

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RENATA GONÇALVES VILLELA BASTOS

**Aperfeiçoamento dos protocolos de avaliação da dor para o modelo de contusão
pulmonar e lesão podal em ratos**

RIO DE JANEIRO
2018

Renata Gonçalves Villela Bastos

APERFEIÇOAMENTO DOS PROTOCOLOS DE AVALIAÇÃO DA DOR PARA O
MODELO DE CONTUSÃO PULMONAR E LESÃO PODAL EM RATOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de pós-graduação Profissional de Formação em Pesquisa Biomédica do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre Profissional de Formação em Pesquisa Biomédica.

Orientador: Mariana Boechat de Abreu

Rio de Janeiro

2018

Ficha Catalográfica

Bastos, Renata Gonçalves Villela

Aperfeiçoamento dos protocolos de avaliação da dor para o modelo de contusão pulmonar e lesão podal em ratos. / Renata Gonçalves Villela Bastos. – Rio de Janeiro: UFRJ / Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Mestrado Profissional de Formação para a Pesquisa Biomédica, 2018.

72 f.: il.; 31 cm.

Orientadora: Mariana Boechat de Abreu.

Dissertação (mestrado profissional) – Universidade Federal do Rio de Janeiro / Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Mestrado Profissional de Formação para a Pesquisa Biomédica, 2018.

Referências: f. 48-61.

1. Dor. 2. Medição da Dor- métodos. 3. Ratos Wistar. 4. Expressão Facial. 5. Protocolos-análise. 6. Pesquisa Biomédica. - Dissertação. I. Abreu, Mariana Boechat de. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Mestrado Profissional de Formação para a Pesquisa Biomédica. III. Título.

Renata Gonçalves Villela Bastos

APERFEIÇOAMENTO DOS PROTOCOLOS DE AVALIAÇÃO DA DOR PARA O
MODELO DE CONTUSÃO PULMONAR E LESÃO PODAL EM RATOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de pós-graduação Profissional de Formação em Pesquisa Biomédica do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre Profissional de Formação em Pesquisa Biomédica.

Aprovada em

(Mariana Boechat de Abreu, Doutora, Universidade Federal do Rio de Janeiro)

(Ana Luisa Palhares de Miranda, Doutora, Universidade Federal do Rio de Janeiro)

(Marcel Frajblat, Doutor, Universidade Federal do Rio de Janeiro)

(Isalira Peroba Rezende Ramos, Doutor, Universidade Federal do Rio de Janeiro)

DEDICATÓRIA

À minha querida e amada avó Neuza que sempre me incentivou até os últimos dias de sua vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus por ter me dado saúde e força para chegar até aqui, à minha família que me deu todo apoio, em especial à minha mãe Teresa que lutou junto comigo e não permitiu que eu desistisse do meu objetivo, à minha tia Alice que sempre esteve disposta a ajudar em qualquer situação, ao meu marido Vitor que ficou ao meu lado sempre, ajudando, apoiando e sendo o meu companheiro. Aos meus amigos que me incentivaram e estiveram ao meu lado nos momentos bons e ruins, em especial à minha grande amiga Sarah que me deu todo suporte emocional, além de me ajudar em momentos difíceis. À minha orientadora Mariana que exerceu muito além da sua função de orientar, foi uma mãe e amiga que me abraçou e me trouxe até aqui, sempre com muito carinho e preocupação, visando sempre chegar no objetivo final sem que eu me perdesse no caminho. Aos meus amigos que fiz no Laboratório de Fisiologia da Respiração, em especial, à Alexia, Diego, Flávia, Neto e Lucinana Camilo que me ajudaram, apoiaram e estavam sempre presentes no momento certo com uma palavra de incentivo. Aos meus colegas e amigos do ICTB (Fiocruz), especialmente à diretora Carla que permitiu que eu fosse atrás do meu sonho, à minha chefe Klena por toda compreensão e apoio e às minhas queridas amigas, Alessandra e Dona Vilma que estavam sempre presentes me encorajando a seguir em frente. Agradeço também ao Luiz Cavalcanti (IOC-Fiocruz) pela atenção, apoio e treinamento no momento que precisei, à Ellen Schmidt pelo fornecimento dos animais criados no Biotério Central (UFRJ), estando sempre à disposição em ajudar. Principalmente, agradeço aos animais, pois sem eles, não seria possível a realização deste trabalho.

Resumo

BASTOS, Renata Gonçalves Villela. **Aperfeiçoamento dos protocolos de avaliação da dor para o modelo de contusão pulmonar e lesão podal em ratos.** Rio de Janeiro, 2018. Dissertação de Mestrado Profissional de Formação em Pesquisa Biomédica – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Centro de Ciência da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Na experimentação animal, o tratamento da dor se torna importante fator de refinamento na pesquisa. A presença da dor pode criar maior variabilidade e menor confiabilidade nos resultados experimentais. O único método validado para a avaliação da dor em roedores (ratos) é a Escala de Expressão Facial para Ratos (EEFR). Porém, apesar de ser uma ferramenta útil e confiável, já há dados na literatura que discutem a sua baixa sensibilidade e necessidade de outras ferramentas em diferentes modelos. O método de nocicepção de Von Frey tem como objetivo principal a avaliação da dor por lesão na região podal ou para a avaliação de hiperalgesia. Recentemente, essa técnica foi proposta para ser realizada tanto na região plantar como na região abdominal (região da lesão) e inguinal para a avaliação da dor no modelo de laminectomia, pancreatite e reparação de hérnia inguinal respectivamente. Esses modelos, serviram como impulso para avaliação do método de nocicepção de Von Frey para ser utilizada como ferramenta de avaliação da dor no modelo de contusão pulmonar, e para avaliação do qual a EEFR se mostrou pouco sensível. O objetivo principal deste trabalho, foi avaliar a sensibilidade da técnica da EEFR, Von Frey plantar e em tórax e semiflexível em tórax como ferramentas para avaliação da dor em modelo de contusão pulmonar e lesão podal. Desenvolver um POP 1 para a utilização de Von Frey plantar para avaliação da dor em modelo de lesão podal no Laboratório de Fisiologia da Respiração (LFR). Desenvolver um POP 2 para a utilização de ferramentas que se mostrarem eficazes na avaliação da dor em modelo de contusão pulmonar no LFR e comparar os resultados obtidos nos experimentos 1 e 2. Foram realizados 2 experimentos com 3 grupos experimentais para avaliação da dor 1 e 24 horas pós

lesão podal e contusão pulmonar utilizando os métodos da EEFR, teste nociceptivo de Von Frey plantar e em tórax e o teste com filamento semi flexível em tórax. Os resultados demonstraram uma baixa sensibilidade da escala de expressão facial para avaliação da dor pós lesão nos dois experimentos. No experimento 1, os dois testes nociceptivos de Von Frey e o teste com o filamento semi flexível, apresentaram redução do limiar de dor nos 3 grupos, mesmo no grupo controle, assim, o experimento não foi útil para avaliar a eficácia das técnicas. No experimento 2, com o refinamento da metodologia, confirmou-se o uso do teste nociceptivo de Von Frey plantar para avaliação da dor em lesões podais, porém, tanto o teste nociceptivo de Von Frey plantar e em tórax, não foram ferramentas úteis para avaliação da dor em modelo de contusão pulmonar. O estímulo com o filamento semi flexível em tórax foi capaz de detectar dor em modelo de contusão pulmonar 24 horas após a lesão, porém não em 1 hora após contusão, havendo uma tendência. Em conclusão, após o experimento 1, observou-se a necessidade de um refinamento na metodologia e o mesmo, interferiu positivamente nos resultados do experimento 2.

