

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

DIMAS DAL MAGRO RIBEIRO

**AVALIAÇÃO TRANSANESTÉSICA DO GRADIENTE DE TEMPERATURA
CENTRO-PERIFÉRICO E DA EFICÁCIA DO TRAMADOL PREEMPTIVO NO
CONTROLE DA DOR PÓS-OPERATÓRIA EM RATOS**

**Uruguiana
2024**

DIMAS DAL MAGRO RIBEIRO

**AVALIAÇÃO TRANSANESTÉSICA DO GRADIENTE DE TEMPERATURA
CENTRO-PERIFÉRICO E DA EFICÁCIA DO TRAMADOL PREEMPTIVO NO
CONTROLE DA DOR PÓS-OPERATÓRIA EM RATOS**

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.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marília Teresa de Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. João Pedro Scussel Feranti

**Uruguaiana
2024**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

R484a Ribeiro, Dimas Dal Magro

Avaliação transanestésica do gradiente de temperatura centro-periférico e da eficácia do tramadol preemptivo no controle da dor pós-operatória em ratos / Dimas Dal Magro Ribeiro.

79 p.

Dissertação (Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa, MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL, 2024.

"Orientação: Marília Teresa de Oliveira".

1. Roedores. 2. Opioides. 3. Analgesia. 4. Temperatura. 5. Hipotermia. I. Título.

DIMAS DAL MAGRO RIBEIRO

**AVALIAÇÃO TRANSANESTÉSICA DO GRADIENTE DE TEMPERATURA
CENTRO-PERIFÉRICO E DA EFICÁCIA DO TRAMADOL PREEMPTIVO NO
CONTROLE DA DOR PÓS-OPERATÓRIA EM RATOS**

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.

Linha de Pesquisa: Saúde Animal

Dissertação defendida e aprovada em: 01 de março de 2024.

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Marília Teresa de Oliveira
Orientadora
UNIPAMPA

Prof^a. Dr^a. Maria Lígia de Arruda Mestieri
UNIPAMPA

Prof^a. Dr^a. Gabriela Pesamosca Coradini
Uniavan



Assinado eletronicamente por **MARILIA TERESA DE OLIVEIRA, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 01/03/2024, às 11:14, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **MARIA LIGIA DE ARRUDA MESTIERI, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 01/03/2024, às 11:27, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unipampa.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1382611** e o código CRC **E1587A97**.

Dedico este trabalho a toda minha família, amigos e professores, sobretudo a minha orientadora Marília, por sempre acreditar no meu potencial.

AGRADECIMENTO

Primeiramente, agradeço aos meus pais, Marli e Joceli, que abdicaram dos seus sonhos para realizar o meu, sem eles toda essa experiência não seria possível. Também agradeço aos meus avós, Isolde e Valentim, pois ambos estiveram presentes ativamente na minha criação e são os meus maiores exemplos de força e perseverança, mesmo passando pelos maiores desafios da colonização italiana, construíram uma família resiliente e, com toda a certeza, deixarão um legado inesquecível.

Agradeço ao meu namorado, Kélvyn, por ficar ao meu lado em todos os momentos difíceis e não largar a minha mão, sem ele, esse processo seria muito mais conturbado. Tenho certeza de que escolhi a pessoa certa para esta ao meu lado e, em breve, iremos colher lindos frutos de todos os momentos que abdicamos para que eu pudesse concluir essa etapa.

Agradeço a minha companheira de pós-graduação e amiga, Etiele, sem ela essa aventura não seria tão intensa e divertida, construímos juntos uma história linda, que iniciou antes mesmo do meu ingresso no mestrado, e eu tenho certeza de que irá perpetuar. Além disso, agradeço a minha amiga Giovana, você é uma mulher forte e fonte de inspiração, me auxiliou no momento mais conturbado e me motivado diariamente.

Agradeço a minha orientadora Marília, por ter aceitado desde o início da graduação dividir momentos incríveis comigo. Obrigado por todo o companheirismo e por ser fonte de inspiração, espero me tornar, no mínimo, 1% da profissional incrível que você é, você faz a diferença na comunidade científica e tenho certeza de que precisamos de mais professores como vocês

Por fim, um ciclo se encerra, mas eu tenho certeza de que o sonho continua!

“Nunca se deve engatinhar quando o impulso é voar!”

Helen Keller

RESUMO

Há uma preocupação crescente com o bem-estar animal nas pesquisas científicas envolvendo animais de laboratório. Dúvidas frequentes atreladas ao comportamento animal, a falta de treinamento e as lacunas existentes nos parâmetros fisiológicos apontam um cenário crítico nas questões de bem-estar animal nos laboratórios brasileiros. A monitoração anestésica para animais experimentais muitas vezes não abrange critérios básicos e, assim, cria-se um questionamento sobre os reflexos de possíveis complicações transanestésicas que passam despercebidas e, conseqüentemente, alterações no bem-estar. Além disso, deve-se admitir que todo procedimento cirúrgico é potencialmente causador de estímulo nociceptivo, portanto, deve-se elaborar uma estratégia de analgesia e, além disso, utilizar ferramentas efetivas para avaliar a dor e nocicepção nos animais de laboratório. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo determinar a eficácia do tramadol, administrado de forma preemptiva por via subcutânea, na analgesia pós-operatória de ratos submetidos a artrotomia medial de joelho com transecção do ligamento cruzado cranial e evidenciar os valores do gradiente de temperatura centro-periférica (ΔT_{cp}) para ratos anestesiados com isoflurano para exames de imagem. Para tanto, 48 *Rattus norvegicus albinus* machos, foram submetidos a anestesia geral com isoflurano para a realização do procedimento cirúrgico de artrotomia medial de joelho com transecção do ligamento cruzado cranial e, posteriormente, exames ultrassonográfico e radiográfico. Dessa forma, nosso estudo evidencia, de forma pioneira, os valores de ΔT_{cp} de ratos machos sob anestesia geral com isoflurano, sendo 2,25 °C no início da anestesia e 0,61 °C ao final. Os impactos vinculados a alteração do ΔT_{cp} e os valores que caracterizam prejuízo perfusional ainda precisam ser investigados. Além disso, a partir da *Rat Grimace Scale*, o estudo mostrou que a abordagem preemptiva adotada foi eficaz para controlar a dor aguda pós-operatória por 72h independente da dose de tramadol utilizada, ou seja, é possível frear o estímulo álgico, até mesmo com uma dose de 5 mg/Kg de tramadol por via subcutânea.

Palavras-Chave: roedores, opioides, analgesia, temperatura, hipotermia.

ABSTRACT

There is a growing concern for animal welfare in scientific research involving laboratory animals. Frequently, questions regarding animal behavior, lack of training, and gaps in physiological parameters indicate a critical scenario concerning animal welfare in Brazilian laboratories. Anesthetic monitoring for experimental animals often fails to cover basic criteria, leading to concerns about the repercussions of unnoticed transanesthetic complications and subsequent alterations in well-being. Additionally, it must be acknowledged that any surgical procedure has the potential to cause nociceptive stimuli; thus, a strategy for analgesia should be developed, along with effective tools to assess pain and nociception in laboratory animals. In this context, the present study aimed to determine the efficacy of preemptively administered subcutaneous tramadol in the postoperative analgesia of rats undergoing medial knee arthrotomy with transection of the cranial cruciate ligament. The study also aimed to highlight the values of the center-peripheral temperature gradient (ΔT_{cp}) in rats anesthetized with isoflurane for imaging examinations. For this purpose, 48 male albino *Rattus norvegicus* were subjected to general anesthesia with isoflurane for the surgical procedure, followed by ultrasonographic and radiographic examinations. Our study, in a pioneering manner, reveals the ΔT_{cp} values in male rats under isoflurane general anesthesia, which were 2.25°C at the beginning of anesthesia and 0.61°C at the end. The impacts associated with ΔT_{cp} alteration and the values indicative of perfusional impairment still need further investigation. Furthermore, using the Rat Grimace Scale, the study demonstrated that the preemptive approach adopted was effective in controlling acute postoperative pain for 72 hours, regardless of the dose of subcutaneous tramadol used. In other words, it is possible to mitigate nociceptive stimuli, even with a dose of 5 mg/kg of tramadol.

Keywords: rodents, opioids, analgesia, temperature, hypothermia.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Imagens faciais de ratos Winstar apresentando as quatro unidades de ação e suas respectivas pontuações..... 31
- Figura 2 – Ilustrações demonstrando a utilização do Von Frey manual (A) e Von Frey eletrônico (B)..... 32
- Figura 3 – Médias (gramas) das avaliações da sensibilidade mecânica de cada grupo de ratos tratados com tramadol preemptivo 5 e 10 mg/Kg (G5 e G10) nos cinco momentos de avaliação, desconsiderando os animais irresponsivos a avaliação com o Analgesímetro Von Frey 59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Médias e desvio padrão (DP) da Rat Grimace Scale para cada momento de avaliação dos grupos de ratos tratados com tramadol preemptivo 5 (G5) e 10 (G10) mg/Kg.....	54
Tabela 2 – Número e porcentagem (%) de animais irresponsivos a avaliação da sensibilidade mecânica através do Analgesímetro Von Frey	55

LISTA DE ABREVIATURAS

Dr. – Doutor

Dr^a. – Doutora

f. – Folha

min. - Minutos

n. – Número

p. – Página

Prof. – Professor

Prof^a. – Professora

v. – Volume

LISTA DE SIGLAS

AGP – Apoio aos Programas de Pós-Graduação

AVF – Analgesímetro de Von Frey

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

cm – Centímetros

IASP – *International Association for The Study Of Pain*

IP – Intraperitoneal

Kg – Quilograma

LCT – *Lower Critical Temperature*

M1 – O-Desmetiltramadol

M2 – N-Desmetiltramadol

M5 – N,O-Dideslmetiltramadol

mg – Miligrama

mL – Mililitro

NIH – *National Institutes of Health*

NMDA – N-Metil D-Aspartato

°C – Gray Celsius

°F – Grau Fahrenheit

PPGCA – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

RGS – *Rat Grimace Scale*

SC – Subcutânea

SNC – Sistema Nervoso Central

SvO₂ – Saturação Venosa Mista de Oxigênio

TNZ – *Thermoneutral Zone*

UCT – *Upper Critical Temperature*

UNIPAMPA – Universidade Federal do Pampa

ΔT_{cp} – Gradiente de Temperatura Centro-Periférica

κ – Kappa

κ – Kappa

μ – Mu

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 CONCEITOS GERAIS E REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 GRADIENTE DE TEMPERATURA CENTRO-PERIFÉRICA EM RATOS	18
2.1.1 Termorregulação do rato de laboratório: Aspectos gerais.....	18
2.1.2 Termorregulação e anestesia geral	19
2.1.3 Impactos negativos relacionados a hipotermia.....	20
2.1.4 Monitorização da perfusão tecidual	22
2.1.5 Gradiente de temperatura centro-periférica.....	24
2.2 AVALIAÇÃO DA DOR AGUDA PÓS-OPERATÓRIA EM RATOS	25
2.2.1 Dor e nocicepção em animais de laboratório	25
2.2.2 Bem-estar em animais de experimentação: Aspectos gerais.....	26
2.2.3 Analgesia preemptiva em animais de laboratório	27
2.2.4 Tramadol: Evidências em ratos	28
2.2.5 Avaliação da nocicepção e dor em ratos	30
3 OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo geral	33
3.2 Objetivos específicos	33
4 APRESENTAÇÃO DA PESQUISA E ANÁLISE DOS RESULTADOS	34
4.1 Artigo Científico 1	34
4.2 Artigo Científico 2	48
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
6. REFERÊNCIAS	70

1 INTRODUÇÃO

O bem-estar de animais de laboratório necessita de atenção, pois poucos pesquisadores apresentam conhecimento satisfatório nessa temática. Atualmente há uma preocupação crescente com o bem-estar animal nas pesquisas científicas envolvendo animais de laboratório. No entanto, dúvidas frequentes atreladas ao comportamento animal, a falta de treinamento e as lacunas existentes nos parâmetros fisiológicos apontam um cenário crítico nas questões de bem-estar animal nos laboratórios brasileiros (DEGUCHI; TAMIOSO; MOLENTO, 2016).

Frente a esse cenário de apelo pelo bem-estar animal, estudos recentes evidenciam que a capacidade de vivenciar e compartilhar as emoções, antigamente considerada, exclusivamente, um processo afetivo-cognitivo em humanos, é possível de ser observada, de forma confiável, em animais de laboratório. Dessa forma, independente da informação (dor, medo ou analgesia) há uma manifestação comportamental devido a vivência de um estado sensorial-afetivo alterado e isto torna factível dos pesquisadores analisarem esses animais de forma global (SMITH; ASADA; MALENKA, 2021).

A monitoração anestésica para animais experimentais muitas vezes não abrange critérios básicos e, assim, cria-se um questionamento sobre os reflexos de possíveis complicações transanestésicas que passam despercebidas e, conseqüentemente, alterações no bem-estar. Na rotina prática, quadros de hipotensão e possivelmente hipoperfusão são visualizados, assim, ainda não está claro a frequência dessa complicação em ratos e os possíveis impactos nos resultados das pesquisas científicas.

Além disso, deve-se admitir que todo procedimento cirúrgico é potencialmente causador de estímulo nociceptivo exacerbado, ou seja, deve-se elaborar uma estratégia de analgesia e, além disso, utilizar ferramentas efetivas para avaliar a dor e nocicepção nos animais de laboratório. Até hoje, não há nenhuma ferramenta que, isoladamente, avalie todos os aspectos atrelados a neurofisiologia da dor, assim, a associação de métodos potencializa os trabalhos atrelados a dor.

A *Rat Grimace Scale* (RGS) é, atualmente, a escala de expressão fácil mais difundida na avaliação de dor para ratos, sendo de fácil execução e, conseqüentemente, possibilita intervenção precoce no controle da dor. Já o Analgesímetro de Von Frey (AVF) é uma ferramenta que possibilita, através do

estímulo mecânico inócuo e crescente, avaliar a sensibilidade mecânica de determinado local, ou seja, nocicepção.

Desta forma, o presente estudo visa apresentar os resultados obtidos de pesquisas básicas voltadas ao bem-estar animal. Assim, será evidenciado uma das complicações mais comuns durante o período transanestésico, a hipotermia, e, junto a ela, o Gradiente de Temperatura Centro-Periférica (ΔT_{cp}) para ratos anestesiados com isoflurano. Além disso, serão apresentadas informações sobre o poder analgésico do tramadol preemptivo, administrado por via subcutânea, em ratos submetidos a procedimento cirúrgico através da RGS e AVF.

2 CONCEITOS GERAIS E REVISÃO DE LITERATURA

2.1 GRADIENTE DE TEMPERATURA CENTRO-PERIFÉRICA EM RATOS

2.1.1 Termorregulação do rato de laboratório: Aspectos gerais

Os sistemas orgânicos dos animais estão constantemente minimizando possíveis alterações que possam comprometer o seu funcionamento adequado (KURZ, 2008). Sendo assim, sabe-se que a termorregulação se dá de forma rigorosa, utilizando uma variedade de respostas e comportamentos autonômicos (SATINOFF, 1978).

De forma geral, a temperatura corporal central utiliza o sistema de *feedback* negativo para alcançar o controle fisiológico e, conseqüentemente, a normotermia. Dessa forma, através de informações aferentes de receptores de temperatura, o hipotálamo irá mediar o controle autonômico, alterando o tônus vascular cutâneo para variar o fluxo sanguíneo por meio de *shunts* arteriovenosos (KURZ, 2008).

Além disso, trabalhos antigos e bem detalhados, evidenciam a fisiologia térmica dos ratos de laboratório (GORDON, 1990), assim, sendo possível compreender a multiplicidade dos componentes envolvidos nessa dinâmica (HANKENSON et al., 2018). A temperatura central dos ratos apresenta variação de acordo com a temperatura ambiente que estes estão expostos, por exemplo, animais aclimatados em uma temperatura ambiente de 20 a 24°C apresentam temperatura retal entre 37 e 38°C (GORDON, 1990).

