M5) ocorreu após 6 horas de recuperação anestésica, a sexta (M6) ocorreu após 12 horas, (M7) após 24 horas e (M8) após 36 horas.

Os parâmetros utilizados pela RGS para avaliação de dor são os denominados “Orbital”, “Nose/Cheek”, “Ears” e “Whiskers” que são respectivamente a análise do cerramento ocular, do achatamento da protuberância nasal e das bochechas, o posicionamento das orelhas e o posicionamento dos bigodes. Para cada um dos parâmetros, foi inferido um valor de 0 a 2, de acordo com a intensidade da alteração observada, levando em consideração o basal de cada animal como comparativo. Foi obtido um valor médio por meio do somatório de cada um dos fatores e dividido pelo total dos fatores (p. ex., olhos 1, nariz/bochecha 2, orelhas 1, bigodes 1 = $5/4 = 1,25$). Ao final, foi feita uma média simples dos resultados dos

avaliadores, sendo que animais com escores inferiores a 1 foram considerados como tendo dor leve, escores entre 1 e 2 como dor moderada à severa. Caso o valor encontrado fosse igual ou maior que 1, era instituído o resgate analgésico.

Resgate Analgésico

O resgate analgésico foi realizado com Tramadol¹ na dose 10 mg/kg por via subcutânea (SC). Para que a dose fosse corretamente administrada, o peso individual foi conferido com o uso de uma balança de precisão², durante o período trans-anestésico.

Uma segunda avaliação pós-resgate fora instituída passando-se 30 minutos da aplicação do resgate e se houvesse necessidade de uma nova fonte de analgesia, essa seria instituída com Morfina³ na dose de 3mg/kg a ser administrada pela mesma via.

Análise Estatística

As amostras, após testadas quanto à normalidade estatística pelo teste de D'Agostin-Pearson, foram comparadas, entre si, com estatística univariada. Diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$, em intervalo de confiança de 95% (IC95%). O programa GraphPad Prisma® foi o utilizado.

Estatística univariada foi aplicada aos dados com o objetivo de se detectarem eventuais diferenças intergrupos quanto a variações dos parâmetros. Parâmetros com distribuição gaussiana foram submetidos à comparação múltipla com RM One-Way ANOVA, seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão da média.

¹ Cristália, Itapira, SP - Brasil

² SF-400, Unicasa, Importado da China

³ Cristália, Itapira, SP- Brasil

RESULTADOS

Os resultados obtidos nos momentos das avaliações dos grupos GC, G10 e G20 estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1. Valores médios e desvio padrão da média dos momentos de avaliações dos grupos de ratos tratados com injeção intraovariana de cloreto de cálcio 10% (G10), 20% (G20) e controle (GC). Uruguaiana, 2019.

	30min	1h	1h30m	2h	6h	12h	24h	36h
GC	0,4±0,31 ^a	0,3±0,34 ^{ab} A	0,11±0,17 ^a bA	0,05±0,12 ^a bA	0,012±0,04 ^b A	0,012±0,0 4 ^b	0,025±0,0 8 ^b	0±0 ^b
G10	0,6±0,24 ^a	0,4±0,28 ^{ab}	0,2±0,22 ^{bc} A	0,12±0,16 ^b cA	0,062±0,11 ^b cA	0,075±0,2 3	0,037±0,0 8 ^c	0±0 ^c
G20	0,68±0,29 ^a c	0,64±0,16 ^a B	0,54±0,25 ^a cB	0,47±0,23 ^a cB	0,27±0,21 ^{cd} B	0,35±0,43	0,22±0,31 ^c d	0,037±0,08 ^b d

Letras minúsculas representam diferenças significativas entre os momentos, dentro do grupo. Letras maiúsculas representam diferenças entre os grupos

Diferenças significativas entre os grupos foram encontradas nas primeiras 12 horas de avaliação. Sendo que G20 foi o grupo que apresentou a maior variação de dor segundo a escala Grimace. O tempo de anestesia não variou entre os três grupos estudados (Figura 1).