Palavras-chave: Dor. Von Frey. Expressão facial.

Abstract

BASTOS, Renata Gonçalves Villela. **Improvement of pain assessment protocols for pulmonary contusion model and foot injury in rats.** Rio de Janeiro, 2018. Dissertação de Mestrado Profissional de Formação em Pesquisa Biomédica – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Centro de Ciência da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

In animal experimentation, pain treatment becomes an important refinement factor in research. The presence of pain may create greater variability and less reliability in the experimental results. The only validated method for assessing pain in rodents (rats) is the Facial Expression Ratio for Rats (EEFR). However, although it is a useful and reliable tool, there is already data

in the literature that discusses its low sensitivity and the need for other tools in different models. Von Frey's nociception method has as main objective the evaluation of pain due to foot injury or the evaluation of hyperalgesia. Recently, this technique was proposed to be performed in the plantar region as well as in the abdominal (injury region) and inguinal region for the evaluation of pain in the model of laminectomy, pancreatitis and repair of inguinal hernia, respectively. These models served as an impulse for evaluation of the Von Frey nociception method to be used as a tool for assessing pain in the pulmonary contusion model, and for evaluation of which the RFE was not very sensitive. The main objective of this work was to evaluate the sensitivity of the technique of the EPSF, Von Frey plantar and in the chest and semi-flexible in the chest as tools for evaluation of the pain in model of pulmonary contusion and foot injury. To develop a POP 1 for the use of Von Frey plantar for evaluation of pain in the model of foot injury in the Laboratory of Physiology of Respiration (LFR). To develop a SOP 2 for the use of tools that are effective in evaluating pain in a pulmonary contusion model in the FFR and to compare the results obtained in experiments 1 and 2. Two experiments were performed with 3 experimental groups for pain evaluation 1 and 24 hours after foot injury and pulmonary contusion using the EPSF methods, Von Frey nociceptive plantar and chest test, and the semi-flexible filament thorax test. The results demonstrated a low sensitivity of the facial expression scale to assess post-injury pain in both experiments. In experiment 1, Von Frey's two nociceptive tests and the semi-flexible filament test showed reduction of the pain threshold in the 3 groups, even in the control group, so the experiment was not useful to evaluate the effectiveness of the techniques. In the experiment 2, with the refinement of the methodology, the use of nociceptive Von Frey plantar test was evaluated for the evaluation of pain in foot injuries, however, both Von Frey's nociceptive plantar and chest test were not useful tools for evaluation of pain in a pulmonary contusion model. The stimulation with the semi-flexible filament in the thorax was able to detect pain in a model of pulmonary contusion 24 hours after the injury, but not in 1 hour after

contusion, with a tendency. In conclusion, after experiment 1, the need for a refinement in the methodology was observed and the same, interfered positively in the results of the experiment 2.

Key words: Pain. Von Frey. Facial expression.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Escala de Expressão Facial para Ratos. É composta por cinco "unidades de ação" facial (representadas pelas lacunas horizontais): A- Compressão orbital, B- Nariz e bochechas achatados, C- Posição das orelhas, D- Vibrissas alteradas. É realizada uma pontuação em uma escala de 0-2 (representada pelas lacunas verticais) para cada unidade (totalizando 8 pontos) (SOTOCINAL <i>et al.</i> , 2011).....	7
FIGURA 2: Escala de Expressão Facial para Camundongos. É composta por cinco "unidades de ação" facial (representadas pelas lacunas horizontais): A- Compressão orbital, B- Nariz inchado, C- Bochechas inchadas, D- Posição das orelhas, E- Vibrissas alteradas. É realizada uma pontuação em uma escala de 0-2 (representada pelas lacunas verticais) para cada unidade (totalizando 10 pontos) (LANGFORD <i>et al.</i> , 2010).....	8
FIGURA 3: Filamento semi flexível utilizado na região do apêndice xifóide (tórax).....	15
FIGURA 4: Superfície plantar direita. Local onde foi realizada a lesão podal (região central da pata).....	17
FIGURA 5: Esquemática de um modelo de contusão pulmonar bilateral isolada em rato. O animal anestesiado, foi posicionado em decúbito dorsal na base, o escudo protetor e a plataforma dispostos sobre o tórax do animal. O tubo vertical de aço inoxidável colocado sobre a plataforma permitiu com que o peso cilíndrico caísse sobre o tórax a partir do segundo furo do tubo como demonstrado na figura (RAGHAVENDRAN <i>et al.</i> , 2005).....	20
FIGURA 6: Estrutura de acrílico. Elaborado para a manutenção do rato para o teste de Von Frey e em detalhe a base aramada sobre a qual o animal fica apoiado.....	25
FIGURA 7: A - Analgesímetro de Von Frey / B - Filamentos utilizados no analgesímetro....	25
FIGURA 8: Desenho experimental (experimento 1). Exemplifica todo o processo realizado em materiais e métodos em forma de esquema, onde os pontos diferenciais deste experimento está descrito em amarelo.....	27
FIGURA 9: Desenho experimental (experimento 2). Exemplifica todo o processo realizado em materiais e métodos em forma de esquema, onde os pontos diferenciais deste experimento está descrito em verde comparando com o método descrito no experimento 1 representado em amarelo.....	28
FIGURA 10: Exemplificação da filmagem por 2 minutos com o animal dentro do microisolador aberto.....	31

FIGURA 11: Estímulo com o filamento de Von Frey aplicado na região plantar direita.....	33
FIGURA 12: Gráfico dos dados obtidos a partir da avaliação pelo analgesímetro de Von Frey frente ao estímulo realizado na região plantar. Dados basais, após 1h e após 24h expressos em gramas de força para os grupos controle, contusão pulmonar e lesão podal do experimento 1.....	37
FIGURA 13: Gráfico dos dados obtidos a partir da avaliação pelo analgesímetro de Von Frey frente ao estímulo realizado no apêndice xifóide. Dados basais, após 1h e após 24h expressos em gramas de força para os grupos controle, contusão pulmonar e lesão podal do experimento 1.....	38
FIGURA 14: Gráfico dos dados obtidos a partir da avaliação pelo analgesímetro com filamento semi-flexível frente ao estímulo realizado no apêndice xifóide. Dados basais, após 1h e após 24h expressos em gramas de força para os grupos controle, contusão pulmonar e lesão podal do experimento 1.....	38
FIGURA 15: Gráfico dos dados obtidos a partir da avaliação pelo analgesímetro de Von Frey frente ao estímulo realizado na região plantar. Dados basais, após 1h e após 24h expressos em gramas de força para os grupos controle, contusão pulmonar e lesão podal do experimento 2.....	40
FIGURA 16: Gráfico dos dados obtidos a partir da avaliação pelo analgesímetro de Von Frey frente ao estímulo realizado no apêndice xifóide. Dados basais, após 1h e após 24h expressos em gramas de força para os grupos controle, contusão pulmonar e lesão podal do experimento 2.....	40
FIGURA 17: Gráfico dos dados obtidos a partir da avaliação pelo analgesímetro com filamento semi-flexível frente ao estímulo realizado no apêndice xifóide. Dados basais, após 1h e após 24h expressos em gramas de força para os grupos controle, contusão pulmonar e lesão podal do experimento 2.....	41

LISTA DE TABELA

TABELA 1: Resultados da pontuação total obtida pela avaliação da escala de expressão facial em ratos. No experimento 1, utilizando 27 animais (9 animais por grupo) e experimento 2, utilizando 21 animais (9 animais no grupo controle e 6 animais cada nos demais dois grupos (contusão pulmonar e lesão podal), descrita em média \pm desvio padrão.....	36
---	----