Além disso, pode-se afirmar que o efeito da temperatura ambiente na taxa metabólica dos animais homeotérmicos é a resposta fisiológica mais estudada (GORDON, 1990). Assim, torna-se importante ressaltar que existem três fases do metabolismo em função da temperatura ambiente, sendo eles a *Thermoneutral Zone* (TNZ), *Upper Critical Temperature* (UCT) e a *Lower Critical Temperature* (LCT) (BLIGH; JOHNSON, 1973).

A TNZ engloba a faixa de temperatura ambiente onde a taxa metabólica é mínima e a temperatura corporal é regulada, principalmente, pela modulação do tônus vasomotor periférico, nessa fase há perda de calor seco. A UCT é caracterizada por uma temperatura ambiente aumentada acima da TNZ, assim, a taxa metabólica aumenta e alguns mecanismos fisiológicos e comportamentais são desencadeados (BLIGH; JOHNSON, 1973). Por fim, a LCT é a fase caracterizada pelo decréscimo da

temperatura ambiente, sendo este abaixo da TNZ. Dessa forma, a perda de calor seco será mínima devido a vasoconstrição periférica e o organismo do animal compensará esse fenômeno por meio de tremores e/ou termogênese sem tremores, visando atingir o equilíbrio entre a perda de calor e produção de calor (BLIGH; JOHNSON, 1973).

Após o entendimento dos conceitos básicos acima, é relevante ressaltar que o parâmetro térmico mais usual e aferido em ratos é a temperatura interna ou central. A aferição desse parâmetro térmico ocorre a partir da inserção de um dispositivo termossensível no reto ou cólon do animal (GORDON, 1990).

Mesmo aparentando ser uma técnica simples, a aferição da temperatura central de ratos de laboratório já foi motivo para estudos em 1966, assim, as diferentes distâncias de inserção do disposto termossensível reflete diretamente na obtenção de valores fidedignos. Dessa forma, a literatura aponta que a sonda deve ser inserida, no mínimo, 6 cm no reto do animal, pois distâncias inferiores a 5 cm refletem em temperaturas drasticamente inferiores, além disso, o dispositivo deve permanecer durante todo tempo do experimento (LOMAX, 1966).

Tendo como pressuposto que os ratos de laboratório são animais sensíveis ao estresse, deve-se considerar esse fator durante a aferição de temperatura central. O simples manuseio destes animais gera estresse e elevação prolongada da temperatura corporal em até 1° C (BRIESE; QUIJADA, 1970; LOTZ; MICHAELSON, 1978; POOLE; STEPHENSON, 1977).

Outro ponto importante da aferição da temperatura retal dos ratos de laboratório é a fase do dia. Considerando animais não estressados, a média de temperatura retal varia em torno de 37,2°C quando aferida entre 09:00 e 15:00 horas. No entanto, às 17:00 horas, a temperatura do cólon demonstra aumento de 0,6°C, ou seja, esses valores refletem que há elevação da temperatura central durante a fase noturna do ciclo circadiano (BRIESE; QUIJADA, 1970).

2.1.2 Termorregulação e anestesia geral

A hipotermia é uma das complicações anestésicas mais comuns, ela ocorre em humanos, animais de companhia e espécies de laboratório (TAYLOR, 2007). Esse fenômeno acontece pois os fármacos utilizados para promover anestesia geral não atuam no sistema nervoso central de forma seletiva, ou seja, geram respostas indesejáveis como a perda de calor, diminuição da detecção da hipotermia pelo sistema nervoso central e, além disso, tem o potencial de inibir as respostas

termogênicas compensatória. Todas essas respostas podem causar consequências irrevogáveis e, conseqüentemente, levar o animal à morte (SHIREY et al., 2015; TAYLOR, 2007).

De forma geral, quando o centro termorregulatório é comprometido (aumento do limiar hipotalâmico), inicia-se um processo de redistribuição de calor entre os compartimentos periféricos e centrais. Esse fenômeno corresponde a 80% da perda de calor durante a primeira hora de anestesia geral (MATSUKAWA et al., 1995).

Tendo isso como base, sabe-se que a perda de calor ocorre, principalmente, por meio da radiação e evaporação a partir da pele. Além disso, as principais drogas anestésicas utilizadas para roedores, incluindo o isoflurano, apresentam como característica a vasodilatação periférica, ou seja, colaboram para o aumento da perda de calor. Nesse quesito, ainda se ressalta, que nos procedimentos que culminem na abertura de alguma das cavidades do corpo (tórax ou abdômen) a dissipação do calor é exacerbada (SKORUPSKI et al., 2017).

Como a maioria dos fármacos utilizados para promover anestesia geral, o isoflurano tem efeito dose-dependente, e a supressão causada na atividade hipotalâmica também adota essa regra, diminuindo, assim, a temperatura na qual o hipotálamo responde à hipotermia. Dessa forma, o principal centro moderador da termorregulação no cérebro é comprometido, impossibilitando a integralização das informações aferentes de locais periféricos (XIONG et al., 1996).

Além da perda de calor potencializada e a detecção do frio suprimida, os anestésicos gerais prejudicam as respostas compensatórias que visam gerar ou preservar o calor. Dessa forma, a supressão cerebral causada pela anestesia geral irá bloquear as tentativas do sistema nervoso simpático de alcançar a normotermia, assim, culminando no não incremento nos valores das frequências cardíaca e respiratória e na inibição do aumento induzido por catecolaminas na taxa metabólica (CARO; HANKENSON; MARX, 2013).

Os efeitos mencionados anteriormente são, literalmente, o oposto do que se espera em animais conscientes submetidos ao desafio do frio. Quando não há atuação de fármacos, os animais hígidos apresentam aumento das taxas metabólicas, frequências cardíaca e respiratória, visando manter a temperatura corporal (CARO; HANKENSON; MARX, 2013).

2.1.3 Impactos negativos relacionados a hipotermia

Levando em consideração que a hipotermia transanestésica gera múltiplos impactos, nesse subcapítulo serão listados os pontos mais significativos dessa temática. Dessa forma, um estudo recente mostrou que a hipotermia induzida pela anestesia geral com isoflurano aumentou os escores da *Rat Grimace Scale* (KLUNE et al., 2020), mostrando, assim, interferência em um dos importantes métodos desenvolvidos para a avaliação da dor em ratos (SOTOCINAL et al., 2011b). Além disso, em humanos, a hipotermia está associada ao maior requerimento de medicações analgésicas no período pós-operatório (BENSON; MCMILAN; ONG, 2012).

Outro impacto relevante está refletido na qualidade dos dados coletados durante procedimentos experimentais em roedores de laboratório. Sabendo que a temperatura desses animais declina rapidamente ao iniciar a anestesia geral, estudos mostram que o monitoramento da temperatura central pode colaborar e otimizar os resultados experimentais, além disso, modelos de isquemia-reperusão hepática dependem de um controle cuidadoso da temperatura transanestésica, pois só assim é possível conseguir modelos de alta qualidade (DEVEY; FESTING; WIGMORE, 2008; MARSCHNER et al., 2016).

Estudo em humanos demonstraram que a hipotermia transanestésica aumenta as taxas de infecção pós-operatória (KURZ; SESSLER; LENHARDT, 1996), além disso, está atrelada a coagulopatias, onde o tratamento mais eficiente é o reaquecimento do paciente e não o uso de fatores da coagulação (REED et al., 1992). Por fim, em pacientes com fatores de risco cardíaco, submetidos à cirurgia não cardíaca, a manutenção transanestésica da normotermia está associada à redução da incidência de eventos cardíacos mórbidos e taquicardia ventricular (FRANK et al., 1997).

Em cães, estudos demonstram que a hipotermia é uma complicação comum durante a anestesia geral, assim, entre outros efeitos deletérios, ela está associada a recuperação mais lenta da anestesia (POTTIE et al., 2007). A recuperação rápida e descomplicada é um objetivo importante em qualquer procedimento anestésico, dentro desse pensamento, em camundongos C57BL/6 foi observada uma correlação entre a temperatura e o tempo de recuperação anestésica, onde aqueles animais com temperaturas corporais diminuídas precisaram de um tempo maior (2 a 3 vezes) para se recuperar da exposição ao anestésico geral em relação aos animais que mantiveram normotermia (CARO; HANKENSON; MARX, 2013).

Frente ao que foi exposto, fica evidenciada a importância da monitoração da temperatura dos ratos de laboratório. A hipotermia durante o período transanestésico em pequenos roedores é uma complicação que não deve ser negligenciada, pois têm potencial suficiente para comprometer a saúde do animal e a qualidade dos dados das pesquisas (CARO; HANKENSON; MARX, 2013).

2.1.4 Monitorização da perfusão tecidual

Visando elucidar as possibilidades de monitoração da perfusão tecidual, esse subcapítulo irá abordar os principais indicadores de perfusão. Entretanto, é prudente ressaltar que a maioria dos estudos e a aplicabilidade prática está vinculada aos seres humanos.

Entre as diferentes atribuições do sistema cardiorrespiratório, ele desempenha um papel fundamental na manutenção da perfusão e oferta de oxigênio para as células do corpo. De forma geral, essa manutenção nos tecidos é controlada pela taxa metabólica celular e envolve diversos mecanismos de resposta (RÉA-NETO et al., 2006).

Destaca-se que a hipoperfusão tecidual está diretamente atrelada a lesão orgânica e, conseqüentemente, disfunção de múltiplos órgãos, assim, se torna indispensável a monitoração da perfusão tecidual, entretanto, nenhuma forma de avaliação é 100% sensível ou específica, logo, deve-se associar a outros parâmetros e buscar potencializar o diagnóstico precoce (RÉA-NETO et al., 2006). Nesse pensamento, a monitoração clínica pode auxiliar no processo de identificação e antecipar o manejo para reversão desse quadro (RADY; RIVERS; NOWAK, 1996).

Dentro dos parâmetros clínicos, a pressão arterial é um indicador tardio da hipoperfusão, pois sua alteração só ocorre quando aproximadamente 30% do volume circulante for interrompido (RADY; RIVERS; NOWAK, 1996). Dessa forma, sinais mais precoces podem ser observados, como o estreitamento da pressão de pulso secundária, uma pequena diminuição da pressão sistólica e a elevação da pressão diastólica que ocorre devido ao aumento de catecolaminas circulante (BAILEY et al., 1990).

A taquicardia também pode ser um indicador de perfusão inadequada, ela irá ser pronunciada quando ocorrer uma perda de, aproximadamente, 15% do volume circulante (BOLDT, 2002). Além disso, pode-se observar o aumento do tempo de preenchimento capilar e extremidades frias em consequência da vasoconstrição

reflexa em resposta a hipoperfusão (BAILEY et al., 1990). Por fim, outro sinal clínico inespecífico é a taquipneia, esta pode estar atrelada a acidose metabólica, onde haverá compensação respiratória visando reverter o quadro (BOLDT, 2002).

O gradiente de temperatura é um método não invasivo e que sinaliza precocemente quadros de hipoperfusão. De forma geral, ele baseia-se na premissa de que a vasoconstrição cutânea ocorre de forma reflexa e, frente a isso, há a redução do metabolismo periférico e, conseqüentemente, a diferença entre a temperatura central e periférica irá aumentar (RÉA-NETO et al., 2006).

Em humanos, o gradiente de temperatura centro-periférica é empregado para diagnosticar e tratar quadros de fluxo sanguíneo global irregular. Em termos gerais, um gradiente de 3°C a 7°C está presente quando a hemodinâmica do paciente está otimizada, entretanto, valores acima de 7°C são sugestivos de hipoperfusão (VINCENT; MORAINÉ; VAN DER LINDEN, 1988). Dessa forma, essa medida pode ser útil para avaliar de forma não invasiva o fluxo sanguíneo e, conseqüentemente, auxilia no diagnóstico de hipoperfusão (KAPLAN et al., 2001).

O lactato é um marcador muito utilizado e estudos demonstram seu potencial quando avaliado de forma seriada (NGUYEN et al., 2004). A acidose metabólica, frequentemente, surge em pacientes com hipóxia tecidual e, em geral, a causa é a acidose láctica. Em condições de hipóxia tecidual, o piruvato como produto da glicólise anaeróbica não é utilizado no Ciclo de Krebs e transforma-se em lactato, que irá circular no plasma (RÉA-NETO et al., 2006).

A hiperlactatemia indica diversas formas de falência circulatória. Além disso, diversos estudos mostram que a elevação do lactato sérico está atrelada ao aumento das taxas de disfunção orgânica e mortalidade, sendo um marcador equivalente ou superior a outras variáveis de oxigenação tecidual (BAKKER et al., 1996). Por fim, em quadros de traumatismo grave, a hiperlactatemia esta relacionada a instabilidade hemodinâmica aguda e incidência de complicações (BLOW et al., 1999).

Entre os indicadores perfusionais, a saturação venosa mista de oxigênio (SvO₂) é o padrão ouro. De forma geral, ela representa o equilíbrio entre a demanda e oferta de oxigênio em toda a circulação sistêmica. Tendo esse conceito como premissa e sabendo que a hipoperfusão tecidual é o desequilíbrio entre demanda e oferta real de oxigênio, fica evidente a importância desse indicador. Apesar da sua precisão em determinar alterações na perfusão, esse marcador é mais difundido para fins experimentais devido a sua invasividade (RIVERS; ANDER; POWELL, 2001).

2.1.5 Gradiente de temperatura centro-periférica

A obtenção dos valores de temperatura central e periférica são relativamente simples. Dessa forma o gradiente dessas temperaturas se torna uma ferramenta interessante, sendo acessível para muitos profissionais (LIMA; BAKKER, 2015).

O Gradiente de Temperatura Centro-Periférica (ΔT_{cp}) é um método não invasivo de monitoramento do estado cardiovascular. Esse parâmetro pode integrar parte da avaliação do paciente e é um indicador de perfusão periférica (WEIL, 2005). Para obter o valor de ΔT_{cp} é necessário aferir a temperatura central e periférica e posteriormente subtrair uma da outra (KAPLAN et al., 2001).

De forma geral, o ΔT_{cp} é um marcador da adaptação circulatória e está sendo difundido cada vez mais. O monitoramento desse gradiente se torna válido principalmente para pacientes em estado crítico, entretanto, a escassez de pesquisas robustas e recentes dificulta a recomendação para o uso na prática clínica (SCHEY; WILLIAMS; BUCKNALL, 2010).

Além disso, mesmo sendo um método não invasivo e de fácil uso, a maioria dos trabalhos publicados são de natureza experimental, ou seja, não refletem a rotina prática. Até que esse parâmetro seja testado com mais rigor, as recomendações apontam que ele deve ser utilizado como complemento de outros sinais clínicos e das variáveis hemodinâmicas (SCHEY; WILLIAMS; BUCKNALL, 2010).

Na Medicina Veterinária o assunto é ainda incipiente e não há evidências científicas suficientes que validem o uso do gradiente de temperatura no cenário clínico. Nesse contexto, a pesquisa mais recente em cães objetivou avaliar o gradiente de temperatura retal-digital (centro-periférica) entre cães que foram atendidos com sinais clínicos de choque e àqueles sem sinais de choque, assim, verificar se esse gradiente poderia ser usado como marcador diagnóstico para choque. Com base nisso, os autores concluíram que um gradiente de 8,5°F pode ser usado como triagem e um de 11,6°F indica alta suspeita de choque circulatório em cães, assim, pode-se determinar um marcador diagnóstico de choque circulatório (SCHAEFER et al., 2020).