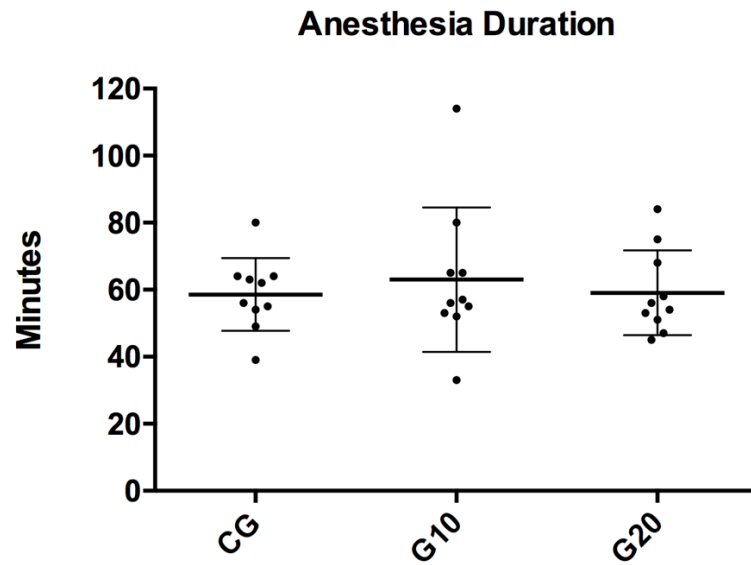


Figura 1. Imagem gráfica demonstrando o período de tempo em minutos, da duração da anestesia em ratos Wistar, anestesiados com Isoflurano 2% e tratados com aplicação intraovariana de Cloreto de Cálcio nas concentrações de 10% (G10), 20% (G20) e controle (GC). Uruguaiana, 2019

O tempo de recuperação anestésica está demonstrado na Figura 2, caracterizando que houve diferença significativa nos tempos de recuperação dos animais entre o grupo GC e G20, sendo G20 com maior duração no tempo médio de recuperação. Entretanto, não houve diferença significativa entre os grupos G10 e G20.

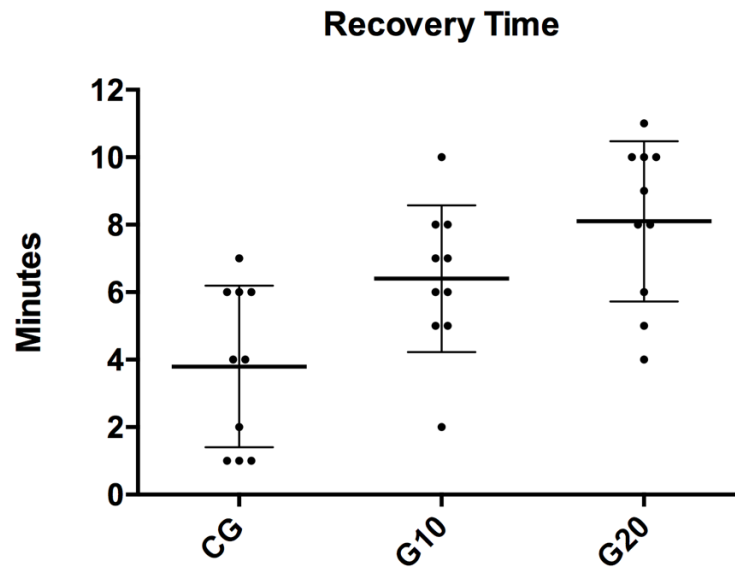


Figura 2. Imagem gráfica demonstrando o tempo de recuperação anestésica em minutos, de ratos Wistar, anestesiados com Isoflurano 2% e tratados com aplicação intraovariana de Cloreto de Cálcio nas concentrações de 10% (G10), 20% (G20) e controle (GC). Uruguiana, 2019.

A Figura 3 representa a porcentagem de animais dos grupos que receberam resgate analgésico durante os momentos de avaliações. Percebe-se a quantidade superior do índice de resgates em G20 (60%) quando comparado aos demais (G10, 10%; GC, 10%).