LISTA DE SIGLAS

ACTH- Hormônio Adrenocorticotrófico

ANOVA- Análise de Variância

CCS- Centro de Ciências da Saúde

CEUA- Comissão de Ética no Uso de Animais

CP- Constusão Pulmonar

CTL- Contole

EEFC- Escala de Expressão Facial para Camundongos

EEFR- Escala de Expressão Facial para Ratos

Fe₃O₄- Óxido de Ferro III

gf- Gramas de Força

HDAC2- Histona Desacetilases 2

IASP- Associação Internacional para o Estudo da Dor

IBCCF- Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

IT- Intratecal

LFR- Laboratório de Fisiologia da Respiração

LXA4- Lipoxina A4

NaCl- Cloreto de Sódio

NPs- Nanopartículas

PC- Pancreatite Crônica

POD- Lesão Podal

POP - Procedimento Operacional Padrão

SC- Subcutânea

SNC- Sistema Nervoso Central

UFRJ- Universidade Federal do Rio de Janeiro

VAS- Escala Análoga Visual

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Dor e a importância do seu tratamento na pesquisa biomédica.....	1
1.2 Escalas de avaliação da dor unidimensionais e multifatoriais.....	4
1.3 Escala de Expressão Facial	6
1.4 Método de avaliação mecânica da nocicepção – Von Frey.....	11
1.4.1 Aplicação em lesões podais.....	13
1.4.2 Aplicação em lesões não-podais.....	13
1.5 Filamento semi flexível.....	14
1.6 Modelos experimentais de dor	15
1.6.1 Lesão podal	15
1.6.2 Contusão pulmonar	18
2. JUSTIFICATIVA.....	21
3. OBJETIVOS	22
3.1 Objetivo geral.....	22
3.2 Objetivos específicos.....	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1 Animais	22
4.2 Grupos Experimentais	23
4.3 Divisão e etapas experimentais	23
4.3.1 Experimento 1	23
4.3.2 Experimento 2	27
4.4 Procedimentos Experimentais	29
4.4.1 Execução das lesões	29
4.4.2 Avaliação pela Escala de Expressão Facial para Ratos (EEFR)	30
4.4.3 Avaliação Nociceptiva com Von Frey e filamento semi-flexível.	32
4.4.4 Eutanásia	35
4.5 Planejamento Estatístico	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1 Escala de Expressão Facial	35
5.2 Testes Nociceptivos.....	36
5.2.1 Experimento 1	36
5.2.2 Experimento 2	39
6. CONCLUSÕES.....	47

8. PRODUTO FINAL DA DISSERTAÇÃO	48
8.1 Procedimento Operacional Padrão para utilização dos testes nociceptivos de Von Frey plantar e com filamento semi-flexível em tórax no laboratório de Fisiologia da Respiração	48
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
APÊNDICE 1	62
APÊNDICE 2	68

1. INTRODUÇÃO

1.1 Dor e a importância do seu tratamento na pesquisa biomédica

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da dor (IASP, 1979), a dor foi definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada à lesão tecidual real ou potencial. Este conceito; designado para a espécie humana, tem sido, amplamente, utilizado para animais. Em 2017, foi escolhido pela IASP (*International Association for the Study of Pain*) como o ano de luta contra a dor após cirurgias. A IASP constituiu um grupo de trabalho, com o objetivo de disseminar informação sobre a dor pós-cirúrgica, realizar ações educativas com profissionais de saúde que lidam com este tipo de dor em suas relações com pacientes, aumentar a percepção da dor pós- cirúrgica de gestores públicos, meios de comunicação e público em geral (IASP, 2018).

A nociceção é o componente fisiológico da dor, que consiste num processo de transdução, transmissão e modulação de estímulos neurais a partir de uma lesão tecidual real ou potencial e resultando na percepção consciente destes estímulos no córtex cerebral (HANSEN, 1997; LAMONT *et al.*, 2000). No córtex cerebral, o estado psicológico, físico e crenças individuais interferem na etapa de percepção, tornando a dor uma experiência individual (MELZACK & WALL, 1987). Se a nociceção fosse equivalente à dor, o problema da avaliação da dor não existiria. Para avaliação de pacientes, simplesmente, iria mensurar a intensidade da atividade do sistema nervoso periférico ou central em resposta a um dano tecidual e promover terapia analgésica até que a nociceção estivesse ausente (HANSEN, 1997). Entretanto, a dor é uma experiência e não apenas uma resposta fisiológica mensurável e, assim sendo, sua avaliação é bastante difícil. A experiência de dor é bastante variável dependendo do indivíduo, mesmo quando são aplicados estímulos idênticos em ambientes idênticos (HANSEN, 2003). Além da dificuldade de avaliação de dor pela sua subjetividade,

em animais, assim como em crianças e bebês, essa dificuldade é aumentada pela impossibilidade de comunicação verbal (LANGFORD *et al.*, 2010).

Os animais possuem um sistema nervoso semelhante ao dos seres humanos adultos, portanto, qualquer procedimento ou lesão que seja considerado doloroso por seres humanos adultos, também o é para animais (antropomorfismo), mesmo quando não há uma evidência patente de comportamento doloroso. (HASKINS *et al.*, 1987).

A partir da década de 80, com o avanço dos estudos em fisiopatologia da dor e aumento da preocupação ética da sociedade com o trato de animais, começou a haver uma maior preocupação na avaliação e tratamento da dor em animais e começaram a ser desenvolvidas escalas de avaliação da dor nas diferentes espécies (HOLDEN *et al.*, 2014; FIRTH & HALDANE, 1999; HOLTON *et al.*, 2001). Na experimentação animal, o tratamento da dor se torna importante fator de refinamento da pesquisa. O princípio dos 3Rs (*replacement, refinement and reduction*), desenvolvido originalmente por Russel & Burch (1959), é aceito internacionalmente como critério para pesquisa humanitária. O conceito de refinamento se refere a melhorias de alojamento, cuidados e procedimentos, que minimizem dor real ou potencial, sofrimento, estresse ou danos físicos prolongados ou melhora do bem-estar do animal, quando seu uso não pode ser substituído. Já foi comprovado que o refinamento traz benefícios não apenas para os animais, como também para o resultado da pesquisa (BULGER, 1987). Apesar do conceito dos 3R's ser antigo, ainda nos dias atuais, há muita negligência no tratamento da dor de animais utilizados para pesquisa. O refinamento dos procedimentos de pesquisa envolvendo animais depende, em parte, de vias efetivas para prevenir e aliviar a dor que requer métodos eficazes e confiáveis para detectar e quantificar a mesma (ROUGHAN & FLECKNELL, 2003).

Além das questões éticas no tratamento dos animais de experimentação, a dor produz diferentes efeitos deletérios que levam ao desencadeamento de resposta sistêmica

neuroendócrino-metabólica e imunológica. Por exemplo: a dor aguda e o estresse, que geralmente ocorrem após o trauma cirúrgico, provocam alterações nas respostas somáticas, autonômicas, metabólicas (aumentam os níveis de glicose e diminuem os níveis de insulina), hormonais (aumento de ACTH, cortisol, hormônio antidiurético, catecolaminas, aldosterona, renina, angiotensina II e testosterona) e psicológicas (WEISSMAN, 1990; WASSEF *et al.*, 1998). Como consequência, pode-se observar catabolismo muscular proteico, lipólise, retenção hídrica e sódica, e ainda excreção de potássio (WEISSMAN, 1990). Clinicamente, o estresse também pode retardar o tempo de cura (WEISSMAN, 1990) e ainda gerar efeitos severos para o paciente humano. No sistema cardiovascular, ocorre constrição arteriolar e venosa com consequente aumento da pressão arterial e diminuição da capacitância venosa; aumento da contratilidade e da frequência cardíaca, gerando aumento do consumo de oxigênio (O₂) pelo miocárdio, causando hipóxia, isquemia e arritmias cardíacas (GAYNOR *et al.*, 1999). Considerando tais alterações, os resultados de pesquisas com animais que desconsiderem a avaliação e o tratamento da dor, estarão fortemente influenciados pelos efeitos deletérios da dor na fisiologia, criando maior variabilidade e menor confiabilidade (WEISSMAN, 1990). Entre as alterações no sistema respiratório em animais com dor podem ser citadas: variações no tônus vascular pulmonar; aumentos nas concentrações de dióxido de carbono no ar expirado; diminuição da capacidade residual funcional, o que pode levar à atelectasias e, por consequência, hipoventilação e hipóxia. O aumento da concentração plasmática de catecolaminas pode ainda diminuir a motilidade intestinal e o fluxo sanguíneo para o órgão, o que pode ocasionar isquemia e facilitar o crescimento e translocação bacterianas. (HAMIL *et al.*, 1994).