Estudos em humanos refletem sobre a hipoperfusão tecidual e os custos para manter órgãos vitais perfundidos, ou seja, a temperatura central é mantida às custas da vasoconstrição periférica. Assim, a diferença entre essas temperaturas será aumentada e, conseqüentemente, é possível estabelecer um indicador de perfusão periférica (HOUSE; TIPTON, 2002). Em pacientes críticos, o gradiente normal de

temperatura entre antebraço e ponta do dedo varia de 3-7°C, entretanto, valores superiores podem indicar vasoconstrição grave e, assim, hipoperfusão tecidual (SESSLER; HOUSE; TIPTON, 2003).

Por fim, vale ressaltar a importância da avaliação desse gradiente de temperatura em situações em que há falha circulatória (síndrome choque), pois nesses casos o sangue é redirecionado para órgãos vitais por meio da atividade simpática e redução da atividade vagal, resultando na vasoconstrição periférica. Tendo em vista essas alterações, sabe-se que essa será a primeira linha de resposta compensatória, potencializando, assim, a importância desse gradiente frente a hipoperfusão tecidual (VAN GENDEREN; VAN BOMMEL; LIMA, 2012; VINCENT; INCE; BAKKER, 2012).

2.2 AVALIAÇÃO DA DOR AGUDA PÓS-OPERATÓRIA EM RATOS

2.2.1 Dor e nocicepção em animais de laboratório

A definição de dor vem sendo estudada e discutida desde antes de 1978, entretanto, apenas no ano mencionado recomendou-se, por especialistas, ao conselho da *International Association for the Study of Pain (IASP)*, que fossem definidos “*Pain Terms*” (“Pain terms: a list with definitions and notes on usage. Recommended by the IASP Subcommittee on Taxonomy.”, 1979). Após esse apelo, o conselho da IASP aprovou a recomendação e, assim, a mais de quatro décadas existe uma definição mundial de dor (“The need of a taxonomy”, 1979).

Entretanto, nos últimos anos, alguns profissionais apontaram a necessidade de uma reavaliação e modificação da definição de dor. Logo, em 2018 a IASP formou um grupo multinacional com renomados profissionais, o objetivo foi avaliar e modificar, caso necessário, a definição de 1978. Assim, desde 2020, considera-se que a dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável associada ou semelhante àquela associada a dano tecidual real ou potencial (RAJA et al., 2020).

Outro conceito importante é o de nocicepção, o qual refere-se à atividade que ocorre no sistema nervoso em resposta a um estímulo nocivo. Assim, sabe-se que a dor e a nocicepção são fenômenos com características diferentes, dessa forma, a experiência da dor não pode ser reduzida à atividade das vias sensoriais (RAJA et al., 2020).

Por muito tempo existiu uma discussão atrelada a capacidade dos animais sentirem dor e não simplesmente nocicepção. O principal ponto é determinar se esses indivíduos podem discriminar o estado doloroso e não doloroso, ou seja, a resposta não pode ser de forma inconsciente. Para chamarmos de dor uma experiência em questão, os animais precisam demonstrar motivação para evitá-la, apresentar medo ou ansiedade e alterações comportamentais espontâneas (INSTITUTE FOR LABORATORY ANIMAL RESEARCH (U.S.). COMMITTEE ON RECOGNITION AND ALLEVIATION OF PAIN IN LABORATORY ANIMALS., 2009).

Evidências experimentais apontam que ratos são capazes de distinguir a injeção de aspirina da injeção de solução salina através da mudança no comportamento em relação ao alimento (WEISSMAN, 1976). Além disso, ratos com artrite apresentaram comportamento de discriminação do estado doloroso quando comparados ao grupo controle (SWEDBERG et al., 1988).

Outro tópico relevante é em relação a motivação para evitar a dor, entretanto, já existem estudos que apresentam em seus resultados a possibilidade de os ratos terem comportamento de aprendizagem. O trabalho de Martin e colaboradores (2006) evidenciou que ratos com dor pressionaram a alavanca para se automedicarem mais do que animais do grupo controle (MARTIN; KIM; EISENACH, 2006).

Por fim, mas não menos importante, ratos com artrite ou dor neuropática persistente apresentam interrupção do sono, ou seja, mudança no seu comportamento fisiológico (BLACKBURN-MUNRO, 2004). Dessa forma, é possível afirmar que existem evidências científicas consistentes sobre ratos apresentarem a experiência consciente da dor, ou seja, pode-se concluir que eles são capazes de sentir dor e nocicepção (INSTITUTE FOR LABORATORY ANIMAL RESEARCH (U.S.). COMMITTEE ON RECOGNITION AND ALLEVIATION OF PAIN IN LABORATORY ANIMALS., 2009).

2.2.2 Bem-estar em animais de experimentação: Aspectos gerais

A experimentação animal existe a muito tempo e sempre deve ser cientificamente justificável. Além disso, quando esses animais são submetidos a condições que causem dor ou sofrimento, os benefícios devem superar os custos (INSTITUTE FOR LABORATORY ANIMAL RESEARCH (U.S.). COMMITTEE ON RECOGNITION AND ALLEVIATION OF PAIN IN LABORATORY ANIMALS., 2009).

Quando houver ausência de evidência de dor, deve-se pressupor que qualquer experiência produtora de dor/desconforto em humanos também cause efeito em animais, assim, ela deve ser evitada e controlada. Dentro dos protocolos de experimentação, é essencial o uso de analgésicos frente a intervenções possivelmente dolorosas, quando o procedimento for cirúrgico, a dor deve ser avaliada e reavaliada após a administração de analgésicos. Todas as possibilidades para controlar e evitar estimulação nociceptiva devem ser realizadas, tendo em vista que a dor tem potencial de produzir alterações fisiológicas que culminem na dificuldade na recuperação do animal e, também, afetar diretamente o bem-estar (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002).

2.2.3 Analgesia preemptiva em animais de laboratório

Entre as possibilidades de combater a estimulação nociceptiva exacerbada, existe a analgesia preemptiva. Esse conceito começou a ser introduzido na anestesiologia quando houve a recomendação da anestesia regional para prevenir a nocicepção durante o procedimento cirúrgico (CRILE, 1919).

De forma geral, o foco dessa abordagem é prevenir e diminuir os reflexos de “memória” causados pela dor no Sistema Nervoso Central (SNC), assim, possibilitando o menor requerimento de analgésico após circunstâncias nocivas (MCQUAY, 1992). Entretanto, apesar do momento de início da analgesia ser relevante dentro desse conceito, o foco central deve ser dado ao fenômeno fisiopatológico que será prevenido, ou seja, quando a abordagem for preventiva haverá alteração no processamento sensorial da dor (KISSIN, 1996).

Apesar da neurofisiologia da dor ser um assunto complexo, pode-se pontuar que o resultado que se busca através de uma conduta analgésica pré-cirúrgica deve ser capaz de prevenir as alterações causadas pela sensibilização central, pois preemptivo não quer dizer apenas “anterior” (CARR, 1996). Além disso, esse assunto está sendo estudado desde a primeira década do século XX, entretanto, a busca por evidências é constante. As pesquisas com animais lideram as tentativas de demonstrar o efeito preemptivo de métodos de analgesia, sendo o rato o modelo animal mais utilizado (BATISTA SANTOS GARCIA; MACHADO ISSY; KIMIKO SAKATA, 2001).

Gonzalez e colaboradores (2000) validou um modelo de dor cirúrgica através da realização de ovariectomia em ratas. Os resultados do trabalho, além de mostrarem a efetividade do modelo de dor, apoiaram o conceito de analgesia

preventiva através do bloqueio da fase de indução da dor cirúrgica com o uso de morfina 30 minutos antes do procedimento, evitando, assim, o desenvolvimento de posturas abdominais e alodinia mecânica (GONZALEZ et al., 2000).

Outros achados científicos apontam a efetividade da analgesia preemptiva. Fujita e colaboradores (2012), sugeriram com a sua pesquisa que há envolvimento das ciclooxigenases no período pós-operatório imediato. Assim, evidenciaram que a supressão inicial da inflamação através do uso de anti-inflamatório não esteroide de forma prévia a grandes cirurgias desempenha um papel ímpar no tratamento da dor pós-cirúrgica (FUJITA et al., 2012).

2.2.4 Tramadol: Evidências em ratos

Atualmente, diferentes abordagens farmacológicas podem ser empregadas para o combate da dor aguda pós-cirúrgica. Os opioides, agonistas α -2, antagonistas do receptor N-Metil D-Aspartato (NMDA) e anestésicos locais são alguns exemplos das classes que constituem essa pluralidade de possibilidades (DAHL; RAEDER, 2000).

Os opiáceos são os medicamentos mais comumente utilizados em humanos e animais (KEHLET; DAHL, 1993). A morfina é o protótipo dos agentes opioide, ela atua como agonista completo nos receptores mu (μ), kappa (κ) e delta (δ) e é eficaz em condições de dor severa em muitas espécies, dentre elas, animais de laboratório (GRIMM et al., 2015).

O tramadol também é um analgésico amplamente difundido, ele apresenta um duplo mecanismo, ou seja, age em receptores opioides e não opioides. Ele causa efeito inibitório da recaptção de norepinefrina, serotonina e ativa o receptor opioide μ , sendo essa última ação causada pelo metabólito ativo O-desmetiltramadol (GRIMM et al., 2015; GROND; SABLITZKI, 2004; SCOTT; PERRY, 2000).

De forma geral, o citocromo P-450 está ligado diretamente com as principais vias metabólicas do tramadol (O- e N-desmetilação). Em primeira instância, há a geração dos metabólitos primários O-desmetiltramadol (M1) e N-desmetiltramadol (M2), os quais, posteriormente, podem gerar metabólitos secundários adicionais, entretanto, farmacologicamente, apenas o M1 se apresenta ativo e com efeito plausível (BUDD; LANGFORD, 1999).

Rouini e colaboradores (2008) publicaram pela primeira vez um estudo sobre a farmacocinética e o metabolismo do tramadol (intravenoso) no modelo isolado de

fígado perfundido de rato. Na sua pesquisa foram analisados os três principais metabolitos do tramadol, O-desmetiltramadol (M1) e N-desmetiltramadol (M2) e N,O-didesmetiltramadol (M5), assim, concluindo que o metabólito ativo do tramadol (M1) foi formado durante todo o experimento e, além disso, apontou que o tramadol em ratos tem meia-vida média de 232,4 min e depuração hepática de 0,73 mL/min (ROUINI et al., 2008).

Mesmo que a farmacocinética e o metabolismo do tramadol em ratos tenha sido elucidado apenas em 2008, ainda em 2004 de Pozos-Guillén e colaboradores comprovaram em seu estudo a eficácia analgésica do tramadol através do teste de formalina. Com essa avaliação de antinocicepção, foi observada uma supressão dose-dependente do número de “*flinches*”, além disso, *insights* sobre rotas de ação do tramadol sugeriram uma possível atuação local (DE POZOS-GUILLÉN et al., 2004), assim, estando em consonância com outros trabalhos que mostraram a sua ação no bloqueio da condução nervosa igual a um anestésico local, entretanto, com efeito mais fraco (MERT et al., 2002).

Após comprovação científica da efetividade do tramadol em ratos, as possíveis vias de administração desse fármaco merecem discussão. Sabe-se que a administração de substâncias em animais de laboratório é um ponto crítico na experimentação, tendo em vista que, em muitos casos, há a necessidade de contenção, sedação ou até mesmo anestesia geral (TURNER et al., 2011)

Para roedores, existem diversas vias de administração de substâncias (enteral, intravenosa, subcutânea, intradérmica, intramuscular, peridural, intraperitoneal, intraóssea e intranasal), entretanto, o foco da revisão será dado para a via intraperitoneal (IP) devido a sua ampla utilização e via subcutânea (SC) por ter sido a via de eleição do experimento em questão.

A administração de medicamentos por via SC é caracterizada por ser um método simples, rápido, barato, que suporta grandes volumes e, basicamente, sem efeitos adversos associados (TURNER et al., 2011). Quanto a taxa de absorção, considere-se que essa via seja mais lenta em comparação com outras vias parenterais, assim, pode-se observar um efeito mais sustentado. Acredita-se que o mecanismo de absorção esteja relacionado a captação de macromoléculas através de pequenos capilares e com absorção linfática mínima (KAGAN et al., 2007).

A via IP é muito utilizada em animais de laboratório, todavia, mesmo sendo considerada uma opção, teoricamente, fácil, está associada a uma série de possíveis

complicações e questionamentos quanto a sua precisão (TURNER et al., 2011). Em um estudo em ratos de 1966, 19,6% das administrações IP, realizadas por pesquisadores treinados, resultaram na deposição da substância no SC, na vesícula urinária e no trato gastrointestinal (LEWIS; KUNZ; BELL, 1966).

Além disso, outras complicações são relatadas, como peritonite química, formação de tecido fibroso e aderências na cavidade, hemorragia e dificuldade respiratória devido a administração de volumes exagerados (MORTON et al., 2001). Cabe ressaltar que a prevalência das complicações citadas é incerta e, provavelmente, subestimada, pois a maioria dos animais não são necropsiados após o uso dessa via (TURNER et al., 2011).

Cannon e colaboradores (2010), realizaram um ensaio utilizando diferentes doses (4, 12,5, 25 ou 50 mg/Kg) e vias de administração (oral, SC e IP) para o tramadol. Através do teste da placa quente (*hot plate*), pode-se concluir que a via oral não foi eficaz, a via SC foi eficaz nas dosagens mais altas (25 e 50 mg/Kg) e a via IP foi efetiva nas dosagens de 12,5, 25 e 50 mg/Kg. Entretanto, doses altas (25 e 50 mg/Kg) causaram sedação e lesões cutâneas, logo, os autores apontam que a administração IP de 12,5 mg/kg de tramadol não teve efeitos colaterais notáveis e deve ser melhor estudada através de um modelo de dor cirúrgica (CANNON et al., 2010).

Os efeitos profiláticos do tramadol em ratos vem sendo pesquisado. Recentemente, um estudo demonstrou que o tramadol administrado por via intraperitoneal (1,25, 2,5 ou 10 mg/kg) 10 minutos antes da indução a dor inflamatória produziu redução significativa da hiperalgesia a estímulos mecânicos. Além disso, observou-se que o efeito anti-hiperalgésico máximo do tramadol perpetuou-se por até uma hora após a indução a dor inflamatória e seu efeito durou por até 24 horas. Vale ressaltar que não houve diferença significativa entre o efeito do tramadol frente as diferentes doses utilizadas em cada grupo (SREBRO et al., 2018).

2.2.5 Avaliação da nocicepção e dor em ratos

A neurociência da dor vem evoluindo constantemente e os métodos de avaliação da nocicepção e dor seguem o mesmo fluxo. Durante anos, a ciência básica da dor apenas tinha como embasamento testes nociceptivos realizado em animais, entretanto, sua limitação era evidente. Frente a isso, um esforço crescente possibilitou

o desenvolvimento de ferramentas para avaliação da dor em ratos, mesmo sendo um desafio devido a subjetividade (BARROT, 2012).

A RGS é uma ferramenta que avalia as expressões faciais de ratos e, através do seu estudo piloto, demonstrou confiabilidade, precisão e capacidade de quantificar a dor espontânea em diferentes modelos de dor, inclusive, a pós-cirúrgica. Nesse contexto, sua relevância se torna evidente e tem o potencial de realizar traduções mais bem-sucedidas das descobertas científicas básicas (SOTOCINAL et al., 2011a). A Figura 1 exemplifica as pontuações e expressões faciais avaliadas pela RGS.