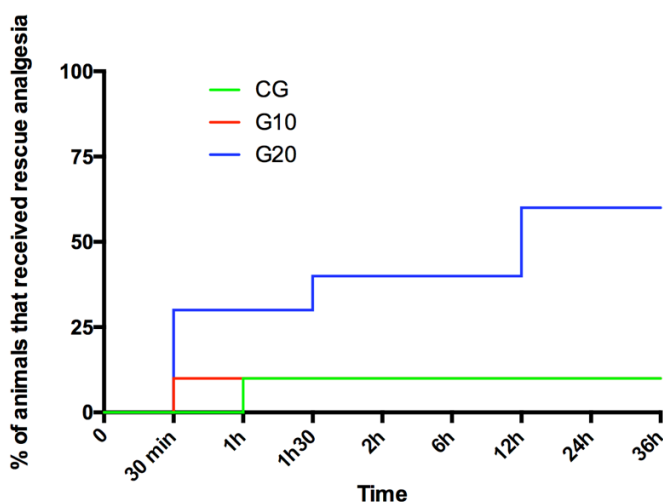


Figura 3. Curva de sobrevivência demonstrando a quantidade de resgates analgésicos realizados em ratos Wistar anestesiados com Isoflurano 2% e tratados com aplicação intraovariana de Cloreto de Cálcio, nas concentrações de 10% (G10), 20% (G20) e controle (GC). Uruguaiana, 2019.

Todos os animais, cujo resgate foi realizado, sofreram uma reavaliação após 30 minutos da analgesia, acarretando na redução dos valores da escala Grimace. Sendo que não houve necessidade em se realizar um segundo resgate e/ou dose complementar durante as avaliações subsequentes em nenhum animal.

DISCUSSÃO

No presente estudo foi possível observar que a utilização da escala Grimace para a avaliação e a quantificação de nível de dor nos animais, através da análise facial, se mostrou eficiente em todos os momentos das avaliações. Mesmo sem a utilização do programa que quantifica automaticamente as imagens via software, a escala foi facilmente empregada,

através do uso das caixas, da captura das fotos e comparação subsequente às imagens basais obtidas previamente ao procedimento. Sendo assim, a Grimace Scale é comprovadamente um sistema de alta precisão e confiabilidade, este fato também foi observado por Langford *et al.* (2010) e por Leung *et al.* (2016).

Um estudo (LEUNG; ZHANG; PANG, 2016) envolvendo aplicação em tempo real da Grimace Scale foi desenvolvido de modo a comprovar se o método seria uma alternativa confiável quando comparado ao método padrão (SOTOCINA *et al.*, 2011), sendo que os resultados encontrados comprovam que a observação em tempo real pode ser aplicada com sucesso, atuando como uma avaliação rápida da classificação da dor. Os autores sugerem períodos de observação de 5 minutos para um melhor equilíbrio entre praticidade e precisão, fato esse também comprovado no presente trabalho, que utilizou o mesmo período de tempo durante as avaliações.

Rantere *et al.* (2016) desenvolveram um estudo comparativo entre RGS (*Rat Grimace Scale*) e teste com filamentos de Von Frey, demonstrando que a utilização do RGS representava a dor originada pela reação inflamatória inerente, enquanto a resposta aos filamentos de Von Frey representava uma resposta à um insulto extrínseco ao tecido inflamado. Segundo eles, um teste não deve ser utilizado como forma a substituir o outro, posto isto, as intenções do pesquisador ao selecionar um dos métodos, devem estar bem elucidadas.

Segundo Oliver *et al.* (2014), a confiabilidade de RGS empregado à um estudo heterogêneo foi relatada, podendo ser aplicada com sucesso para avaliação da escala de dor e necessidade de intervenção analgésica. Dentre todos os parâmetros faciais avaliados, os autores relatam que os bigodes foram os de maior dificuldade de classificação, fornecendo menor contribuição quando comparado aos demais parâmetros. Este fato também foi observado por Leach *et al.* (2012) e no presente trabalho.