A dor e o sofrimento podem prejudicar o desenvolvimento do cérebro, cognição, memória, aprendizagem, resistência à patologia induzida pelo estresse, imunocompetência, progressão da doença e expressão comportamental (EISENBERGER & COLE, 2012).

Descrição e atenção à anestesia, analgesia e criação, incluindo o conhecimento veterinário, são fundamentais para produzir resultados cientificamente confiáveis (ROLLIN, 2009; FESTING & ALTMAN, 2002; NEMZEK *et al.*, 2004). Os métodos para monitorar e tratar o sofrimento animal devem ser descritos para garantir o bem-estar dos animais e resultados confiáveis (GALLEY, 2010).

1.2 Escalas de avaliação da dor unidimensionais e multifatoriais

Em humanos adultos, são bastante utilizadas escalas em que o próprio indivíduo define de forma subjetiva o grau de dor que está experimentando, como na Escala Análoga Visual (VAS), que se trata de uma linha com marcação do ponto zero e 100, para que defina quanto de dor considera estar; ou numérica, em que marco o número de zero a 10 que considerada relacionado com sua dor (HOLTON *et al.*, 1998). Além disso, as escalas unidimensionais em animais (escala numérica de avaliação) possuem a limitação de serem capazes de acessar apenas a intensidade da dor, deixando de considerar as qualidades sensorial e emocional da dor (MORTON *et al.*, 2005). Entretanto, há uma diferença fundamental entre pessoas e animais, já que pacientes humanos definem o escore de sua própria dor, enquanto em animais os escores devem ser assinalados por observadores (HOLTON *et al.*, 1998).

Para reduzir a variabilidade entre observadores e avaliar a dor de forma mais completa, foram criadas as escalas multifatoriais, baseadas em avaliações semi-quantitativas. Foram concebidas inicialmente para crianças e bebês e depois começaram a ser empregadas especificamente para determinadas espécies animais (HANSEN, 1997). A principal vantagem destas escalas é que minimizam o efeito das crenças e preconceitos do observador durante o processo de avaliação, seu uso rotineiro aumenta a probabilidade de intervenção analgésica quando comparado a seu uso a partir de julgamento clínico. Entretanto, também apresentam limitações. Dentre suas desvantagens principais, está o fato de necessitarem de um treinamento

prévio do observador para seu uso e também que tomam um tempo maior para a avaliação que a avaliação clínica rotineira. Além disso, muitas delas foram criadas para um procedimento específico e sua modificação, para que possa ser utilizada de forma mais ampla, reduz a sensibilidade e pode levar a sub-avaliação da dor. Apesar de tais limitações, escalas objetivas baseadas em observadores ajudaram a melhorar, consideravelmente, a avaliação e tratamento da dor em diversos serviços e criam um direcionamento para medicina veterinária (HANSEN, 1997).

Estas escalas se baseiam na avaliação de determinados parâmetros como por exemplo: postura, vocalização, autolimpeza e piloereção, variação de peso, frequência cardíaca e respiratória, alterações hormonais dentre outros fatores, e atribuição de pontos para cada um deles, dependendo da condição do animal. Após isso, se somam os valores e se decide o resgate analgésico (ou eutanásia precoce, em caso de animais de pesquisa). Há escalas que consideram apenas parâmetros comportamentais (REID *et al.*, 2007; HOLTON *et al.*, 2001; HENDRIX *et al.*, 1996) e outras, dados comportamentais e fisiológicos (MORTON & GRIFFITHS, 1985; FIRTH & HALDANE, 1999; HELLYER, 2005; WAGNER *et al.*, 2008). Apesar de terem sido descritas para cães e em menor número para gatos (BRONDANI *et al.*, 2013), ainda não foi descrita uma escala de avaliação multifatorial para roedores, o que poderia ser bastante útil para aplicação na pesquisa biomédica.

Um modelo comportamental desenvolvido por Yang *et al.* (2009) para avaliação da dor causada pelo movimento dentário (deslocamento dos dentes) em ratos usando a atividade de limpeza da face, onde ratos machos foram filmados depois do movimento dentário experimental e seu comportamento de limpeza facial foram avaliados. O movimento do dente produziu um aumento significativo na duração de comportamento de limpeza bucal, que foi reduzido por administração de morfina.

1.3 Escala de Expressão Facial

Dentre as formas de avaliar a dor, as escalas de expressão facial constituem ferramentas úteis para avaliar dor e analgesia em populações que não apresentam possibilidade de comunicação verbal (bebês, crianças, pessoas com déficit cognitivo e, mais recentemente, em animais) (LANGFORD *et al.*, 2010). Apesar de evidências prévias de que mamíferos, inclusive roedores, são capazes de utilizar expressão facial para demonstrar estados emocionais (GRILL & NORGRÉN, 1978), apenas há cerca de oito anos atrás, foi desenvolvida a escala de expressão facial para camundongos (EEFC) (LANGFORD *et al.*, 2010) e a escala de expressão facial para ratos (EEFR) (SOTOCINAL *et al.*, 2011). Estas duas escalas para camundongos e ratos, são as duas únicas escalas validadas por Langford *et al.* (2010) e Sotocinal *et al.* (2011) respectivamente para a utilização em roedores, e vêm sendo aplicadas para o refinamento de determinados modelos experimentais (DE RANTERE *et al.*, 2015; HAMPSHIRE & ROBERTSON, 2015; LEACH *et al.*, 2012; LONG *et al.*, 2015; MILLER & LEACH, 2015; WAITE *et al.*, 2015; WHITTAKER *et al.*, 2015).

A escala de expressão facial para ratos foi desenvolvida e caracterizada, a partir da utilidade conhecida das escalas de codificação facial (unidimensionais) para a quantificação da dor em populações humanas não verbais (WILLIAMS, 2002), e a predição de Darwin de que animais não humanos exibem expressões faciais similares a estados emocionais como seres humanos (DARWIN, 1872).

A EEFR e a EEFC são compostas respectivamente por quatro e cinco "unidades de ação" facial (compressão orbital, nariz e bochechas achatadas (ratos)/ inchados (camundongos), posição das orelhas e vibrissas alteradas) pontuadas em uma escala de 0-2 para cada unidade (totalizando 8 pontos) para a sua proeminência em fotografias tiradas de vídeo digital em qualquer condição de dor (Figura 1 e 2). Demonstrou-se que a escala de expressão facial para camundongos exibe elevada precisão e confiabilidade, é útil para quantificar a dor moderada

(de alguns minutos a cerca de um dia), é sensível para a detecção de efeitos analgésicos fracos e pode representar uma medida de resposta afetiva do animal para dor (LANGFORD *et al.*, 2010).