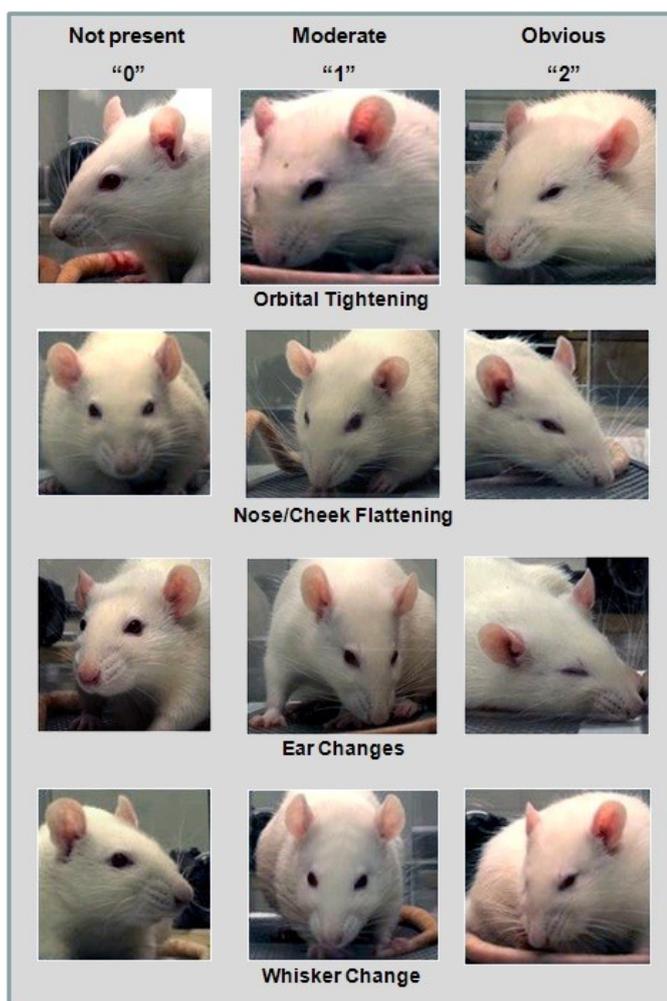


Figura 1 – Imagens faciais de ratos Wistar apresentando as quatro unidades de ação e suas respectivas pontuações. Fonte: SOTOCINAL et al., 2011.

Após a validação da RGS, foi observado um problema atrelado ao método retrospectivo de pontuação. Dessa forma, um estudo comparou a avaliação em tempo real e a realizada com imagens coletadas previamente, o qual indicou que a RGS em tempo real foi um método viável e eficaz, assim, permitindo a identificação e intervenção de forma precoce (LEUNG; ZHANG; PANG, 2016).

Além da avaliação da dor, quantificar a nocicepção também é um componente importante em pesquisas relacionadas a dor e analgesia (SCHUSTER; PANG, 2021). O Analgesímetro Von Frey é muito difundido para avaliar a sensibilidade ao estímulo mecânico, muitos trabalhos já mostraram a sua relevância clínica e para experimentos laboratoriais (CHAPLAN et al., 1994; HO KIM; MO CHUNG, 1992).

Inicialmente, os testes eram realizados, exclusivamente, com filamentos de diferentes gramaturas. Dessa forma, alguns métodos foram desenvolvidos para determinar a melhor metodologia a ser adotada, entre eles, up-down (CHAPLAN et al., 1994; DIXON, 1980), ascending stimulus (LIU et al., 2019) e percent response (CHAPLAN et al., 1994; HO KIM; MO CHUNG, 1992).

Entretanto, o desenvolvimento do sistema eletrônico de Von Frey, possibilitou que um único filamento fosse aplicado com força crescente até que o animal apresente uma resposta positiva (DEUIS; DVORAKOVA; VETTER, 2017). A partir dessas novas possibilidades, estudos apontam que o método eletrônico configura um teste nociceptivo mecânico sensível, objetivo e quantitativo (VIVANCOS et al., 2004). Na Figura 2 é possível observar o método manual (A) e eletrônico (B) do teste Von Frey.

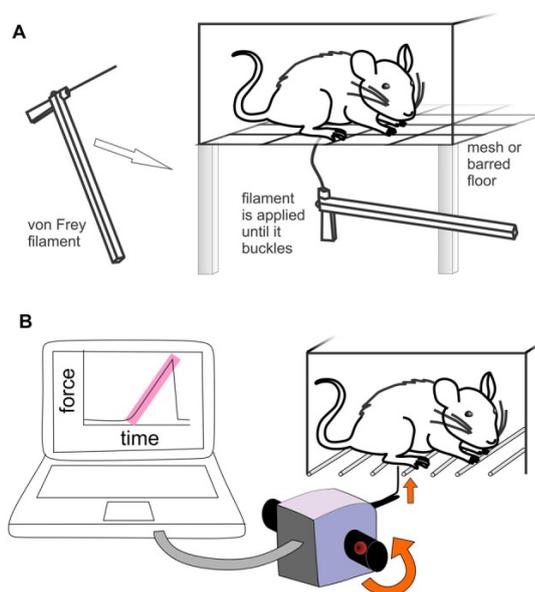


Figura 2 – Ilustrações demonstrando a utilização do Von Frey manual (A) e Von Frey eletrônico (B).
Fonte: DEUIS; DVORAKOVA; VETTER, 2017.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Englobando as duas pesquisas realizadas, tem-se como objetivo determinar a eficácia do tramadol, administrado de forma preemptiva por via subcutânea, na analgesia pós-operatória de ratos submetidos ao procedimento de artrotomia medial de joelho com transecção do ligamento cruzado cranial e evidenciar os valores de ΔT_{cp} para ratos anestesiados com isoflurano para exames de imagem.

3.2 Objetivos específicos

1. Determinar qual a dose de tramadol (10 ou 5 mg/Kg) será mais efetiva na analgesia preemptiva.
2. Determinar possíveis influências do ΔT_{cp} sobre o tempo de recuperação anestésica dos ratos.

4 APRESENTAÇÃO DA PESQUISA E ANÁLISE DOS RESULTADOS

Este capítulo apresenta a parte central do trabalho, onde será mostrado, através de artigos científicos, a pesquisa realizada, os resultados obtidos e a discussão dos tópicos mais relevantes. Enfatiza-se que para ambas as pesquisas foram utilizados os mesmos animais, sendo que os exames ultrassonográfico e radiográfico foram realizados 30 dias após o procedimento de artrotomia medial de joelho com transecção do ligamento cruzado cranial. Os dois artigos foram formatados conforme as normas solicitadas pela revista científica, *Laboratory Animals*, sendo futuramente transcrito para o inglês e submetido para publicação.

4.1 Artigo Científico 1

Gradiente de Temperatura Centro-Periférico em *Rattus norvegicus albinus*: Um Novo Critério de Exclusão na Pesquisa Científica

Resumo

O Gradiente de Temperatura Centro-Periférica (ΔT_{cp}) é um marcador da adaptação circulatória e através dele é possível ser avaliado o fluxo sanguíneo de forma rápida e não invasiva. Até o momento, a literatura não trás valores fisiológicos desse gradiente para animais de laboratório, assim, sua relevância e o seu impacto não estão elucidados. O objetivo do presente estudo foi determinar os valores de ΔT_{cp} para ratos anestesiados com isoflurano. Dessa forma, 48 *Rattus norvegicus albinus* machos, foram submetidos a anestesia geral com isoflurano para a realização de exames ultrassonográfico e radiográfico. No presente estudo nenhum óbito foi registrado, a média da temperatura retal aferida no início e no fim da anestesia foi de 37,51 °C e 36,92 °C, respectivamente, e média da temperatura periférica inicial e final foi de 35,26 °C e 36,31 °C, respectivamente. O gradiente de temperatura centro-periférica no início e ao final da anestesia foi de 2,25 e 0,61 °C, respectivamente. Conclui-se que manobras simples, como o gerenciamento de temperatura ambiente,

associado a rápida intervenção com aquecimento ativo em casos de hipotermia e manutenção de um plano anestésico moderado possibilitaram a redução do ΔT_{cp} de ratos machos sob anestesia geral (de $2,25 \pm 1,02$ °C para $0,61 \pm 0,51$ °C) uma recuperação anestésica breve. Pelos valores de ΔT_{cp} de ratos machos sob anestesia geral com isoflurano terem sido evidenciados de forma pioneira. os impactos vinculados a alteração desse gradiente, bem como, valores que caracterizam prejuízo perfusional ainda precisam ser investigados.

Palavras-chave: roedores, anestesia geral, hipotermia, perfusão.

Introdução

O isoflurano, assim como os demais anestésicos gerais, é caracterizado pela sua ação não seletiva no sistema nervoso central (SNC). Conseqüentemente, esse fármaco promove, entre outros efeitos indesejáveis, a perda de calor, diminuição da detecção da hipotermia pelo SNC e tem o potencial de inibir as respostas termogênicas compensatória, logo, colabora para quadros de hipotermia transanestésica (1,2).

Dentro desse cenário, a hipotermia é uma das principais complicações anestésicas e suas conseqüências já são elucidadas em animais de laboratório. Sabe-se que a hipotermia induzida pela anestesia geral com isoflurano aumenta os escores da *Rat Grimace Scale* (RGS) (3). Além disso, a perda de temperatura reflete na qualidade dos dados coletados durante procedimentos experimentais em roedores. O monitoramento da temperatura central pode colaborar para a detecção precoce da hipotermia e possíveis intervenções, visando a normotermia, o que tornará os resultados experimentais fidedignos (4,5).

Dessa forma, um parâmetro de fácil obtenção e que pode expressar grande significado é o Gradiente de Temperatura Centro-Periférica (ΔT_{cp}) (6). O ΔT_{cp} é um marcador da adaptação circulatória (7) e torna possível que seja avaliado o fluxo sanguíneo de forma rápida e não invasiva (8), entretanto, até o momento, a literatura não trás valores fisiológicos desse gradiente para animais de laboratório, assim, sua relevância e o seu impacto não estão elucidados.

Frente a esse cenário, o objetivo principal do presente estudo foi determinar os valores de ΔT_{cp} para ratos anestesiados com isoflurano. Além disso, como objetivo secundário, buscou-se determinar possíveis influências do ΔT_{cp} sobre o tempo de recuperação anestésica.

Animais

O presente estudo foi realizado de acordo com as diretrizes do *National Institutes of Health* (NIH) para uso de animais experimentais e todo o protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pampa – Campus Uruguaiana (048/2021). Dessa forma, 48 *Rattus norvegicus albinus* machos, pesando aproximadamente $404 \pm 26,79g$, foram alojados no Biotério da mesma instituição, sendo mantidos em gaiolas coletivas de plástico com piso sólido (41 x 34 x 17 cm) com até três animais por caixa, onde rolos de papel foram utilizados para enriquecimento ambiental, além de livre acesso à ração (Ratos e Camundongos Peletizado, Presence, Brasil) e água (BRK Ambiental), até o término do experimento. O ambiente contou com controle de temperatura (21 ± 2 °C) e umidade (aproximadamente 60%). O ciclo de iluminação claro-escuro foi de 12 horas, sendo o período de luz das 07:00 às 19:00. Todos os animais foram submetidos a anestesia

geral para a realização de exames ultrassonográfico e radiográfico e, ao final do experimento foram eutanasiados.

Materiais e Métodos

Os ratos passaram por um período de aclimatação de 15 dias, sendo manuseados diariamente (uma vez ao dia) para que houvesse adaptação aos tratadores e a contenção física, assim, visando redução do estresse. Além disso, no dia da coleta dos dados, foi realizada a ambientação dos animais à sala de diagnóstico por imagem, uma hora antes da realização dos exames radiográfico e ultrassonográfico.

Protocolo anestésico:

Os animais foram anestesiados com isoflurano (Cristália, Itapira, Brasil) diluído em oxigênio 100% através de um vaporizador de isoflurano funil-fill (Harvard Apparatus, Massachusetts, EUA). Foi utilizada uma câmara de indução, onde foi fornecido o volume de 4% de isoflurano pelo período de um a dois minutos, até a perda da deambulação, o que configurava a indução anestésica. Já, a manutenção aconteceu através de uma máscara facial acoplada ao sistema anestésico de *Bain*, onde foi fornecido o volume de 2% de isoflurano para obtenção de um plano anestésico moderado.

A profundidade anestésica foi avaliada de acordo com a resposta aos estímulos nocivos (9). Com o auxílio de uma pinça anatômica (Brasmed, São Paulo, Brasil), foram testados os seguintes reflexos: reflexo de retirada do membro anterior, reflexo de retirada do membro posterior, reflexos palpebrais e reflexo da cauda. Foi considerado plano anestésico moderado quando os animais perdiam três dos quatro reflexos avaliados. A ausência de quatro reflexos culminava na redução do

fornecimento do anestésico e quando mais de um reflexo estava presente, realizava-se o aumento. Além disso, outros sinais vitais, incluindo a temperatura central (retal), temperatura periférica (orelha externa), frequência cardíaca e frequência respiratória, foram monitorados durante o procedimento anestésico.

Todos os parâmetros monitorados, obtidos com auxílio de um monitor multiparamétrico (LifeWindow Lite LW8Vet - Digicare Animal Health, Rio de Janeiro, Brasil), doppler vascular (DV 610 V – MEDMEGA, São Paulo, Brasil) e termômetro infravermelho (GP-300 – Xiande, Xangai, China) foram registrados a cada dois minutos em uma ficha anestésica. Ao término da realização dos exames foi encerrado o fornecimento do anestésico geral, sendo considerado que os ratos estavam recuperados da anestesia quando houvesse o reestabelecimento da atividade locomotora e da temperatura retal.

Aferição das temperaturas (periférica e central):

Para a aferição da temperatura central foi utilizada uma sonda de temperatura acoplada a um monitor multiparamétrico. Dessa forma, optou-se pela aferição da temperatura retal e a inserção da sonda foi padronizada em 6 cm (10).

Já a aferição da temperatura periférica aconteceu por meio de um termômetro infravermelho. O local de escolha para a aferição foi a orelha externa, seguindo as orientações do fabricante em realizar as mensurações a uma distância de 3 cm. A monitoração da temperatura foi registrada em dois momentos: imediatamente após a indução anestésica e imediatamente após o encerramento do fornecimento do anestésico geral.

Aquecimento:

Como protocolo, nos quadros de temperatura central abaixo de 36°C (11) foi utilizada uma bolsa térmica (Termogel, São Paulo, Brasil) como fonte de aquecimento. A bolsa térmica foi aquecida por 2 min e sua temperatura era de 40°C, além disso, visando evitar queimaduras, havia um tecido entre o animal e a bolsa térmica. A fonte de calor era removida após o animal atingir a normotermia.

Controle da temperatura e umidade da sala de diagnóstico por imagem:

O local onde foram realizados os exames de imagem era climatizado, havendo um controle rígido de temperatura (20°C - 22°C) e umidade (40% - 70%), através de um termo-higrômetro digital (INS – 1342). Os valores de temperatura e umidade foram registrados antes de iniciar e ao término do procedimento.

Estatística:

Os dados do início e término do procedimento anestésico (temperatura central e periférica, ΔT_{cp} , tempo de manutenção e indução anestésica, requerimento de isoflurano, tempo de recuperação e temperatura da sala) foram analisados por meio de estatística descritiva (média \pm desvio padrão). As correlações investigadas compreenderam a temperatura central e periférica, ΔT_{cp} , temperatura da sala, tempo da anestesia e tempo de recuperação.

O teste de normalidade (Shapiro-Wilk) foi realizado. Devido a distribuição normal, o Teste t de Student foi usado para comparar as médias e o Teste de Pearson para as correlações. As análises foram realizadas no *software* GraphPad Prism 8 (GraphPad Software).

Foi considerado que havia evidências para rejeitar H_0 quando $p < 0,05$. Além disso, foi considerada correlação desprezível ($r = 0 - 0,30$), correlação fraca ($r = 0,30 - 0,50$),

correlação moderada ($r = 0,50 - 0,70$), correlação forte ($r = 0,70 - 0,90$) ou correlação muito forte ($r = 0,90 - 1,00$).