Na literatura compulsada, um único estudo envolvendo a utilização da solução de cloreto de cálcio para castração química em fêmeas (injeção intraovariana) foi encontrado, sendo que no mesmo foram utilizadas novilhas como modelo experimental. Os resultados demonstraram que após 15 minutos de injeção, as novilhas apresentaram sinais de dor, sugestivos de cólicas. Entretanto nenhuma escala específica foi empregada, somente foi avaliado se as mesmas exibiam características de chutes nos flancos e decúbito intermitente (CAVALIERI; HAYES, 2017). Outros autores também relatam a ocorrência de dor após a administração intratesticular do composto em cães (JANA; KUMAR SAMANTA, 2007) e gatos (PARANZINI *et al.*, 2018). O presente estudo corrobora os estudos acima citados, uma vez que demonstrou que a utilização do cloreto de cálcio em concentrações crescentes foi acompanhada do aumento da necessidade de analgesia. Assim sendo, a utilização desse composto em animais necessita de um uso criterioso, com a necessidade em se realizar avaliações mais cautelosas de dor quando forem empregados.

O tramadol é um fármaco analgésico amplamente utilizado na medicina veterinária e que atua no sistema nervoso central através de duas vias, sendo elas opioide e não-opioide (TAYLOR *et al.*, 2016). Sua potência analgésica difere entre espécies devido a farmacocinética em cada uma delas, sendo que o metabólito O-desmetiltramadol (M1) está diretamente ligado à analgesia (KUKANICH B.; WIESE, A. J. 2015). Após o composto ser administrado, a metabolização ocorrerá por meio de enzimas hepáticas do complexo citocromo P450. Em cães, ocorre pouca produção do metabólito M1, acarretando em excreção do composto praticamente inalterado na urina, sendo descrito baixo potencial analgésico para a espécie. Entretanto em gatos, há grande produção de M1, salientando um menor requerimento de doses.

Estudos envolvendo roedores demonstram um metabolismo mais acelerado quando comparado a outras espécies. Evangelista *et al.* (2018) relatam que em camundongos, o

metabolismo rápido e a absorção específica do fármaco a nível intestinal justificam a baixa biodisponibilidade e meia-vida curta de tramadol e M1. Embora a meia-vida e duração do efeito analgésico seja de 2-6 horas, os autores relatam que a utilização pela via subcutânea garantiu um início precoce e a manutenção das concentrações séricas do fármaco por até 6 horas. O presente estudo, apesar de realizado com ratos, confirma tais informações, pois os resultados demonstraram a rápida ação farmacológica com a redução de RGS após 30 minutos de administração pela via SC, sendo que a dose de 10 mg/kg (LIU *et al.*, 2008) se mostrou eficiente para promover a analgesia e mesmo passado as 6 horas da aplicação inicial, não houve necessidade de uma dose complementar ou substituição por outro fármaco mais potente após a realização do resgate analgésico.

A anestesia inalatória é uma boa alternativa para diversos procedimentos em espécies variadas, pois não sensibiliza o miocárdio a produção de catecolaminas, entretanto não possuem ação analgésica. Podem ser utilizadas para a indução e manutenção de anestesia, sozinha ou associada a outros fármacos (GARGIULO *et al.*, 2012). As vantagens da utilização da anestesia inalatória em ratos incluem a utilização da câmara de indução, reduzindo o estresse gerado pela manipulação dos animais e a rápida indução/recuperação. Segundo Hacker *et al.* (2005), após cessado o aparelho de anestesia o retorno da consciência do rato é recuperado quase instantaneamente, variando de 30 segundos a 10 minutos. Embora o presente estudo tenha constatado uma variação no tempo de recuperação anestésica, os valores corroboram os do autor supracitado.

CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia utilizada, foi possível concluir que a injeção intraovariana de cloreto de cálcio em diferentes concentrações gera estímulos dolorosos nos animais, sendo que quanto mais concentrada a solução, maior o estímulo de dor, comprovando a necessidade de realizar uma terapia analgésica nesses casos. Através da utilização da *Rat Grimace Scale* foi possível quantificar a intensidade da dor, sendo que a avaliação deve ser continuada por pelo menos 12 horas pós-injeção. O tramadol, na dose de 10 mg/kg por via subcutânea, mostrou-se uma opção eficaz para proporcionar a analgesia em ratas submetidas à castração química por meio da injeção intraovariana de cloreto de cálcio.

DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

FINANCIAMENTO

Esta pesquisa recebeu financiamento pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

REFERÊNCIAS

KUKANICH B.; WIESE, A. J. Opioids. In: GRIMM, K. A. et al. **Lumb & Jones Veterinary Anesthesia**. 5.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 2015. 1074p.

IASP Terminology - IASP. Disponível em: <<https://www.iasp-pain.org/Education/Content.aspx?ItemNumber=1698&navItemNumber=576>>. Acesso em: 9 mar. 2019.

MOLENTO, C. F. M. Bem-estar animal: qual é a novidade? Animal welfare: what's new? **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 2, p. 224–226, 2007.

MATSUMIYA, L. C. et al. Using the Mouse Grimace Scale to Reevaluate the Efficacy of Postoperative Analgesics in Laboratory Mice. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS** 2012 vol: 51 (1) pp: 42-9. 2010.

SOTOCINA, S. G. et al. The Rat Grimace Scale: A Partially Automated Method for Quantifying Pain in the Laboratory Rat via Facial Expressions. **Molecular Pain**, v. 7, p. 1744-8069-7–55, 5 ago. 2011.

DIVINCENTI, L.; MEIRELLES, L. A. D.; WESTCOTT, R. A. Safety and clinical effectiveness of a compounded sustained-release formulation of buprenorphine for postoperative analgesia in New Zealand White rabbits. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 248, n. 7, p. 795–801, 22 abr. 2016.

DALLA COSTA, E. et al. Using the Horse Grimace Scale (HGS) to Assess Pain Associated with Acute Laminitis in Horses (*Equus caballus*). **Animals**, v. 6, n. 8, p. 47, 3 ago. 2016.

FALLER, K. M. E. et al. Refinement of analgesia following thoracotomy and experimental myocardial infarction using the Mouse Grimace Scale. **Experimental Physiology**, v. 100, n.

2, p. 164–172, 1 fev. 2015.

DI GIMINIANI, P. et al. The Assessment of Facial Expressions in Piglets Undergoing Tail Docking and Castration: Toward the Development of the Piglet Grimace Scale. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 3, p. 100, 14 nov. 2016.

REIJGWART, M. L. et al. The composition and initial evaluation of a grimace scale in ferrets after surgical implantation of a telemetry probe. **PLOS ONE**, v. 12, n. 11, p. e0187986, 13 nov. 2017.

SCHNEIDER, L. E. et al. Application of the Rat Grimace Scale as a Marker of Supraspinal Pain Sensation after Cervical Spinal Cord Injury. **Journal of Neurotrauma**, v. 34, n. 21, 2017.

LANGFORD, D. J. et al. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. **Nature Methods**, v. 7, n. 6, p. 447–449, 9 jun. 2010.

LEUNG, V.; ZHANG, E.; PANG, D. S. Real-time application of the Rat Grimace Scale as a welfare refinement in laboratory rats. **Nature Publishing Group**, 2016.

DE RANTERE, D. et al. The relationship between the Rat Grimace Scale and mechanical hypersensitivity testing in three experimental pain models. **European Journal of Pain (United Kingdom)**, 2016.

OLIVER, V. et al. Psychometric assessment of the rat grimace scale and development of an

analgesic intervention score. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, 2014.

LEACH, M. C. et al. Are We Looking in the Wrong Place? Implications for Behavioural-Based Pain Assessment in Rabbits (*Oryctolagus cuniculi*) and Beyond? **PLoS ONE**, v. 6, n. 3, p. e13347, 15 mar. 2011.

CAVALIERI, J.; HAYES, L. Examination of the use of intraovarian administration of CaCl_2 and zinc gluconate as potential chemosterilants in *Bos indicus* heifers. **Australian Veterinary Journal**, v. 95, n. 11, p. 403–415, 1 nov. 2017.