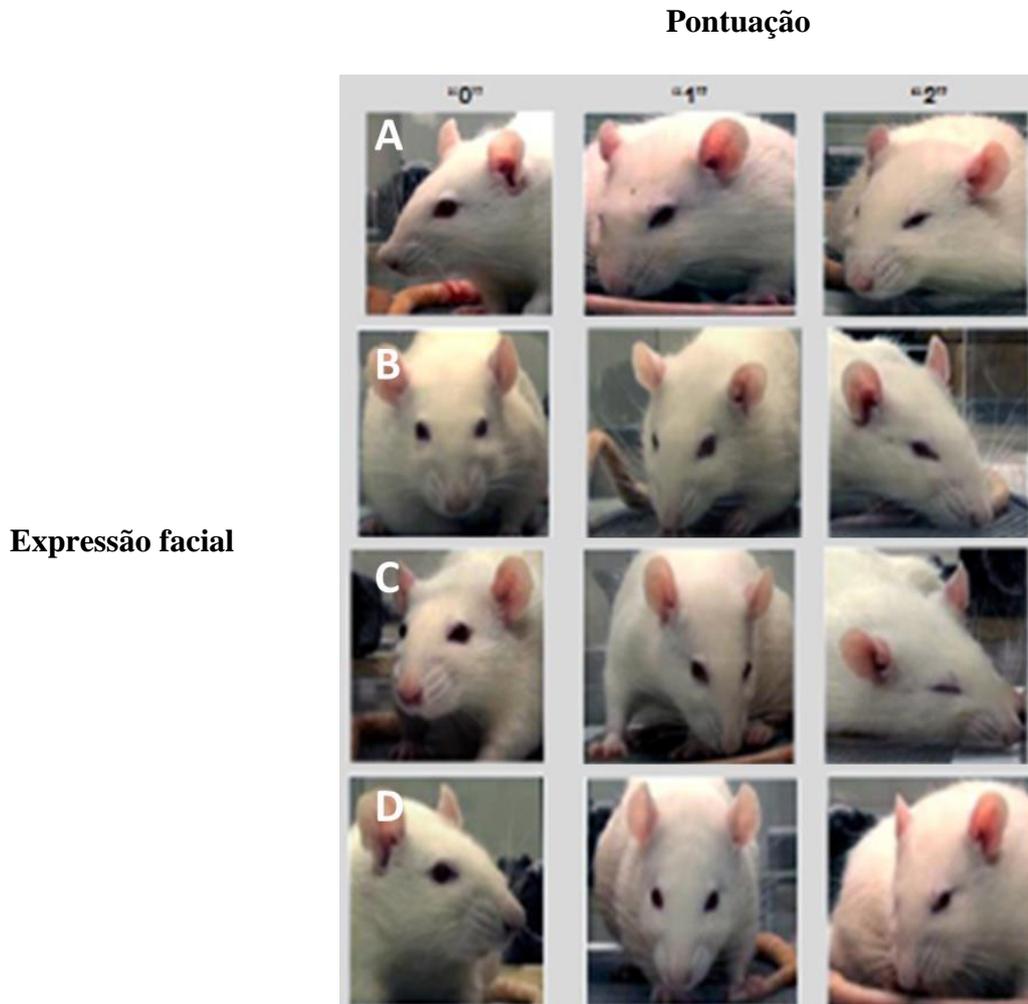


Figura 1: Escala de Expressão Facial para Ratos. É composta por quatro "unidades de ação" facial (representadas pelas lacunas horizontais): A- Compressão orbital, B- Nariz e bochechas achatados, C- Posição das orelhas, D- Vibrissas alteradas. É realizada uma pontuação em uma escala de 0-2 (representada pelas lacunas verticais) para cada unidade (totalizando 8 pontos) (SOTOCINAL *et al.*, 2011)

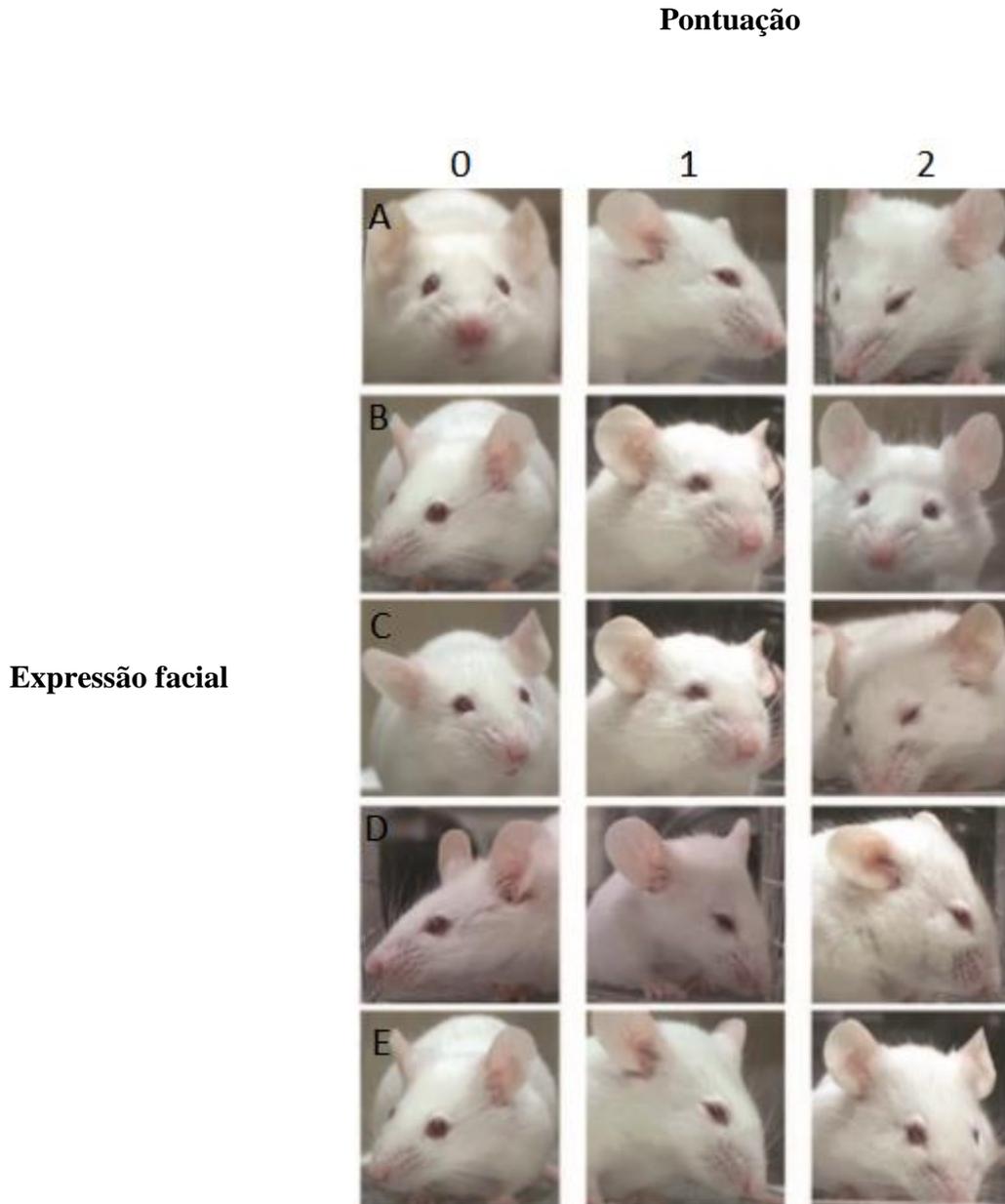


Figura 2: Escala de Expressão Facial para Camundongos. É composta por cinco "unidades de ação" facial (representadas pelas lacunas horizontais): A- Compressão orbital, B- Nariz inchado, C- Bochechas inchadas, D- Posição das orelhas, E- Vibrissas alteradas. É realizada uma pontuação em uma escala de 0-2 (representada pelas lacunas verticais) para cada unidade (totalizando 10 pontos) (LANGFORD *et al.*, 2010)