Resultados

Foram utilizados 48 ratos, sendo que no presente estudo nenhum óbito foi registrado. De forma geral, pode-se visualizar que o tempo médio de indução anestésica foi de $1,42 \pm 0,48$ minutos, de manutenção anestésica de $15,66 \pm 5,37$ minutos e de recuperação anestésica de $1,59 \pm 0,91$ minutos. Já o requerimento médio de anestésico geral (isoflurano) para a manutenção anestésica foi de $1,63 \pm 0,23$ %.

A média da temperatura retal aferida no início e no fim da anestesia foi de $37,51 \pm 0,81$ °C e $36,92 \pm 0,45$ °C, respectivamente, demonstrando diferença significativa ($p < 0,0001$). Enquanto, a média da temperatura periférica inicial e final foi de $35,26 \pm 0,94$ °C e $36,31 \pm 0,41$ °C, respectivamente, também apresentando diferença ($p < 0,0001$). Quanto a necessidade de aquecimento dos animais, apenas dois ratos precisaram de suporte, por apresentarem temperaturas abaixo dos valores fisiológicos ($35,70$ e $35,10$ °C).

O gradiente de temperatura centro-periférica inicial e final apresentou diferença ($p < 0,0001$), sendo que a média foi de $2,25 \pm 1,02$ °C e $0,61 \pm 0,51$ °C, respectivamente.

O estudo demonstrou que a temperatura central final apresentou correlação moderada com os valores de ΔT_{cp} final ($r 0,64$). Da mesma forma, a temperatura periférica final apresentou correlação moderada com os valores de ΔT_{cp} final ($r -0,53$).

O tempo de recuperação dos animais não aparenta ter sido influenciado pela temperatura central final, pelo tempo de anestesia geral, nem pelo ΔT_{cp} final, uma vez que sua correlação foi desprezível, $r -0,19$, $0,29$, $-0,21$, respectivamente.

Discussão

Tendo em vista as possíveis contribuições atreladas ao ΔT_{cp} , enfatiza-se a importância da monitoração da temperatura desses animais. Além desse pretexto, a hipotermia durante o período transanestésico, em pequenos roedores, é uma complicação com potencial suficiente para comprometer a saúde do animal e a qualidade dos dados das pesquisas (12).

A partir dos dados coletados, foi possível observar que a média de temperatura dos animais não configurou quadro de hipotermia, mesmo havendo diferença estatística entre a temperatura central inicial e final. Possivelmente este fato ocorreu em função do controle da temperatura ambiente e da eficácia das manobras de aquecimento ativo empregadas.

Em um estudo de 2007, foram testados dois métodos de aquecimento para roedores. No grupo de animais onde não foram utilizados métodos de aquecimentos, após 20 minutos sob anestesia geral com isoflurano, os animais apresentaram temperaturas de 34 a 35 °C (2). Já, no presente estudo, nesse mesmo período, a faixa de temperatura nos ratos variou de 36 a 38 °C, ou seja, os animais não apresentaram quadros de hipotermia em comparação ao estudo mencionado anteriormente, além disso, acredita-se que esse fato aconteceu devido ao controle de temperatura ambiente durante a pesquisa, já que o estudo anterior apenas mensurou a temperatura da superfície da mesa onde os animais estavam e não foi mencionado se houve controle da temperatura ambiente (2).

Acredita-se que o fato de os valores de temperatura não terem apresentado correlação com o tempo de recuperação anestésica, pode estar associado a normotermia detectada no período transanestésico, o que também possibilitou que os animais apresentassem recuperação breve ($1,59 \pm 0,91$ minutos) do procedimento.

Nesse contexto, nossos resultados corroboram as evidências encontradas por outros pesquisadores, as quais apontam que a redução dos quadros de hipotermia durante a anestesia resulta na diminuição do tempo de recuperação em cães e gatos (13).

Tendo em vista que o isoflurano não atua no SNC de forma seletiva, assim, tem potencial para gerar respostas indesejáveis, como a perda de calor, diminuição da detecção da hipotermia e pode inibir as respostas termogênicas compensatória (1,2), logo, esperava-se o aumento do ΔT_{cp} final, todavia, foi observado a sua diminuição significativa em comparação aos valores do início da anestesia.

Acredita-se que a vasodilatação periférica causada pelo isoflurano (14) possa ter influenciado no aumento da temperatura periférica final ($35,26 \pm 0,94$ °C para $36,31 \pm 0,41$ °C), o que levou a diminuição do ΔT_{cp} no final do procedimento. Por ser um estudo preliminar, não se sabe o real impacto clínico da diminuição dos valores de ΔT_{cp} , no entanto, sabe-se que o aumento dessa variável está associado ao diagnóstico de choque circulatório em cães (15), além disso, pode prever, precocemente, complicações pós-operatórias de cirurgia abdominal de grande porte (16) e está atrelado a chances maiores de falência de órgãos em humanos (17).

Estudos em humanos sobre a hipoperfusão tecidual retratam os custos para manter órgãos vitais perfundidos, ou seja, a temperatura central é mantida às custas da vasoconstrição periférica. Assim, a diferença entre essas temperaturas será aumentada e, conseqüentemente, é possível estabelecer um indicador de perfusão periférica (18). Em pacientes críticos, o gradiente normal de temperatura entre antebraço e ponta do dedo varia de 3-7°C, entretanto, valores superiores podem indicar vasoconstrição grave e, assim, hipoperfusão tecidual (19).

Além disso, foi evidenciado que a isquemia em ratos, mesmo que por um curto período, influenciou na microcirculação e, conseqüentemente, na cicatrização de

feridas (20). Outro estudo relevante, mostrou em seus resultados que ratos submetidos a sessenta minutos de isquemia pulmonar e posterior reperfusão, cursaram com o aumento do número de células necróticas e, além disso, essa resposta pode resultar na irreversibilidade da lesão (21).

Modelos experimentais de isquemia cerebral são amplamente utilizados visando a compreensão dos eventos atrelados ao acidente vascular que ocorre em humanos (22). Embora as pesquisas atreladas a isquemia cerebral já tenham investigado as alterações fisiopatológicas após a indução de quadros de hipoperfusão, ainda há uma lacuna na monitoração da perfusão destes animais (23).

Nesse contexto, o estudo que visou o refinamento do modelo de acidente vascular cerebral embólico em ratos, enfatizou em sua discussão, que a pressão arterial, por exemplo, muitas vezes não foi monitorada nesses modelos experimentais (23). Essas informações auxiliam a presente pesquisa no seu apelo na utilização do ΔT_{cp} como um parâmetro simples de monitorização da perfusão.

Nosso estudo evidencia, de forma pioneira, os valores de ΔT_{cp} de ratos machos sob anestesia geral com isoflurano, variando de 2,25 °C ($\pm 1,02$) a 0,61 °C ($\pm 0,51$). Além disso, sugere-se que o ΔT_{cp} pode configurar um critério de exclusão nos estudos com ratos, pois já estão elucidadas as diversas repercussões negativas atreladas a hipoperfusão e, conseqüentemente, alterações nos dados coletados.

Conclui-se que manobras simples, como o gerenciamento de temperatura ambiente, associado a rápida intervenção com aquecimento ativo em casos de hipotermia e manutenção de um plano anestésico moderado possibilitaram, a redução do ΔT_{cp} de ratos machos no decorrer da anestesia geral e uma recuperação anestésica breve. Os valores de ΔT_{cp} identificados poderão servir de referência para estudos futuros que vislumbrem avaliação da perfusão tecidual e repercussões atreladas à procedimentos

anestésicos. Os impactos vinculados a alteração desse gradiente, bem como, valores que caracterizam prejuízo perfusional ainda precisam ser investigados.

Reconhecimentos

Gostaríamos de agradecer o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), o Programa de Apoio aos Programas de Pós-Graduação (AGP) da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA) e o Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCA) da UNIPAMPA.

Declaração de Conflito de Interesses

O(s) autor(es) declararam não haver possíveis conflitos de interesse com relação à pesquisa, autoria e/ou publicação deste artigo.

Financiamento

O(s) autor(es) declaram o recebimento do seguinte apoio financeiro para a pesquisa, autoria e/ou publicação deste artigo: duas bolsas do Programa de Demanda Social (DS) da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de Financiamento 001 e fomento para execução do projeto de pesquisa do Programa de Apoio aos Programas de Pós-Graduação (AGP) da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA).

Referências

1. Shirey MJ, Smith JB, Kudlik AE, Huo BX, Greene SE, Drew PJ. Brief anesthesia, but not voluntary locomotion, significantly alters cortical temperature. *J Neurophysiol* [Internet]. 2015;114:309–22. Available from: www.jn.org

2. Taylor DK. Study of Two Devices Used To Maintain Normothermia in Rats and Mice During General Anesthesia. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 2007;46(5):37–41.
3. Klune CB, Robbins HNK, Leung VSY, Pang DSJ. Hypothermia during general anesthesia interferes with pain assessment in laboratory rats (*Rattus norvegicus*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 2020 Nov 1;59(6):719–25.
4. Devey L, Festing MFW, Wigmore SJ. Effect of temperature control upon a mouse model of partial hepatic ischaemia/reperfusion injury. *Lab Anim*. 2008 Jan;42(1):12–8.
5. Marschner JA, Schäfer H, Holderied A, Anders HJ. Optimizing mouse surgery with online rectal temperature monitoring and preoperative heat supply. Effects on post-ischemic acute kidney injury. *PLoS One*. 2016 Feb 1;11(2).
6. Lima A, Bakker J. Clinical assessment of peripheral circulation. *Curr Opin Crit Care*. 2015 Jun 6;21(3):226–31.
7. Schey BM, Williams DY, Bucknall T. Skin temperature and core-peripheral temperature gradient as markers of hemodynamic status in critically ill patients: a review. *Heart and Lung: Journal of Acute and Critical Care*. 2010;39(1):27–40.

8. Kaplan LJ, Mcpartland K, Santora TA, Trooskin SZ. Start with a subjective assessment of skin temperature to identify hypoperfusion in intensive care unit patients. *J Trauma*. 2001;50(4):620–7.
9. Tsukamoto A, Natsuko N, Sakamoto M, Ohtani R, Tomo I. The validity of anesthetic protocols for the surgical procedure of castration in rats. *Exp Anim*. 2018;67(3):329–36.
10. Lomax P. Measurement of ‘Core’ Temperature in the Rat. *Nature* [Internet]. 1966;210(5038):854–5. Available from: <https://doi.org/10.1038/210854a0>.
11. Lapchik VBV, Mattaraia VG de M, Ko GM. Cuidados e manejo de animais de laboratório. 2nd ed. São Paulo: Atheneu; 2009. 708.
12. Caro AC, Hankenson FC, Marx JO. Comparison of thermoregulatory devices used during anesthesia of C57BL/6 mice and correlations between body temperature and physiologic parameters. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 2013;52(5):577–83.
13. Rodriguez-Diaz JM, Hayes GM, Boesch J, Martin-Flores M, Sumner JP, Hayashi K, et al. Decreased incidence of perioperative inadvertent hypothermia and faster anesthesia recovery with increased environmental temperature: A nonrandomized controlled study. *Veterinary Surgery*. 2020 Feb 1;49(2):256–64.

14. Skorupski AM, Zhang J, Ferguson D, Lawrence F, Hankenson FC. Quantification of Induced Hypothermia from Aseptic Scrub Applications during Rodent Surgery Preparation. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 2017;56(5):562–9.
15. Schaefer JD, Reminga CL, Reineke EL, Drobatz KJ. Evaluation of the rectal-interdigital temperature gradient as a diagnostic marker of shock in dogs. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*. 2020 Nov 1;30(6):670–6.
16. van Genderen ME, Paauwe J, de Jonge J, van der Valk RJP, Lima A, Bakker J, et al. Clinical assessment of peripheral perfusion to predict postoperative complications after major abdominal surgery early: A prospective observational study in adults. *Crit Care*. 2014 Jun 3;18(3).
17. Lima A, van Bommel J, Jansen TC, Ince C, Bakker J. Low tissue oxygen saturation at the end of early goal-directed therapy is associated with worse outcome in critically ill patients. *Crit Care*. 2009 Oct 1;13(5).
18. House JR, Tipton MJ. Using skin temperature gradients or skin heat flux measurements to determine thresholds of vasoconstriction and vasodilatation. *Eur J Appl Physiol*. 2002;88(1–2):141–5.
19. Sessler DI, House JR, Tipton MJ. Skin-temperature gradients are a validated measure of fingertip perfusion. *Eur J Appl Physiol*. 2003;89(3–4):401–2.

20. Molnar A, Magyar Z, Nachmias DB, Mann D, Szabo B, Toth L, et al. Effect of short-term ischemia on microcirculation and wound healing of adipocutaneous flaps in the rat. *Acta Cir Bras*. 2019;34(12).
21. Forgiarini LA, Grün G, Kretzmann NA, de Muñoz GAO, de Almeida A, Forgiarini LF, et al. When is injury potentially reversible in a lung ischemia–reperfusion model? *Journal of Surgical Research*. 2013 Jan;179(1):168–74.
22. Durukan A, Tatlisumak T. Acute ischemic stroke: Overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol Biochem Behav*. 2007 May;87(1):179–97.
23. Chuang BTC, Liu X, Lundberg AJ, Toung TJK, Ulatowski JA, Koehler RC. Refinement of embolic stroke model in rats: Effect of post-embolization anesthesia duration on arterial blood pressure, cerebral edema and mortality. *J Neurosci Methods*. 2018 Sep;307:8–13.

4.2 Artigo Científico 2

Tramadol Preemptivo para o Controle da Dor Aguda Pós-Operatória em *Rattus norvegicus albinus*: Uma Proposta de Protocolo Analgésico

Resumo

O tramadol é um analgésico amplamente difundido e a sua biodisponibilidade em ratos já é comprovada, no entanto, seu uso preemptivo em ratos é pouco descrito. Dessa forma, o objetivo deste estudo é analisar a eficácia do tramadol, administrado de forma

preemptiva por via subcutânea, na analgesia pós-operatória de ratos submetidos a um procedimento de artrotomia medial de joelho e transecção do ligamento cruzado cranial. Para tanto, 48 *Rattus norvegicus albinus* machos, foram submetidos a anestesia geral com isoflurano para a realização de artrotomia medial de joelho com transecção do ligamento cruzado cranial, sendo que, uma hora antes do procedimento, foi administrado tramadol de forma preemptiva pela via subcutânea na dose de 5 (G5) ou 10 (G10) mg/Kg. Posteriormente, os animais foram avaliados quanto a presença de dor (*Rat Grimace Scale* - RGS) e quanto ao seu limiar nociceptivo mecânico (Analgésímetro Von Frey). Em ambas as avaliações não houve diferença entre os momentos de avaliação no G5 e no G10. Durante todo o período do experimento, apenas dois animais distintos demonstraram dor moderada, pela RGS. Na avaliação dos animais por meio do Analgésímetro Von Frey, o membro pélvico operado (esquerdo) de muitos animais não demonstrou resposta ao teste, mantendo o membro irresponsivo (flácido), mesmo empregando a força máxima do aparelho. Os dados coletados através do Analgésímetro Von Frey não resultaram em diferença entre os grupos G5 e G10 e dentro do mesmo grupo ao longo dos tempos em comparação com T0 (valores basais). Nosso estudo mostrou que a abordagem preemptiva adotada foi eficaz para controlar a dor aguda pós-operatória por 72h independente da dose de tramadol utilizada.

Palavras-chave: opioide, analgesia, roedores, nocicepção.

Introdução

A definição de dor vem sendo estudada e discutida desde antes de 1978, entretanto, apenas no ano mencionado recomendou-se, por especialistas, ao conselho da

International Association for the Study of Pain (IASP), que fossem definidos “*Pain Terms*” (1). Após esse apelo, o conselho da IASP aprovou a recomendação e, assim, há mais de quatro décadas existe uma definição mundial de dor (2).