JANA, K.; KUMAR SAMANTA, P. Sterilization of male stray dogs with a single intratesticular injection of calcium chloride: a dose-dependent study. **Contraception**, v. 75 (5), p. 390-400, maio, 2007.

PARANZINI, C. S. et al. Effects of chemical castration using 20% CaCl_2 with 0.5% DMSO in tomcats: Evaluation of inflammatory reaction by infrared thermography and effectiveness of treatment. **Theriogenology**, v. 106, p. 253–258, 15 jan. 2018.

TAYLOR, B. F. et al. Analgesic Activity of Tramadol and Buprenorphine after Voluntary Ingestion by Rats (*Rattus norvegicus*). **J Am Assoc Lab Anim Sci.**, v. 55 p. 74-82. jan. 2016.

EVANGELISTA VAZ, R. et al. Preliminary pharmacokinetics of tramadol hydrochloride after administration via different routes in male and female B6 mice. **Veterinary anaesthesia and analgesia**, v. 45, n. 1, p. 111–122, 1 jan. 2018.

LIU, Y. et al. Effect of tramadol on immune responses and nociceptive thresholds in a rat model of incisional pain. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, v. 9, n. 11, p. 895–902, 1 nov. 2008.

5- CONCLUSÃO

Através da metodologia empregada para a realização do presente estudo, foi possível concluir:

- A Grimace Scale foi eficiente para a identificação e quantificação da dor nos animais após a aplicação intraovariana de cloreto de cálcio nas concentrações de 10% e 20%;

- O tramadol na dose 10 mg/kg proporcionou uma terapia analgésica eficiente em ratos Wistar, quando utilizado em animais com sinais de dor moderada à intensa.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BROOM, D. M.; MOLENTO, ; **BEM-ESTAR ANIMAL: CONCEITO E QUESTÕES RELACIONADAS-REVISÃO (Animal welfare: concept and related issues-Review)**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://revistas.ufpr.br/veterinary/article/viewFile/4057/3287>>. Acesso em: 9 mar. 2019.

BUHARI, S. et al. Subcutaneous Administration of Tramadol after Elective Surgery Is as Effective as Intravenous Administration in Relieving Acute Pain and Inflammation in Dogs. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1–7, 2012.

CANNON, C. Z. et al. Evaluation of dosages and routes of administration of tramadol analgesia in rats using hot-plate and tail-flick tests. **Lab Animal**, v. 39, n. 11, p. 342–351, nov. 2010.

CAVALIERI, J.; HAYES, L. Examination of the use of intraovarian administration of CaCl₂ and zinc gluconate as potential chemosterilants in *Bos indicus* heifers. **Australian Veterinary Journal**, v. 95, n. 11, p. 403–415, 1 nov. 2017.

CHAVES, R. H. DE F. et al. Influence of tramadol on functional recovery of acute spinal cord injury in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 33, n. 12, p. 1087–1094, dez. 2018.

CORTRIGHT, D. N.; MATSON, D. J.; BROOM, D. C. New frontiers in assessing pain and analgesia in laboratory animals. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 3, n. 9, p. 1099–1108, 21 set. 2008.

DALLA COSTA, E. et al. Using the Horse Grimace Scale (HGS) to Assess Pain Associated with Acute Laminitis in Horses (*Equus caballus*). **Animals**, v. 6, n. 8, p. 47, 3 ago. 2016.

DEUIS, J. R.; DVORAKOVA, L. S.; VETTER, I. Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 10, p. 284, 6 set. 2017.

DI GIMINIANI, P. et al. The Assessment of Facial Expressions in Piglets Undergoing Tail Docking and Castration: Toward the Development of the Piglet Grimace Scale. **Frontiers in**

Veterinary Science, v. 3, p. 100, 14 nov. 2016.

DIVINCENTI, L.; MEIRELLES, L. A. D.; WESTCOTT, R. A. Safety and clinical effectiveness of a compounded sustained-release formulation of buprenorphine for postoperative analgesia in New Zealand White rabbits. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 248, n. 7, p. 795–801, 22 abr. 2016.