A EEFR foi criada, pois apesar de serem utilizados parâmetros semelhantes nas quatro unidades de ação facial, algumas variações foram percebidas entre a expressão facial de ratos e camundongos (SOTOCINAL *et al.*, 2011). No camundongo, o nariz e a face têm uma aparência lisa, enquanto que na presença de dor protuberâncias distintas são observadas tanto em regiões

do nariz, quanto na face (LANGFORD *et al.*, 2010). Em contrapartida, nas regiões do nariz e face do rato há uma distinta protuberância, e com a presença da dor, a ponta do nariz achata e alonga, fazendo com que as vibrissas achatem. Esta diferença torna a EEFR muito mais sensível e precisa na detecção da dor em ratos do que a EEFC (SOTOCINAL *et al.*, 2011).

A princípio, tanto as escalas multifatoriais quanto as faciais podem apresentar falhas de sensibilidade na avaliação, primeiro pela natureza subjetiva e incomensurável da dor e, ainda, pela dificuldade de avaliação nos animais pela incapacidade de comunicação (CONZEMIUS *et al.*, 1997; FIRTH & HALDANE, 1999; HOLTON *et al.*, 1998; HOLTON *et al.*, 2001; MATHEWS, 2000).

A EEFC foi aplicada para avaliação de dor em camundongos que sofreram vasectomia, comparando o uso da EEFC com a avaliação de determinados comportamentos relacionados a dor, como por exemplo, perna traseira levantada, cambalear, contorcer-se e queda. Ambos os métodos foram capazes de diferenciar os animais controles dos animais que sofreram vasectomia e ainda diferenciar tratamentos analgésicos, onde a EEFC foi um meio rápido e fácil de avaliar a dor pós-cirúrgica e a eficácia do tratamento analgésico em camundongos e supera algumas das limitações dos sistemas de avaliação de comportamento (LEACH *et al.*, 2012). A mesma escala, também foi utilizada para avaliar a dor após uma ovariectomia em camundongos e efeitos de analgésicos. Consideraram que a EEFC foi bastante eficaz para avaliar a dor causada pela ovariectomia e a eficácia de analgésicos (MATSUMIYA *et al.*, 2012). A EEFR foi utilizada para avaliação de dor em ratos comparando a dor pós-operatória em ratos machos após biópsia hepática por laparotomia ou laparoscopia. Os autores utilizaram a escala facial de dor validada (MATSUMIYA *et al.*, 2012; SOTOCINAL *et al.*, 2011) para avaliar aspectos selecionados de aparência, taxa respiratória e alterações posturais. Avaliação de vídeo foi feita por um avaliador cego (MATSUMIYA *et al.*, 2012; SOTOCINAL *et al.*, 2011). Os ratos que sofreram laparoscopia apresentaram menos sinais de dor do que os ratos submetidos à

laparotomia (PRÉFONTAINE *et al.*, 2015). Foram realizados testes de confiabilidade com a escala de expressão facial para ratos em um cenário heterogêneo (modelo experimental diferente, avaliador (es), ambiente) e gerar uma pontuação de intervenção analgésica para seu uso. Evidenciam a utilidade da escala, porém, a necessidade de testes adicionais para avaliar a interpretação de um cenário heterogêneo (OLIVER *et al.*, 2014).

As escalas de expressão facial foram desenvolvidas para roedores para avaliação da dor (SOTOCINAL *et al.*, 2011; OLIVER *et al.*, 2014) e foram utilizadas para refinar modelos experimentais (LIAO *et al.*, 2014; LILLEY *et al.*, 2015) ou avaliar a eficácia de fármacos analgésicos comuns (WAITE *et al.*, 2015; ROUGHAN *et al.*, 2016). No entanto, tais escalas foram sugeridas para serem influenciadas por efeitos comportamentais não específicos de opióides (LANGFORD *et al.*, 2010) e a posterior validação deve ser realizada para determinar se elas são um método adequado de avaliação da dor após administração de morfina.

Com relação à aplicação da escala de expressão facial após o uso de opióides (por exemplo: morfina) citado acima, em um estudo, avaliaram se a morfina intratecal poderia fornecer analgesia para prevenir a dor em ratos submetidos à laparotomia, sendo avaliado pela análise de alterações comportamentais e a escala de expressão facial de ratos. O estudo foi dividido em duas fases, onde a primeira fase (controle) avaliou o efeito da morfina, administrada via SC ou intratecal (IT) no comportamento e expressões faciais em ratos sem dor. A segunda fase avaliou efeitos semelhantes em ratos após cirurgia abdominal com dor aguda. Na fase 1, após 1 hora, os ratos que receberam NaCl (IT) apresentaram um escore EEFR menor do que os ratos que receberam NaCl (SC). Após 4 horas, a pontuação da EEFR total foi menor nos ratos do grupo de NaCl (IT) em comparação com NaCl (SC) e grupos de morfina (SC) e (IT) em comparação com os respectivos grupos de controle, o que leva a questionar a especificidade da escala com relação a dor, já que não deveria haver diferença entre esses dois grupos. Na fase 2, os índices de EEFR que receberam NaCl (IT) mudaram ao longo do tempo:

os escores foram menores em comparação com as 8 horas após a laparotomia, mas não em outros pontos de tempo. Resultados semelhantes foram obtidos para ratos submetidos à cirurgia simulada o que também indica baixa eficácia da escala facial. Os índices para ratos que receberam morfina permaneceram similares ao longo do tempo se o medicamento fosse administrado por via SC, mas foram maiores 8 horas após cirurgia, se a morfina fosse injetada (IT). Os ratos tratados com morfina (SC e IT) apresentaram valores da EEFR menores do que os ratos do controle (NaCl IT) 1 hora após a cirurgia. Enquanto a EEFR pode ter vantagens para a avaliação da dor em ratos em comparação com a pontuação dos comportamentos de dor, a morfina pode impactar na expressão facial de ratos sem dor e influenciar o uso da EEFR, em animais medicados com opióides (THOMAS *et al.*, 2016).

1.4 Método de avaliação mecânica da nociceção – Von Frey

Sendo a avaliação de dor tão subjetiva, em diversos estudos de avaliação de dor em condições de hiperalgesia central ou alodinia, são utilizados testes nociceptivos, como por exemplo, o teste nociceptivo de Von Frey (CUNHA *et al.*, 2004; GUNDUZ *et al.*, 2011; ZHAO *et al.*, 2004; ZHAO *et al.*, 2009).

O teste nociceptivo de Frey Von é amplamente utilizado para pesquisas de avaliação de dor e alodinia em animais, mas não é usado de forma rotineira em animais que estejam participando de estudos que envolvam dor. Já em humanos, é utilizado rotineiramente (ZHAO *et al.*, 2004).

Este método consiste em testar a sensibilidade mecânica dos animais (se possuem dor ou não), onde os mesmos são alocados em uma caixa de acrílico com base aramada e a alodinia mecânica é testada utilizando os filamentos de Von Frey na região plantar no caso de lesão podal (WU *et al.*, 2017) ou em casos de lesões em locais distintos, como no caso da laminectomia citado por Lu *et al.* (2018) ou a aplicação do teste nociceptivo de Von Frey na

região da lesão, como por exemplo, na região inguinal conforme descrito por Bree *et al.* (2015) com o auxílio de um aparelho chamado analgesímetro digital que determina as pressões obtidas por cada filamento (WU *et al.*, 2017) e é determinado o limiar mecânico que resulta no reflexo de retirada da pata (ZHAO *et al.*, 2004) ou esquivar-se do filamento no caso da aplicação do teste nociceptivo de Von Frey na região da lesão (como na região inguinal para avaliação de dor pós-cirúrgica) (BREE *et al.*, 2015) ou na região abdominal (Liao *et al.*, 2018).