Dentro desse cenário, sabe-se que a experimentação animal sempre deve ser cientificamente justificável (3) e seguir os princípios dos 3Rs (*Refinement, Reduction, Replacement*) (4). Além disso, quando os animais são submetidos a condições que causem dor ou sofrimento, os benefícios devem superar os custos e quando o procedimento for cirúrgico, o manejo da dor deve estar bem definido (3,5).

Entre as possibilidades de combater a estimulação nociceptiva exacerbada em animais de laboratório, existe a analgesia preemptiva. Esse conceito começou a ser introduzido na anestesiologia quando houve a recomendação da anestesia regional para prevenir a nocicepção durante o procedimento cirúrgico (6) e, apesar desse assunto estar sendo estudado desde a primeira década do século XX, a busca por evidências robustas da sua efetividade ocorre até hoje. Sendo assim, as pesquisas com animais lideram as tentativas de demonstrar o efeito preemptivo de métodos de analgesia, onde o rato figura como modelo animal mais utilizado (7).

Independente do método de analgesia escolhido, diferentes abordagens farmacológicas podem ser empregadas para combater a dor aguda pós-cirúrgica, sendo os opioides, agonistas α -2 adrenérgicos, antagonistas do receptor N-Metil D-Aspartato (NMDA) e anestésicos locais são alguns exemplos das classes que constituem essa pluralidade de possibilidades (8).

O tramadol é um analgésico amplamente difundido, ele apresenta um duplo mecanismo, ou seja, age em receptores opioides e não opioides. Ele causa efeito inibitório da recaptação de norepinefrina, serotonina e ativa o receptor μ opioide, sendo essa última ação causada pelo metabólito ativo O-desmetiltramadol (9).

Em ratos, Rouini e colaboradores (2008) publicaram pela primeira vez um estudo sobre a farmacocinética e o metabolismo do tramadol no modelo isolado de fígado perfundido de rato. Na sua pesquisa foram analisados os três principais metabólitos do tramadol, O-desmetiltramadol (M1) e N-desmetiltramadol (M2) e N,O-didesmetiltramadol (M5), assim, concluindo que o metabólito ativo do tramadol (M1) foi formado durante todo o experimento (10).

Para roedores, existem diversas vias de administração de substâncias, entretanto, sabe-se que essa ação é um ponto crítico na experimentação, tendo em vista que, em muitos casos, há a necessidade de contenção, sedação ou até mesmo anestesia geral. A administração de medicamentos por via subcutânea (SC) é caracterizada por ser um método simples, rápido, barato, que suporta grandes volumes e, basicamente, sem efeitos adversos associados, assim, tornando-se uma via interessante para administração preemptiva (11).

O procedimento de artrotomia medial de joelho e transecção do ligamento cruzado cranial para indução cirúrgica da osteoartrite é amplamente difundido na comunidade científica. Entretanto, quando os protocolos anestésicos são analisados, na grande maioria dos casos não há a utilização de analgésicos (12,13). Quando são utilizados, trata-se de anti-inflamatórios não esteroidais com ação analgésica fraca (14). Dessa forma, evidenciando a negligência com o bem-estar animal.

Tendo em vista os aspectos éticos atrelados a dor e bem-estar animal e a importância da eleição de vias seguras para a administração de substâncias em animais de laboratório, o objetivo deste estudo é analisar a eficácia do tramadol, administrado de forma preemptiva por via subcutânea, na analgesia pós-operatória de ratos submetidos a artrotomia medial de joelho e transecção do ligamento cruzado cranial.

Animais

O presente estudo foi realizado de acordo com as diretrizes do *National Institutes of Health* (NIH) para uso de animais experimentais e todo o protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pampa – Campus Uruguaiana (048/2021). Dessa forma, 48 *Rattus norvegicus albinus* machos, pesando aproximadamente $343 \pm 29,57\text{g}$, foram alojados no Biotério da mesma instituição, sendo mantidos em gaiolas coletivas de plástico com piso sólido 17 cm X 41 cm X 34 cm (altura X largura X profundidade) com até três animais por caixa, onde rolos de papel foram utilizados para enriquecimento ambiental, além de livre acesso à ração (Ratos e Camundongos Peletizado, Presence, Brasil) e água (BRK Ambiental), até o término do experimento. O ambiente contou com controle de temperatura ($21 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) e umidade (aproximadamente 60%). O ciclo de iluminação claro-escuro foi de 12 horas, sendo o período de luz das 07:00 às 19:00. Todos os animais foram submetidos a anestesia geral para a realização do procedimento de artrotomia medial de joelho e transecção do ligamento cruzado cranial para indução da osteoartrite (14) e, posteriormente, foram realizadas avaliações de dor e nocicepção.

Materiais e Métodos

Aclimação e ambientação dos animais:

Os ratos passaram por um período de aclimação de 15 dias, sendo manuseados diariamente (uma vez ao dia) para que houvesse adaptação aos tratadores e a contenção física, assim, visando redução do estresse. Além disso, três dias antes da coleta dos dados, foi realizada a ambientação dos animais, por dois dias, para a avaliação de dor, através da *Rat Grimace Scale* (RGS), e para a avaliação da

sensibilidade mecânica, através do Analgesímetro Digital Von Frey (EFF301W, Insight Equipamentos, Brasil).

A ambientação da RGS ocorreu durante o turno da manhã do período de luz do ciclo circadiano, assim, cada caixa contendo os ratos foi transportada, individualmente, até a sala de experimentação, com temperatura controlada. Cada animal foi contido e colocado em uma caixa de vidro com medidas de 9 cm X 10,5 cm X 21 cm (altura X largura X profundidade), com apenas duas faces transparentes (frontal e traseira) para diminuir os estímulos visuais, permanecendo por um período de 10 minutos. Foi considerado que o animal estava ambientado quando ele cessou a sua atividade exploratória e/ou de auto-limpeza (*grooming*).

Já a ambientação para a avaliação da sensibilidade mecânica, ocorreu durante o turno da tarde do período de luz do ciclo circadiano e, da mesma forma que a RGS, os animais foram transportados e contidos, assim, permanecendo no compartimento de avaliação individual de vidro transparente sem fundo e com medidas de 20 cm X 12 cm X 17 cm (altura X largura X profundidade), sobre uma plataforma de fundo gradeado, por um período de 10 minutos. Os mesmos critérios da RGS foram aceitos para considerar o animal ambientado.

Um dia antes do procedimento cirúrgico-anestésico, foram coletadas as imagens basais (IB) e valores basais (VB) de cada animal. Essa conduta foi adotada, pois sabe-se que o limiar de dor é individual.

Protocolo anestésico:

Inicialmente, os animais foram transportados até a sala de experimentação para que fosse realizada a analgesia preemptiva, com o uso de tramadol (Cristália, Itapira, Brasil) na dose de 5 (G5) ou 10 (G10) mg/Kg por via SC (conforme o grupo sorteado)

na região lombar (flanco) direita, uma hora antes da incisão cirúrgica. No segundo momento, os animais foram anestesiados com isofluorano (Cristália, Itapira, Brasil) diluído em oxigênio 100% através de um vaporizador de isofluorano funil-fill (Harvard Apparatus, Massachusetts, EUA).

Foi utilizada uma câmara de indução, onde foi fornecido o volume de 4% de isofluorano pelo período de um a dois minutos, até a perda da deambulação, o que configurava a indução anestésica. Já, a manutenção aconteceu através de uma máscara facial acoplada ao sistema anestésico de *Bain*, onde foi fornecido o volume de 2% de isofluorano para obtenção de um plano anestésico moderado.

A profundidade anestésica foi avaliada de acordo com a resposta aos estímulos nocivos (15). Com o auxílio de uma pinça anatômica (Brasmed, São Paulo, Brasil), foram testados os seguintes reflexos: reflexo de retirada do membro anterior, reflexo de retirada do membro posterior, reflexos palpebrais e reflexo da cauda. Foi considerado plano anestésico moderado quando os animais perdiam três dos quatro reflexos avaliados. A ausência de quatro reflexos culminava na redução do fornecimento do anestésico e quando mais de um reflexo estava presente, realizava-se o aumento.

Além disso, sinais vitais, incluindo a temperatura central (retal), temperatura periférica (orelha externa), frequência cardíaca e frequência respiratória, foram monitorados durante o procedimento anestésico. Ao término do procedimento cirúrgico-anestésico foi encerrado o fornecimento do anestésico geral, sendo considerado que os ratos estavam recuperados da anestesia quando houvesse o restabelecimento da atividade locomotora e da temperatura retal.

Avaliação da dor pós-operatória:

No período pós-operatório, os animais foram avaliados quanto à presença ou ausência de dor por meio da RGS, que é específica para ratos de laboratório e já é válida quanto a sua acurácia (16). A metodologia escolhida foi adaptada do estudo realizado para validar o uso da RGS em tempo real em consonância com recomendações originais da escala (17).

Após o procedimento cirúrgico-anestésico, os ratos foram contidos e colocados, de forma individual, em uma caixa de observação (descrita anteriormente). A analgesia pós-operatória de cada rato foi avaliada a cegas por um observador com experiência prévia em avaliação de dor em ratos.

Foram avaliadas quatro unidades de ação faciais (estreitamento orbital, achatamento de nariz/bochecha, alterações das orelhas e alterações na vibrissa) e para cada uma delas foi atribuída uma nota que variou de zero a dois, sendo zero referente a nenhuma dor, um presença de dor moderada e dois, presença de dor severa. O tempo zero (T0) foi considerado o momento da administração do tramadol no rato. Após a retomada da consciência dos animais, as avaliações foram feitas três, seis, nove, 24, 48 e 72 horas após a administração do tramadol preemptivo (T3, T6, T9, T24, T48 e T72).

O resgate analgésico foi administrado caso em algum momento das avaliações o escore fosse igual ou maior a um, para tanto, no primeiro momento foi administrada uma dose de 10 mg/Kg de tramadol por via subcutânea (SC). Uma hora depois, o animal foi reavaliado e caso a média do escore ainda fosse maior ou igual a um, seria administrado morfina (Cristália, Itapira, Brasil), na dose de 3 mg/Kg, SC.

Avaliação da sensibilidade mecânica pós-operatória:

Posteriormente a avaliação de dor, foi avaliado o limiar nociceptivo mecânico dos membros pélvicos de cada animal através do Analgesímetro Digital Von Frey (AVF). Os ratos foram contidos e colocados em um compartimento de avaliação individual (descrito anteriormente), sobre uma plataforma de fundo gradeado, possibilitando o acesso aos coxins dos membros pélvicos dos animais. Um estímulo mecânico foi direcionado perpendicularmente à superfície plantar de cada um dos coxins, através de uma ponteira de polipropileno (0,5mm²), e mantido por cinco segundos ou até que o animal apresentasse alguma resposta, sendo o membro pélvico não operado (direto) o primeiro a ser avaliado. Foi considerada como resposta positiva ao estímulo quando o animal fizesse a retirada brusca e/ou sacudisse (resposta de *flinch*) o membro imediatamente após a aplicação da ponteira de polipropileno, assim, foram realizadas três tentativas de mensuração e o valor mais baixo foi considerado para análise dos dados (18). Um único pesquisador experiente realizou a avaliação a cegas e os tempos foram os mesmos realizados na RGS.

Estatística:

O *software* IBM SPSS® foi utilizado para realização da análise estatística. Todas as variáveis foram analisadas para normalidade por meio do Teste Shapiro-Wilk, considerando o valor de $p < 0,05$, em um intervalo de confiança de 95%. As variáveis obtidas pela avaliação de dor da RGS apresentaram um padrão de dados dentro da normalidade, sendo então avaliados pela Análise de Variância (ANOVA). Os dados obtidos pela avaliação da sensibilidade mecânica não demonstraram distribuição normal, dessa forma, foram avaliando através do Teste Qui-Quadrado (χ^2) e Kruskal-Wallis. Em ambas as avaliações (RGS e AVF), as análises foram realizadas entre os grupos (G5 e G10) e dentro do mesmo grupo, em cada tempo avaliado. Por fim, os

dados do procedimento anestésico (temperatura central, tempo de indução, manutenção e recuperação anestésica) foram analisados por meio de estatística descritiva (média \pm desvio padrão).

Resultados

De forma geral, durante o período transanestésico, pode-se visualizar que o tempo médio de indução anestésica foi de $1,46 \pm 0,51$ e $1,63 \pm 0,88$ minutos, de manutenção anestésica de $22,46 \pm 4,36$ e $22,04 \pm 5,01$ minutos e de recuperação anestésica de $6,13 \pm 3,66$ e $5,83 \pm 4,41$ minutos para G5 e G10, respectivamente. Já o tempo cirúrgico médio para G5 foi de $21,00 \pm 4,44$ e para o G10 de $20,42 \pm 5,02$ minutos. Além disso, a temperatura central (retal) ao final do procedimento em média foi de $37,05 \pm 0,96$ °C para G5 e $36,91 \pm 0,86$ °C para G10, sendo que ao todo, apenas 10,41% (3/24 no G5 e 2/24 no G10) dos animais cursaram com hipotermia leve.

Os animais foram avaliados em sete tempos ao decorrer do período pós-operatório (T0, T3, T6, T9, T24, T48 e T72) quanto à presença ou ausência de dor (RGS) e sua sensibilidade mecânica (AVF). A Análise de Variância (ANOVA), utilizada para os dados da RGS, estão descritos na Tabela 1. Não houve diferença entre os momentos de avaliação no grupo 5 e no grupo 10 na RGS. No entanto, as 72h de pós-operatório houve diferença ($p < 0,003$) entre o G5 (0,29) e G10 (0,13), embora nenhum animal tenha atingido escores compatíveis com dor moderada nesse momento.

Durante todo o período do experimento, apenas dois (2/48) animais distintos demonstraram dor moderada, um no T3 (animal do G10) e um no T9 (animal do G5). Frente a isso, houve a necessidade de resgate analgésico (10 mg/Kg de tramadol SC) e, após 1h, os animais foram novamente avaliados e não demonstraram sinais de dor

nos métodos de avaliação utilizados, assim, nenhuma outra intervenção foi necessária.

Tabela 1. Médias e desvio padrão (DP) da *Rat Grimace Scale* para cada momento de avaliação dos grupos de ratos tratados com tramadol preemptivo 5 (G5) e 10 (G10) mg/Kg. Uruguiana, 2024.

	T0	T3	T6	T9	T24	T48	T72
G5	0,00	0,30	0,24	0,33	0,32	0,29	0,29
	±	±	±	±	±	±	±
	0,00	0,23	0,23	0,28	0,32	0,22	0,20
G10	0,00	0,33	0,33	0,26	0,23	0,25	0,13
	±	±	±	±	±	±	±
	0,00	0,24	0,28	0,24	0,23	0,22	0,16
Sig (p)	0,000	0,650	0,211	0,339	0,248	0,513	0,003*

* Diferença significativa entre os grupos (G5 e G10).

Os dados obtidos por meio da avaliação da sensibilidade mecânica não apresentaram distribuição normal. Durante a avaliação dos animais por meio do Analgesímetro Von Frey, o membro pélvico operado (esquerdo) de muitos animais não demonstrou resposta ao teste, mantendo o membro irresponsivo (flácido), mesmo empregando a força máxima do aparelho. Na Tabela 2, pode-se observar o número de animais que não responderam ao teste que avaliou a sensibilidade mecânica, onde pode-se notar um aumento crescente até T9 e uma diminuição progressiva a partir desse mesmo tempo até T72.