FALLER, K. M. E. et al. Refinement of analgesia following thoracotomy and experimental myocardial infarction using the Mouse Grimace Scale. **Experimental Physiology**, v. 100, n. 2, p. 164–172, 1 fev. 2015.

FLECKNELL, P. A. Analgesia of Small Mammals. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, v. 4, n. 1, p. 47–56, 1 jan. 2001.

GARGIULO, S. et al. Mice Anesthesia, Analgesia, and Care, Part I: Anesthetic Considerations in Preclinical Research. **ILAR Journal**, v. 53, n. 1, p. E55–E69, 1 mar. 2012.

GARRIDO, M. J. et al. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Modeling of the Antinociceptive Effects of (+)-Tramadol in the Rat: Role of Cytochrome P450 2D Activity. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 305, n. 2, p. 710–718, 1 maio 2003.

GAWADE, S. P. Acetic acid induced painful endogenous infliction in writhing test on mice. **Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics**, v. 3, n. 4, p. 348, out. 2012.

GREGORY, N. S. et al. An Overview of Animal Models of Pain: Disease Models and Outcome Measures. **The Journal of Pain**, v. 14, n. 11, p. 1255–1269, nov. 2013.

GRIMM, K. A. et al. **Lumb & Jones Veterinary Anesthesia**. 5.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 2015. 1074p.

GROND, S.; SABLITZKI, A. Clinical Pharmacology of Tramadol. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 43, n. 13, p. 879–923, 2004.

GUIMARÃES, M. V. et al. Utilização de animais em pesquisas: breve revisão da legislação

no Brasil. **Rev. bioét. (Impr.)**, v. 24, n. 2, p. 217–24, 2016.

I. VIDEO & FRAME CAPTURE PROCEDURES. Disponível em: <https://www.nc3rs.org.uk/sites/default/files/documents/Guidelines/RGS%20Manual.pdf>. Acesso em: 10 set. 2018.

IASP Terminology - IASP. Disponível em: <https://www.iasp-pain.org/Education/Content.aspx?ItemNumber=1698&navItemNumber=576>. Acesso em: 9 mar. 2019.

JANA, K.; KUMAR SAMANTA, P. Sterilization of male stray dogs with a single intratesticular injection of calcium chloride: a dose-dependent study. **Contraception**, v. 75 (5), p. 390-400, maio, 2007.

KOHN, D. F. et al. **Public Statement * Guidelines for the Assessment and Management of Pain in Rodents and Rabbits ACLAM Task Force Members.** [s.l: s.n.]. Disponível em: http://www.aclam.org/pub_pain_distress.html. Acesso em: 11 mar. 2019.

LAMANA, S. M. S. et al. The anti-inflammatory effect of tramadol in the temporomandibular joint of rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 807, p. 82–90, 15 jul. 2017.

LANGFORD, D. J. et al. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. **Nature Methods**, v. 7, n. 6, p. 447–449, 9 jun. 2010.

LEUNG, V.; ZHANG, E.; PANG, D. S. Real-time application of the Rat Grimace Scale as a welfare refinement in laboratory rats. **Nature Publishing Group**, 2016.

LIAO, L. et al. Evaluation of pain in rats through facial expression following experimental tooth movement. **European Journal of Oral Sciences**, v. 122, n. 2, p. 121–124, abr. 2014.

LIU, Y. et al. Effect of tramadol on immune responses and nociceptive thresholds in a rat model of incisional pain. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, v. 9, n. 11, p. 895–902, 1 nov. 2008.

MAUDERLI, A. P.; ACOSTA-RUA, A.; VIERCK, C. J. An operant assay of thermal pain in

conscious, unrestrained rats. **Journal of neuroscience methods**, v. 97, n. 1, p. 19–29, 1 abr. 2000.

MCGRATH, J. et al. Guidelines for reporting experiments involving animals: the ARRIVE guidelines. **British Journal of Pharmacology**, v. 160, n. 7, p. 1573–1576, ago. 2010.