De forma mais elucidativa, foram consideradas respostas positivas ao estímulo: retirada da pata (CABAÑERO, 2009; JINGE *et al.*, 2017) e flexão da pata, desconsiderando o ato de caminhar (TIWARI, 2011). Em região inguinal ou abdominal, as respostas positivas classificadas foram: esquivar-se, lambe-se, retirada da área onde ocorreu a aplicação do filamento ou imediatamente após a aplicação do mesmo, respostas consideradas por Bree *et al.* (2015).

O analgesímetro de Von Frey, é constituído por uma haste aonde eram conectados os filamentos flexíveis ou semi flexível, que ficava ligado a um aparelho capaz de medir a força máxima aplicada. A estrutura onde são mantidos os animais durante o teste, é constituída em madeira ou metal, acrílico e uma grade aramada. A base deve permitir o movimento do animal e é recoberta pela grade aramada com aberturas de cerca de 0,5 cm de lado, que permite a realização do teste, mas sem que as patas dos animais se prendam ou ultrapasassem os espaços (WU *et al.*, 2017).

Os filamentos são geralmente de nylon que é um material higroscópico e por isso, a força necessária para o dobramento varia muito dependendo da temperatura e umidade (ANDREW, 1993). Os diferentes filamentos (distintos fabricantes) produzem variação de pressão e estímulo doloroso, por isso, é difícil comparar dados de laboratórios diferentes (MOLLER, 1998).

1.4.1 Aplicação em lesões podais

Em lesões podais, autores demonstraram um efeito analgésico dose-dependente de nanopartículas (NPs) de óxido de ferro III (Fe_3O_4) em um modelo de dor inflamatória crônica por Adjuvante Completo de Freund administrado via subcutânea na região plantar. A alodinia mecânica foi testada utilizando os filamentos de von Frey, tendo como resultado, a produção de analgesia quando injetado Fe_3O_4 NPs (5 mg) na pata lesionada em comparação ao grupo controle que foi utilizada solução salina (WU *et al.*, 2017).

Zhu *et al.* (2006) avaliaram comportamentos nociceptivos em um modelo de incisão cutânea e/ou muscular da pele na superfície plantar da pata traseira de ratos. A alodinia mecânica, foi observada durante vários dias após a cirurgia (BRENNAN *et al.*, 1996; POGATZKI *et al.*, 2002; ZAHN & BRENNAN, 1998). Formaram 3 grupos experimentais: incisão muscular da pele por alodinia mecânica; incisão muscular da pele ou somente incisão na pele, foram examinados para comportamentos nociceptivos. Na avaliação da dor através da alodinia mecânica, a dor foi mensurada a partir do limiar de retirada da pata provocado pelos estímulos dos filamentos do Von Frey. Duas horas após a cirurgia, o limiar de retirada da pata lesada foi significativamente diminuído nos três grupos em comparação com a pata contralateral e a morfina aumentou o limiar de retirada da pata de forma relacionada com a dose. A morfina não teve efeito sobre o limiar na pata contralateral.

1.4.2 Aplicação em lesões não-podais

Lu *et al.* (2018) avaliaram os possíveis efeitos protetores induzidos por lipoxina A4 (LXA4) em caso de lesão da medula espinhal, mostrando que o limiar de retirada da pata nos grupos com lesão medular e grupo tratado com LXA4 foi menor em comparação ao grupo

controle, indicando que a lesão medular produziu hipersensibilidade central mecânica significativa e ação protetora do LXA4.

O objetivo do estudo de Bree *et al.* (2015) foi desenvolver e caracterizar um modelo de rato anatomicamente relevante da dor pós-operatória aguda associada ao reparo da hérnia inguinal. O método utilizado para avaliação da dor, foi o teste de Von Frey, onde os filamentos são comumente usados na superfície plantar da pata traseira e os autores, ao invés disso, aplicaram os mesmos perpendicularmente à esquerda ou à direita (5 vezes, alternando entre os lados) do local da ferida cirúrgica. A resposta sensorial à estimulação de von Frey não foi significativamente diferente entre grupos controle e cirúrgico, como também entre os grupos de incisão e cirurgia. Para esses autores, os limiares de Von Frey realizados na região abdominal não parecem ser um índice útil de dor pós-cirúrgica neste modelo em particular.

Shahid *et al.* (2017) corroboraram ainda mais a eficácia da *Bacopa monnieri* contra a dor neuropática em um modelo de rato bem caracterizado de lesão crônica da constrição do nervo ciático usando os paradigmas bem conhecidos de testes comportamentais de alodinia e hiperalgesia. Houve uma diminuição no limiar nociceptivo no grupo com lesão de constrição crônica com relação ao grupo controle. A administração isolada de *Bacopa monnieri* ou Gabapentina aliviou a nocicepção a estímulos de pressão estática. Nos grupos de operação simulada nenhuma alodinia estática foi observada.

Liao *et al.* (2018) investigaram o efeito da histona desacetilases 2 (HDAC2) na alodinia da pancreatite crônica (PC). O AR-42 pode atenuar a dor crônica induzida por PC, detectado por avaliação com filamentos de Von frey sem interferir com o comportamento básico da dor.

1.5 Filamento semi flexível

A técnica do filamento semiflexível utiliza um filamento de nylon mais espesso que os filamentos de Von Frey tradicionais (Figura 3). É utilizado para uma adaptação do método de

Von Frey, em que é feito estímulo com um único filamento ao invés de estímulos crescentes de força com diferentes filamentos. Uma desvantagem do método é que a variação de pressão se dá de forma mais rápida que usando filamentos com espessuras crescentes, e assim há menor sensibilidade no valor de força que gera a resposta positiva. Uma vantagem é que o teste pode ser executado de forma mais rápida, o que se trata de um fator importante para utilização do método como ferramenta de refinamento para avaliação de dor em estudos em que essa avaliação não é objetivo principal do estudo (ANDREW, 1993).



Figura 3: Filamento semi flexível utilizado na região do apêndice xifóide (tórax)

1.6 Modelos experimentais de dor

As técnicas de avaliação de dor supracitadas (EEFR, teste nociceptivo de Von Frey e filamento semi flexível), foram utilizadas para avaliar a mesma 1 hora e 24 horas após o procedimento das seguintes lesões.

1.6.1 Lesão podal

Os modelos de dor inflamatória ou neuropática são amplamente utilizados em estudos sobre dor, de uma forma mais usual para a avaliação da eficácia de novos fármacos analgésicos.

1.6.1.1 Uso de Ácido Tormentico

O ácido tormentico é um triterpeno pentacíclico natural que se encontra em uma variedade de plantas, como *Ocotea suaveolens*, *Desfontainia spinosa*, *Hyptis capitata* e

Vochysia divergens Pohl (BEIRITH *et al.*, 1999; HOUGHTON & LIAN, 1986; LEE *et al.*, 1988; HESS & MONACHE, 1999).

Bortalanza *et al.* (2002) mostraram anteriormente que um extrato de *O. suaveolens* e do ácido tormentico isolado da casca do caule desta planta, produziu antinocicepção relacionada à dose contra as respostas agudas viscerais, neurogênicas e inflamatórias.