Tabela 2. Número e porcentagem (%) de animais irresponsivos a avaliação da sensibilidade mecânica através do Analgesímetro Von Frey. Uruguaiiana, 2024

	T0	T3	T6	T9	T24	T48	T72
G5	00,00%	50,00%	91,66%	91,66%	54,16%	50,00%	41,66%
	0/48	12/24	22/24	22/24	13/24	12/24	10/24
G10	00,00%	50,00%	91,66%	87,50%	70,83%	50,00%	20,83%
	0/48	12/24	22/24	21/24	17/24	12/24	5/24
G5 +	00,00%	50,00%	89,66%	89,58	62,50%	50,00%	31,25%
G10	0/48	24/48	44/48	43/48	30/48	24/48	15/24

Os valores da avaliação da sensibilidade mecânica do membro pélvico esquerdo (operado) estão descritos na Imagem 3, onde foram excluídos os animais irresponsivos e os dois tempos (T6 e T9) que apresentaram um maior número de animais com membro flácido. Os dados coletados não resultaram em diferença ($p > 0,05$) entre os grupos G5 e G10 e dentro do mesmo grupo ao longo dos tempos em comparação com T0.

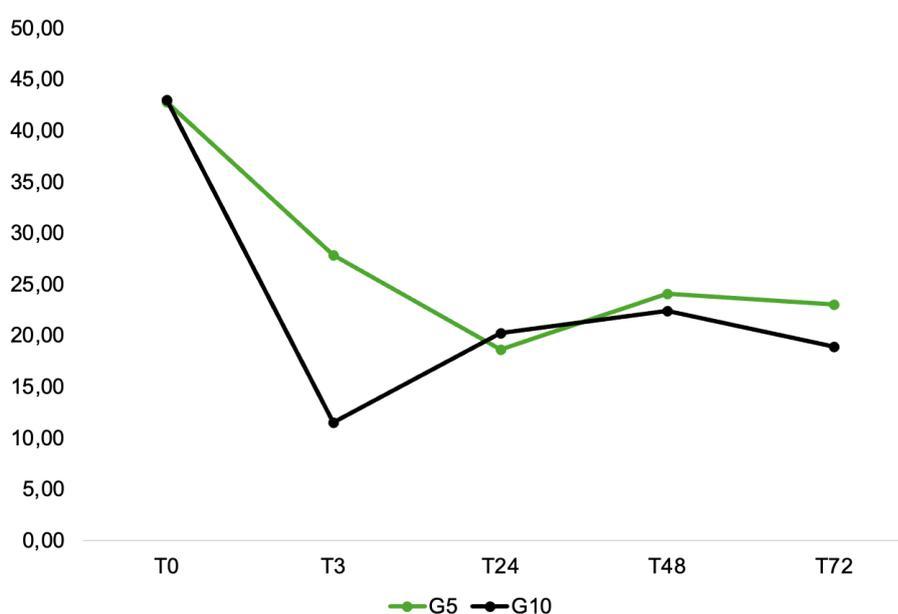


Figura 3. Médias (gramas) das avaliações da sensibilidade mecânica de cada grupo de ratos tratados com tramadol preemptivo 5 e 10 mg/Kg (G5 e G10) nos cinco momentos de avaliação, desconsiderando os animais irresponsivos a avaliação com o Analgesímetro Von Frey. Uruguaiiana, 2024.

Discussão

Tendo em vista que o método para avaliação da dor escolhido no presente estudo foi a RGS, um dos parâmetros monitorados durante todo o procedimento cirúrgico-anestésico foi a temperatura central (retal), visto que há trabalhos que apontam a hipotermia, induzida pelo isofluorano, como um potencial confundidor dessa escala de expressões faciais (19). Assim, os cuidados com temperatura ambiente e métodos de aquecimento ativo estabelecidos, possibilitaram a manutenção da temperatura central da maioria dos animais, dentro da normalidade e os animais que cursaram com hipotermia leve (10,41%), através de um manejo preciso, alcançaram a normotermia rapidamente.

No presente estudo, a escolha do tramadol como analgésico preemptivo ocorreu pois, diferentemente de outros opioides, não há efeitos clinicamente relevantes nos parâmetros respiratórios ou cardiovasculares em doses recomendadas (16). Além disso, de Pozos-Guillén e colaboradores (2004) comprovaram em seu estudo a eficácia analgésica do tramadol em ratos através do teste de formalina. Com essa avaliação de antinocicepção, foi observada uma supressão dose-dependente do número de *flinches*, além disso, *insights* sobre rotas de ação do tramadol sugeriram uma possível atuação local (21).

Em nosso estudo, inicialmente, foi cogitada a possibilidade do tramadol ter apresentado ação local, bloqueando, assim, a condução nervosa igual a um anestésico local (22), o que justificaria a flacidez observada em alguns animais durante as avaliações. Todavia, o tramadol foi administrado no lado direito e o membro operado foi o esquerdo, ou seja, essa hipótese foi desconsiderada e outras investigações devem ser realizadas visando elucidar a ação local do tramadol frente

ao estímulo nociceptivo promovido pela artrotomia medial de joelho com transecção do ligamento cruzado cranial.

Existe uma ampla variação de doses de tramadol para ratos, Cannon e colaboradores (2010), realizaram um ensaio utilizando 4, 12,5, 25 e 50 mg/Kg por diferentes vias de administração (oral, subcutânea e intraperitoneal). Através do teste da placa quente (*hot plate*), pode-se concluir que a via SC foi eficaz apenas nas dosagens mais altas (25 e 50 mg/Kg), entretanto, elas causaram sedação e lesões cutâneas (23).

Detectamos que o tramadol administrado por via SC, de forma preemptiva e até mesmo na dose de 5 mg/kg (dose mais baixa testada) promoveu analgesia no pós-operatório imediato. Nenhum efeito colateral atrelado ao fármaco foi visualizado em nossa pesquisa, assim, sugerindo que ambas as doses empregadas foram seguras, entretanto, visando sempre seguir o conceito de anestesia balanceada, recomenda-se a utilização da menor dose. Além disso, a recuperação anestésica de ambos os grupos foi rápida, inferior a 7 minutos e desprovida de excitação.

Mesmo a via IP sendo amplamente utilizada em roedores e, assim, podendo ser uma opção para a administração da analgesia preemptiva, ela está associada a uma série de possíveis complicações e questionamentos quanto à sua precisão (11). Já foram descritas administrações inadvertidas por via IP, até mesmo quando realizadas por pesquisadores treinados, em que 19,6% delas resultaram na deposição da substância no SC, na vesícula urinária e no trato gastrointestinal (24). Além disso, outras complicações são relatadas, como peritonite química, formação de tecido fibroso e aderências na cavidade, hemorragia e dificuldade respiratória devido a administração de volumes exagerados (25).

No presente estudo não foram identificadas reações locais atreladas a via de administração SC. Apesar dessa via ter uma taxa de absorção mais lenta em

comparação com outras vias parenterais, esse fato pode ser positivo quando atrelado a um possível efeito mais sustentado. Acredita-se que o mecanismo de absorção da via SC esteja relacionado a captação de macromoléculas através de pequenos capilares e com absorção linfática mínima (26), no entanto, torna-se necessário um estudo farmacocinético do tramadol por via subcutânea em ratos para uma adequada posologia.

Tendo como premissa que todo procedimento cirúrgico gera estímulo nociceptivo, e este pode ser exacerbado (5), adotou-se a RGS como método de avaliação de dor pós-operatória. Existe uma gama de evidências atreladas ao uso de escalas e alterações comportamentais para a avaliação de dor aguda após procedimentos invasivos, entretanto, quando comparada a outros parâmetros comportamentais, como escavação e construção de ninhos, a RGS é a mais efetiva para detecção da dor pós-operatória (27).

As avaliações obtidas através da RGS demonstraram a efetividade do tramadol SC nas doses propostas, para o controle da dor pós-operatória em ratos. No entanto, mesmo não havendo diferença na avaliação da sensibilidade mecânica, no pós-operatório todos os animais necessitaram de uma força menor, quase 50% a menos que os valores basais, para apresentarem uma resposta positiva frente ao AVF. Essa informação demonstra que o limiar de sensibilidade diminuiu, logo os animais apresentaram sinais de nocicepção. Entretanto, como não houve a presença de sinais compatíveis com dor frente a RGS, acredita-se que a nocicepção detectada não foi exacerbada.

Além disso, um estudo que avaliou 106 projetos de pesquisa, sendo que, 64,2% realizaram alguma técnica cirúrgica. Destes, 65,6% não utilizaram analgesia no pós-operatório, sendo a principal justificativa a de que o analgésico poderia interferir nos

resultados. Além disso, em 17%, empregou-se a classificação de grau de invasividade de forma irregular (28). Dessa forma, o presente estudo, enfatiza-se o apelo para a comunidade científica implementar o tramadol nos protocolos anestésicos experimentais, assim, tornando-os mais eficientes e, além disso, colaborando para que os critérios básicos da anestesia geral sejam seguidos.

A partir das avaliações com a RGS e AVF, conclui-se que a abordagem preemptiva adotada é eficaz para controlar a dor aguda pós-operatória por 72h independente da dose de tramadol utilizada, ou seja, é possível frear o estímulo algico, até mesmo com uma dose de 5 mg/Kg de tramadol por via SC em procedimentos de artrotomia medial de joelho e transecção do ligamento cruzado cranial. Acredita-se que a analgesia preemptiva seja uma importante ferramenta dentro do conceito de analgesia multimodal e, a partir dos resultados desse estudo, deve-se investigar outras doses de tramadol e, possivelmente, elucidar a farmacocinética do tramadol administrado por via subcutânea, assim, sendo possível consagrar um protocolo analgésico.

Reconhecimentos

Gostaríamos de agradecer o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), o Programa de Apoio aos Programas de Pós-Graduação (AGP) da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA) e o Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCA) da UNIPAMPA.

Declaração de Conflito de Interesses

O(s) autor(es) declararam não haver possíveis conflitos de interesse com relação à pesquisa, autoria e/ou publicação deste artigo.

Financiamento

O(s) autor(es) declaram o recebimento do seguinte apoio financeiro para a pesquisa, autoria e/ou publicação deste artigo: duas bolsas do Programa de Demanda Social (DS) da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de Financiamento 001 e fomento para execução do projeto de pesquisa do Programa de Apoio aos Programas de Pós-Graduação (AGP) da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA).

Referências

1. Pain terms: a list with definitions and notes on usage. Recommended by the IASP Subcommittee on Taxonomy. *Pain*. 1979 Jun;6(3):249.
2. The need of a taxonomy. *Pain*. 1979;6(3):247–52.
3. Institute for Laboratory Animal Research (U.S.). Committee on Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals. Recognition and alleviation of pain in laboratory animals. National Academies Press; 2009. 177 p.
4. Russell WMS, Burch RL. The principles of humane experimental technique. Londres: Methuen; 1959.
5. Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. Animais de laboratório:Criação e experimentação. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2002. 388 p.

6. Crile G. The Kinetic Theory of Shock and Its Prevention Through Anoci-Association (Shockless Operation). *Lancet*. 1919;185:7–16.
7. Garcia JBS, Issy AM, Sakata RK. Analgesia Preemptiva. *Revista Brasileira Anesthesiologia*. 2001;51(5):463–448.
8. Dahl V, Raeder JC. Non-opioid postoperative analgesia. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2000;44(10):1191–203.
9. Grimm KA, Lamont LA, Tranquilli WJ, Greene SA, Robertson SA. *Anestesia e analgesia veterinária de Lumb e Jones*. 5th ed. 2015.
10. Rouini MR, Ghazi-Khansari M, Ardakani YH, Dasian Z, Lavasani H. A disposition kinetic study of tramadol in rat perfused liver. *Biopharm Drug Dispos*. 2008 May;29(4):231–5.
11. Turner P V, Brabb T, Pekow C, Vasbinder MA. Administration of Substances to Laboratory Animals- Routes of Administration and Factors to Consider. *The Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 2011;50(5):600–13.
12. Wang G, Chen S, Xie Z, Shen S, Xu W, Chen W, et al. TGF β attenuates cartilage extracellular matrix degradation via enhancing FBXO6-mediated MMP14 ubiquitination. *Ann Rheum Dis*. 2020 Aug;79(8):1111–20.

13. Chen NF, Lin YY, Yao ZK, Tseng CC, Liu YW, Hung YP, et al. Oral Administration of Protease-Soluble Chicken Type II Collagen Ameliorates Anterior Cruciate Ligament Transection–Induced Osteoarthritis in Rats. *Nutrients*. 2023 Aug 16;15(16):3589.
14. Barbosa GM, Cunha JE, Russo TL, Cunha TM, Castro PATS, Oliveira FFB, et al. Thirty days after anterior cruciate ligament transection is sufficient to induce signs of knee osteoarthritis in rats: pain, functional impairment, and synovial inflammation. *Inflammation Research*. 2020 Mar 31;69(3):279–88.
15. Tsukamoto A, Niino N, Ohtani R, Inomata T. The validity of anesthetic protocols for the surgical procedure of castration in rats.
16. Sotocinal SG, Sorge RE, Zaloum A, Tuttle AH, Martin LJ, Wieskopf JS, et al. The Rat Grimace Scale: A partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Mol Pain*. 2011 Jul 29;7(55).
17. Leung V, Zhang E, Pang DS. Real-time application of the Rat Grimace Scale as a welfare refinement in laboratory rats. *Sci Rep*. 2016 Aug 17;6(1):31667.
18. Lim D, Kim J, Han D, Kim Y. Analgesic Effect of *Harpagophytum procumbens* on Postoperative and Neuropathic Pain in Rats. *Molecules*. 2014 Jan 16;19(1):1060–8.
19. Klune CB, Robbins HNK, Leung VSY, Pang DSJ. Hypothermia during general anesthesia interferes with pain assessment in laboratory rats (*Rattus norvegicus*).

Journal of the American Association for Laboratory Animal Science. 2020 Nov 1;59(6):719–25.

20. Scott LJ, Perry CM. Tramadol A Review of its Use in Perioperative Pain. *Drugs*. 2000;60(1):139–76.
21. de Pozos-Guillén AJ, Aguirre-Bañuelos P, Arellano-Guerrero A, Hoyo-Vadillo C, Pérez-Urizar J. Evidence of self-synergism in the antinociceptive effect of tramadol in rats. *Western Pharmacology Society* [Internet]. 2004;47:117–9. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/8096864>.
21. Mert T, Gunes Y, Guven M, Gunay I, Ozcengiz D. Comparison of nerve conduction blocks by an opioid and a local anesthetic. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2002;439(1–3):77–81. Available from: www.elsevier.com/locate/ejphar.
22. Cannon CZ, Kissling GE, Hoenerhoff MJ, King-Herbert AP, Blankenship-Paris T. Evaluation of dosages and routes of administration of tramadol analgesia in rats using hot-plate and tail-flick tests. *Lab Anim (NY)*. 2010 Nov;39(11):342–51.
23. Lewis RE, Kunz AL, Bell RE. Error of intraperitoneal injections in rats. *Lab Anim Care*. 1966 Dec;16(6):505–9.
24. Morton DB, Jennings M, Buckwell A, Ewbank R, Godfrey C, Holgate B, et al. Refining procedures for the administration of substances. Report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. British

Veterinary Association Animal Welfare Foundation/Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments/Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals/Universities Federation for Animal Welfare. *Lab Anim.* 2001 Jan;35(1):1–41.

25. Kagan L, Gershkovich P, Mendelman A, Amsili S, Ezov N, Hoffman A. The role of the lymphatic system in subcutaneous absorption of macromolecules in the rat model. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 2007 Nov;67(3):759–65.
26. Aulehner K, Leenaars C, Buchecker V, Stirling H, Schönhoff K, King H, et al. Grimace scale, burrowing, and nest building for the assessment of post-surgical pain in mice and rats—A systematic review. *Front Vet Sci.* 2022 Oct 6;9.
27. Brito CVB, Soares RH de FC, Botelho NM. Analgesia de animais de laboratório: responsabilidade dos comitês de ética e obrigação dos pesquisadores. *Revista Bioética.* 2016 Dec;24(3):528–31.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O bem-estar dos animais de laboratório é uma preocupação crescente e de responsabilidade do Médico Veterinário. Dessa forma, deve-se construir metodologias que colaborem com o princípio dos 3Rs, assim, elevando a pesquisa científica para o nível mais alto. Com o presente estudo, pode-se mostrar que o tramadol administrado de forma preemptiva por via subcutânea em doses baixas (10 ou 5 mg/Kg) é no controle da dor aguda pós-operatória de ratos submetidos ao procedimento cirúrgico de transecção do ligamento cruzado cranial. Além disso, pode-se evidenciar o valor de ΔT_{cp} , 2,25 °C no início da anestesia e 0,61 °C no final, para ratos anestesiados com isoflurano, o que resultou em novas percepções sobre os impactos vinculados a alteração desse gradiente, visto que a redução do ΔT_{cp} possibilitou uma recuperação anestésica breve dos animais.