MILLER, A. L. et al. Using the mouse grimace scale and behaviour to assess pain in CBA mice following vasectomy. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 181, p. 160–165, ago. 2016.

MILLER, A. L.; LEACH, M. C. The effect of handling method on the mouse grimace scale in two strains of laboratory mice. **Laboratory Animals**, v. 50, n. 4, 2016.

MINETT, M. S.; QUICK, K.; WOOD, J. N. Behavioral Measures of Pain Thresholds. **Current Protocols in Mouse Biology**, v. 1, n. 3, p. 383–412, 1 mar. 2013.

MOLENTO, C. F. M. Bem-estar animal: qual é a novidade? Animal welfare: what's new? **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 2, p. 224–226, 2007.

MONTEIRO, B. P. et al. Analgesic efficacy of tramadol in cats with naturally occurring osteoarthritis. **PloS one**, v. 12, n. 4, p. e0175565, 2017.

PARANZINI, C. S. et al. Effects of chemical castration using 20% CaCl₂ with 0.5% DMSO in tomcats: Evaluation of inflammatory reaction by infrared thermography and effectiveness of treatment. **Theriogenology**, v. 106, p. 253–258, 15 jan. 2018.

RAFFA, R. B. et al. Opioid and nonopioid components independently contribute to the mechanism of action of tramadol, an “atypical” opioid analgesic. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 260, n. 1, p. 275–85, jan. 1992.

REID, J. et al. Pain assessment in animals. **In Practice**, v. 35, n. 2, p. 51–56, 7 fev. 2013.

REIJGWART, M. L. et al. The composition and initial evaluation of a grimace scale in ferrets after surgical implantation of a telemetry probe. **PLOS ONE**, v. 12, n. 11, p. e0187986, 13

nov. 2017.

SCHNEIDER, L. E. et al. Application of the Rat Grimace Scale as a Marker of Supraspinal Pain Sensation after Cervical Spinal Cord Injury. **Journal of Neurotrauma**, v. 34, n. 21, 2017.

SOTOCINA, S. G. et al. The Rat Grimace Scale: A Partially Automated Method for Quantifying Pain in the Laboratory Rat via Facial Expressions. **Molecular Pain**, v. 7, p. 1744-8069-7-55, 5 ago. 2011.

TAYLOR, B. F. et al. Analgesic Activity of Tramadol and Buprenorphine after Voluntary Ingestion by Rats (*Rattus norvegicus*). **J Am Assoc Lab Anim Sci.**, v. 55 p. 74-82. jan. 2016.

TSIKLAURI, N. et al. Antinociceptive tolerance to NSAIDs in the rat formalin test is mediated by the opioid mechanism. **Pharmacological Reports**, v. 69, n. 1, p. 168–175, fev. 2017.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO, L. DE R.; FALEIROS, R. R.; NETO, H. M. DE A. **Acta veterinaria brasílica**. v. 5, 2010. p. 278 - 285.

VALLE, M. et al. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling of the Antinociceptive Effects of Main Active Metabolites of Tramadol, (+)-O-Desmethyltramadol and (-)-O-Desmethyltramadol, in Rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 293, n. 2, p. 646–653, 1 maio 2003.

WILLIAMS, A. C. DE C. Facial expression of pain: an evolutionary account. **The Behavioral and brain sciences**, v. 25, n. 4, p. 439- 55; discussion 455-88, ago. 2002.

WU, W. N. et al. Metabolism of the analgesic drug, tramadol hydrochloride, in rat and dog. **Xenobiotica**, v. 31, n. 7, p. 423–441, 22 jan. 2001.

WU, W. N.; MCKOWN, L. A.; LIAO, S. Metabolism of the analgesic drug ULTRAM ® (tramadol hydrochloride) in humans: API-MS and MS/MS characterization of metabolites. **Xenobiotica**, v. 32, n. 5, p. 411–425, 22 jan. 2002.

ZHAO, Y. et al. Pharmacokinetics of tramadol in rat plasma and cerebrospinal fluid after intranasal administration. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 60, n. 9, p. 1149–1154, set. 2008.