6. REFERÊNCIAS

ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. **Animais de laboratório: Criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2002.

BAILEY, J. et al. Relationship between clinical evaluation of peripheral perfusion and global hemodynamics in adults after cardiac surgery. **Crit Care Med**, v. 18, n. 12, p. 1353–1356, 1990.

BAKKER, J. et al. Serial blood lactate levels can predict the development of multiple organ failure following septic shock. **The American Journal of Surgery**, v. 171, n. 2, p. 221–226, 1996.

BARROT, M. Tests and models of nociception and pain in rodents. **Neuroscience**, v. 211, p. 39–50, jun. 2012.

BATISTA SANTOS GARCIA, J.; MACHADO ISSY, A.; KIMIKO SAKATA, R. Analgesia Preemptiva. **Revista Brasileira Anestesiologia**, v. 51, n. 5, p. 463–448, 2001.

BENSON, E.; MCMILAN, D.; ONG, B. The effects of active warming on patient temperature and pain after total knee arthroplasty. **The American Journal of Nursing**, v. 112, n. 5, p. 26–33, 2012.

BLACKBURN-MUNRO, G. Pain-like behaviours in animals - How human are they? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 25, n. 6, p. 299–305, 2004.

BLIGH, J.; JOHNSON, K. G. Glossary of terms for thermal physiology. **Journal of applied physiology**, v. 35, n. 6, p. 941–961, 1973.

BLOW, O. et al. The golden hour and the silver day: detection and correction of occult hypoperfusion within 24 hours improves outcome from major trauma. **J Trauma**, v. 47, n. 5, p. 964–969, 1999.

BOLDT, J. Clinical review: hemodynamic monitoring in the intensive care unit. **Crit Care**, v. 6, n. 1, p. 52–59, 2002.

BRIESE, E.; QUIJADA, M. G. DE. Colonic temperature of rats during handling. **Acta physiologica latino americana**, v. 20, n. 2, p. 97–102, 1970.

BUDD, K.; LANGFORD, R. Tramadol revisited. **British Journal of Anaesthesia**, v. 82, n. 4, p. 493–495, 1999.

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. 342–51, nov. 2010.

CARO, A.; HANKENSON, F.; MARX, J. Comparison of thermoregulatory devices used during anesthesia of C57BL/6 mice and correlations between body temperature and physiologic parameters. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 52, n. 5, p. 577–583, 2013.

CARR, D. B. Preemptive Analgesia Implies Prevention. **Anesthesiology**, v. 85, p. 1498–1499, 1996.

CHAPLAN, S. R. et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 53, n. 1, p. 55–63, jul. 1994.

CRILE, G. The Kinetic Theory of Shock and Its Prevention Through Anoci-Association (Shockless Operation). **Lancet**, v. 185, p. 7–16, 1919.

DAHL, V.; RAEDER, J. C. Non-opioid postoperative analgesia. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, v. 44, n. 10, p. 1191–1203, 2000.

DE POZOS-GUILLÉN, A. J. et al. Evidence of self-synergism in the antinociceptive effect of tramadol in rats. **Western Pharmacology Society**, v. 47, p. 117–119, 2004.

DEGUCHI, B. G. F.; TAMIOSO, P. R.; MOLENTO, C. F. M. Percepção de equipes laboratoriais quanto a questões de bem-estar animal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 1, p. 48–56, 2016.

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

DEVEY, L.; FESTING, M. F. W.; WIGMORE, S. J. Effect of temperature control upon a mouse model of partial hepatic ischaemia/reperfusion injury. **Laboratory Animals**, v. 42, n. 1, p. 12–18, jan. 2008.

DIXON, W. J. Efficient Analysis of Experimental Observations. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 20, n. 1, p. 441–462, abr. 1980.

FRANK, S. M. et al. Perioperative maintenance of normothermia reduces the incidence of morbid cardiac events. A randomized clinical trial. **Journal of the American Medical Association**, v. 277, n. 14, p. 1127–1134, 1997.

FUJITA, I. et al. Involvement of inflammation in severe post-operative pain demonstrated by pre-surgical and post-surgical treatment with piroxicam and ketorolac. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 64, n. 5, p. 747–755, maio 2012.

GONZALEZ, M. I. et al. Ovariohysterectomy in the rat: a model of surgical pain for evaluation of pre-emptive analgesia? **Pain**, v. 88, n. 1, p. 79–88, 2000.

GORDON, C. J. Thermal biology of the laboratory rat. **Physiology & Behavior**, v. 47, n. 5, p. 963–991, 1990.

GRIMM, K. A. et al. **Anestesia e analgesia veterinária de Lumb e Jones**. 5. ed. [s.l: s.n.].

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

HANKENSON, F. C. et al. Effects of Rodent Thermoregulation on Animal Models in the Research Environment. **Comparative Medicine**, v. 68, n. 6, p. 425–438, 1 dez. 2018.

HO KIM, S.; MO CHUNG, J. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. **Pain**, v. 50, n. 3, p. 355–363, set. 1992.

HOUSE, J. R.; TIPTON, M. J. Using skin temperature gradients or skin heat flux measurements to determine thresholds of vasoconstriction and vasodilatation. **European Journal of Applied Physiology**, v. 88, n. 1–2, p. 141–145, 2002.

INSTITUTE FOR LABORATORY ANIMAL RESEARCH (U.S.). COMMITTEE ON RECOGNITION AND ALLEVIATION OF PAIN IN LABORATORY ANIMALS. **Recognition and alleviation of pain in laboratory animals**. [s.l.] National Academies Press, 2009.

KAGAN, L. et al. The role of the lymphatic system in subcutaneous absorption of macromolecules in the rat model. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 67, n. 3, p. 759–765, nov. 2007.

KAPLAN, L. J. et al. Start with a subjective assessment of skin temperature to identify hypoperfusion in intensive care unit patients. **J Trauma**, v. 50, n. 4, p. 620–627, 2001.

KEHLET, H.; DAHL, J. B. The Value of “Multimodal” or “Balanced Analgesia” in Postoperative Pain Treatment. **Anesthesia & Analgesia**, v. 77, n. 5, p. 1048–1056, 1993.

KISSIN, I. Preemptive Analgesia- Why Its Effect Is Not Always Obvious. **Anesthesiology**, v. 84, n. 5, p. 1015–1019, 1996.

KLUNE, C. B. et al. Hypothermia during general anesthesia interferes with pain assessment in laboratory rats (*Rattus norvegicus*). **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 59, n. 6, p. 719–725, 1 nov. 2020.

KURZ, A. **Physiology of Thermoregulation. Best Practice and Research: Clinical Anaesthesiology**, dez. 2008.

KURZ, A.; SESSLER, D. I.; LENHARDT, R. Perioperative normothermia to reduce the incidence of surgical-wound infection and shorten hospitalization. Study of Wound Infection and Temperature Group. **The New England Journal of Medicine**, v. 334, n. 19, p. 1209–1215, 1996.

LEUNG, V.; ZHANG, E.; PANG, D. S. Real-time application of the Rat Grimace Scale as a welfare refinement in laboratory rats. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 31667, 17 ago. 2016.

LEWIS, R. E.; KUNZ, A. L.; BELL, R. E. Error of intraperitoneal injections in rats. **Laboratory animal care**, v. 16, n. 6, p. 505–9, dez. 1966.

LIMA, A.; BAKKER, J. **Clinical assessment of peripheral circulation. Current Opinion in Critical Care** Lippincott Williams and Wilkins, , 6 jun. 2015.

LIU, S. et al. Dopamine receptor D2, but not D1, mediates descending dopaminergic pathway–produced analgesic effect in a trigeminal neuropathic pain mouse model. **Pain**, v. 160, n. 2, p. 334–344, 11 fev. 2019.

LOMAX, P. Measurement of ‘Core’ Temperature in the Rat. **Nature**, v. 210, n. 5038, p. 854–855, 1966.

LOTZ, G. W.; MICHAELSON, S. M. Temperature and corticosterone relationships in microwave-exposed rats. **Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology**, v. 44, n. 3, p. 438–445, 1978.

MARSCHNER, J. A. et al. Optimizing mouse surgery with online rectal temperature monitoring and preoperative heat supply. Effects on post-ischemic acute kidney injury. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, 1 fev. 2016.

MARTIN, T. J.; KIM, S. A.; EISENACH, J. C. Clonidine maintains intrathecal self-administration in rats following spinal nerve ligation. **Pain**, v. 125, n. 3, p. 257–263, 5 dez. 2006.

MATSUKAWA, T. et al. Heat Flow and Distribution during Induction of General Anesthesia. **Anesthesiology**, v. 82, n. 3, p. 662–673, 1 mar. 1995.

MCQUAY, H. J. Pre-emptive analgesia. **British Journal of Anaesthesia**, v. 69, n. 1, p. 1–3, 1992.

MERT, T. et al. Comparison of nerve conduction blocks by an opioid and a local anesthetic. **European Journal of Pharmacology**, v. 439, n. 1–3, p. 77–81, 2002.

MORTON, D. B. et al. Refining procedures for the administration of substances. Report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. British Veterinary Association Animal Welfare Foundation/Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments/Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals/Universities Federation for Animal Welfare. **Laboratory animals**, v. 35, n. 1, p. 1–41, jan. 2001.

NGUYEN, H. B. et al. Early lactate clearance is associated with improved outcome in severe sepsis and septic shock. **Critical Care Medicine**, v. 32, n. 8, p. 1637–1642, ago. 2004.

Pain terms: a list with definitions and notes on usage. Recommended by the IASP Subcommittee on Taxonomy. **Pain**, v. 6, n. 3, p. 249, jun. 1979.

POOLE, S.; STEPHENSON, J. D. Core temperature: some shortcomings of rectal temperature measurements. **Physiology & Behavior**, v. 18, n. 2, p. 203–205, 1977.

POTTIE, R. G. et al. Effect of hypothermia on recovery from general anaesthesia in the dog. **Australian Veterinary Journal**, v. 85, n. 4, p. 158–162, abr. 2007.

RADY, M. Y.; RIVERS, E. P.; NOWAK, -RICHARD M. Resuscitation of the critically ill in the ED: responses of blood pressure, heart rate, shock index, central venous oxygen saturation, and lactate. **Am J Emerg Med**, v. 14, n. 2, p. 218–225, 1996.

RAJA, S. N. et al. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. **Pain**, v. 161, n. 9, p. 1976-1982, 2020.

RÉA-NETO, Á. et al. Consenso brasileiro de monitorização e suporte hemodinâmico - Parte IV: monitorização da perfusão tecidual. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 18, n. 2, p. 154–160, 2006.

REED, R. 2ND et al. The disparity between hypothermic coagulopathy and clotting studies. **The Journal of trauma**, v. 33, n. 3, p. 465–470, 1992.

RIVERS, E. P.; ANDER, D. S.; POWELL, D. Central venous oxygen saturation monitoring in the critically ill patient. **Current Opinion in Critical Care**, v. 7, n. 3, p. 204–211, 2001.

ROUINI, M. R. et al. A disposition kinetic study of tramadol in rat perfused liver. **Biopharmaceutics and Drug Disposition**, v. 29, n. 4, p. 231–235, maio 2008.

SATINOFF, A. **Neural Organization and Evolution of Thermal Regulation in Mammals**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.sciencemag.org>.

SCHAEFER, J. D. et al. Evaluation of the rectal-interdigital temperature gradient as a diagnostic marker of shock in dogs. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 30, n. 6, p. 670–676, 1 nov. 2020.

SCHEY, B. M.; WILLIAMS, D. Y.; BUCKNALL, T. Skin temperature and core-peripheral temperature gradient as markers of hemodynamic status in critically ill

patients: a review. **Heart and Lung: Journal of Acute and Critical Care**, v. 39, n. 1, p. 27–40, 2010.

SCHUSTER, C. J.; PANG, D. S. Assessment of an Electronic Mechanical Sensory Threshold Testing Device (RatMet) in Wistar rats (*Rattus norvegicus*). **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 60, n. 1, p. 77–84, 1 jan. 2021.

SCOTT, L. J.; PERRY, C. M. Tramadol A Review of its Use in Perioperative Pain. **Drugs**, v. 60, n. 1, p. 139–176, 2000.

SESSLER, D. I.; HOUSE, J. R.; TIPTON, M. J. Skin-temperature gradients are a validated measure of fingertip perfusion. **European Journal of Applied Physiology**, v. 89, n. 3–4, p. 401–402, 2003.

SHIREY, M. J. et al. Brief anesthesia, but not voluntary locomotion, significantly alters cortical temperature. **J Neurophysiol**, v. 114, p. 309–322, 2015.

SKORUPSKI, A. M. et al. Quantification of Induced Hypothermia from Aseptic Scrub Applications during Rodent Surgery Preparation. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 56, n. 5, p. 562–569, 2017.

SMITH, M. L.; ASADA, N.; MALENKA, R. C. Anterior cingulate inputs to nucleus accumbens control the social transfer of pain and analgesia. **Science**, v. 371, n. 6525, p. 153–159, 8 jan. 2021.

SOTOCINAL, 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, 1 jan. 2011a.

SOTOCINAL, 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, n. 55, 29 jul. 2011b.

SREBRO, D. et al. Evaluation of Prophylactic and Therapeutic Effects of Tramadol and Tramadol Plus Magnesium Sulfate in an Acute Inflammatory Model of Pain and Edema in Rats. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 1326, 2018.

SWEDBERG, M. D. et al. Pharmacological mechanisms of action of flupirtine: a novel, centrally acting, nonopioid analgesic evaluated by its discriminative effects in the rat. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 246, n. 3, p. 1067–74, set. 1988.

TAYLOR, D. K. Study of Two Devices Used To Maintain Normothermia in Rats and Mice During General Anesthesia. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 46, n. 5, p. 37–41, 2007.

The need of a taxonomy. **Pain**, v. 6, n. 3, p. 247–252, 1979.

TURNER, P. V et al. Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS**, v. 50, n. 5, p. 600–13, set. 2011.

VAN GENDEREN, M. E.; VAN BOMMEL, J.; LIMA, A. **Monitoring peripheral perfusion in critically ill patients at the bedside. Current Opinion in Critical Care**, jun. 2012.

VINCENT, J.; INCE, C.; BAKKER, J. Clinical review: Circulatory shock--an update: a tribute to Professor Max Harry Weil. **Crit Care**, v. 16, n. 6, p. 239, 2012.

VINCENT, J.; MORAINÉ, J.; VAN DER LINDEN, P. Toe temperature versus transcutaneous oxygen tension monitoring during acute circulatory failure. **Intensive Care Med**, v. 14, n. 1, p. 64–68, 1988.

VIVANCOS, G. G. et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 3, p. 391–399, mar. 2004.

WEIL, M. H. Defining Hemodynamic Instability. **Functional hemodynamic monitoring**, p. 10–14, 2005.

WEISSMAN, A. The discriminability of aspirin in arthritic and nonarthritic rats. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v. 5, n. 5, p. 583–586, 1976.

XIONG, J. et al. Isoflurane Produces Marked and Nonlinear Decreases in the Vasoconstriction and Shivering Thresholds. **Anesthesiology**, v. 85, n. 2, p. 240–245, 1 ago. 1996.