Bortalanza *et al.* (2002) utilizaram dois modelos de dor crônica com lesão na pata, para avaliar a ação anti-alodínica (analgésica) do ácido triterpeno pentacíclico (onde apresentou resposta positiva) administrado por via oral em camundongos: Modelo de dor neuropática, causada pela ligadura parcial do nervo ciático e modelo de dor inflamatória. Para produção de neuropatia crônica uma ligação parcial do nervo ciático foi feita por amarração de 1/3 a 1/2 da porção dorsal do nervo ciático. Modelo similar foi descrito para ratos por Seltzer *et al.* (1990) e para camundongos por Malmberg & Basbaum (1998). Para produzir uma resposta inflamatória crônica, camundongos foram injetados com 0,02 ml de Adjuvante Completo de Freund (*Mycobacterium tuberculosis*) por via subcutânea na superfície plantar da pata direita traseira (CAO *et al.*, 1998; FERREIRA *et al.*, 2001). Esta dose do Adjuvante Completo de Freund produz significante inchaço na pata traseira e alodínia.

1.6.1.2 Uso de Adjuvante Completo de Freund

A injeção de Adjuvante Completo de Freund (composto por *Mycobacterium tuberculosis*; Sigma, St. Louis, MO, USA) na superfície plantar do rato (Figura 4) ou camundongo, induz dor e inflamação na pata ipsilateral e não se visualiza alteração, na pata contralateral. Esses efeitos são mediados pelos mecanismos do sistema nervoso periférico e central ao nível da medula espinhal e envolvem a liberação de vários mediadores inflamatórios, como glutamato excitatório de aminoácidos e neuropeptídeos de fibras C, incluindo

taquiquinina (CODERRE, 1993; CODERRE & YASHPAL, 1994; CODERRE & MELZACK, 1992; SAMAD *et al.*, 2001).



Figura 4: Superfície plantar direita. Local onde foi realizada a lesão podal (região central da pata)

Kitagawa *et al.* (2005) verificaram as alterações no Sistema Nervoso Central (SNC) induzidas por inflamação periférica com o avanço da idade. Foi comparado o comportamento, a inflamação periférica e as alterações na atividade dos neurônios nociceptivos da espinha dorsal entre os ratos idosos e adultos após a inflamação da pata traseira esquerda, através da injeção via subcutânea de 0,05 ml de Adjuvante Completo de Freund. O limiar de retirada da pata dos ratos adultos foi significativamente maior do que a dos ratos idosos, sugerindo que o comportamento dos ratos adultos foi mais fortemente afetado pela inflamação.

1.6.1.3 Uso de Formalina

Meert & Vermeirsch (2005) testaram os efeitos colaterais e eficácia analgésica de alguns opióides utilizados em contextos clínicos de ratos. Para avaliação da eficácia, dentre outros, foi desenvolvido o modelo de dor inflamatória induzida quimicamente por formalina.

O teste de formalina é um procedimento químico de nocicepção (DUBUISSON & DENNIS, 1977). Os ratos receberam uma única injeção de formaldeído (50µl, 1.75%) nas

hipodermes plantares da pele da pata traseira esquerda. Dentro de segundos os ratos começaram a recuar a pata rapidamente, onde esta é a resposta da fase I que é medida durante os primeiros 10 minutos. A seguinte fase II é medida durante 50 minutos e representa o estado mais tônico. Nas duas fases é observado comportamento de cambalear após formalina.

1.6.2 Contusão pulmonar

Os ratos têm sido utilizados como modelo de lesão pulmonar desde meados do século XIX. Estes animais têm sido preferidos nas investigações pulmonares devido à maior disponibilidade de provas moleculares e a um maior conhecimento do seu sistema imunológico em relação a animais de maior tamanho (IRVIN & BATES, 2003). Os modelos murinos têm sido amplamente utilizados em pesquisa (ALTEMEIER *et al.*, 2004; CHIUMELLO *et al.*, 1999; RICARD *et al.*, 2001) e conseguem reproduzir algumas características da lesão epitelial, resposta inflamatória aguda e alterações mecânicas.

Forças físicas que atuam sobre a parede torácica intacta, podem produzir uma variedade de lesões, incluindo pneumotórax, hemotórax, fraturas de costelas, contusão cardíaca, grande laceração em vasos e contusão pulmonar (SHEPARD, 1969).

A contusão pulmonar é um trauma comum que afeta pacientes vítimas de traumatismo em unidades de terapia intensiva. É a lesão mais frequente resultante de trauma torácico, que afeta 17-25% dos pacientes adultos com este diagnóstico (COHN, 1997). É um fator de risco independente para o desenvolvimento de lesão pulmonar aguda, síndrome do desconforto respiratório agudo, e pneumonia associada à ventilação (MILLER, 2001).

O quadro patológico da contusão pulmonar inclui ruptura dos alvéolos e vasos sanguíneos com hemorragia intersticial e alveolar, inflamação, aumento do shunt pulmonar e perda de complacência. A gravidade da lesão depende da quantidade de tecido pulmonar contundido. As lesões podem variar a partir de áreas de hemorragia clinicamente indetectáveis

até massiva consolidação com hemorragia de um ou de ambos os pulmões (SHEPARD, 1969; COHN, 1997).

A resposta inflamatória inata desencadeada por uma contusão pulmonar envolve o recrutamento de leucócitos do sangue, a ativação de macrófagos de tecidos, e na produção de uma série de diferentes mediadores, incluindo citocinas, quimocinas, radicais de oxigênio, metabolitos do ácido araquidônico e os componentes das cascatas do complemento e coagulação (RAGHAVENDRAN *et al.*, 2009).

Estudos que investigam a fisiopatologia e mecanismos celulares / moleculares de contusão pulmonar requerem o uso de modelos animais reproduzíveis significativos. Vários modelos de contusão pulmonar foram desenvolvidos, particularmente em animais grandes, como caninos, suínos e macacos. Embora esses modelos tenham aplicações específicas importantes, eles também têm limitações que podem incluir mortalidade frequente, indução de trauma torácico aberto, presença de traumatismo penetrante e contundente e / ou a existência de traumatismos cardíacos concomitantes substanciais. Outra desvantagem de modelos de grandes animais de contusão pulmonar para investigações mecanicistas é a falta de sondas moleculares e outros reagentes específicos para células e mediadores, que são muito mais amplamente disponíveis para animais pequenos, como camundongos e ratos. Estudos em espécies de pequenos animais também podem geralmente ser feitos com maior facilidade e menos custo em comparação com estudos de grandes animais. Atualmente, não existe um modelo com pequeno animal confiável e reprodutível para contusão pulmonar bilateral isolada, porém, resultados indicaram que este modelo com pequeno animal com tórax intacto seria útil em futuros estudos mecanicistas sobre a fisiopatologia e terapia da contusão pulmonar (RAGHAVENDRAN *et al.*, 2005).

1.6.2.1 Desenvolvimento da técnica

No estudo de Raghavendran *et al.* (2005), uma versão modificada de um modelo previamente descrito de contusão pulmonar bilateral foi utilizado, deixando cair um peso cilíndrico de alumínio oco (0,3 kg) através de um tubo vertical de aço inoxidável sobre uma plataforma Lexon apoiada no peito (tórax) do animal. A plataforma foi suspensa em guias de teflon para minimizar o atrito e facilitar a transferência de energia para o animal anestesiado. Uma característica chave do modelo foi um escudo de proteção precordial (Plexiglas), que foi anexado à superfície inferior da plataforma Lexon e diretamente em contato com o tórax. Este escudo protegeu o coração da contusão e dirigiu a energia de impacto para as regiões laterais do tórax. Com a marcação do apêndice xifóide, o escudo foi colocado inteiramente no tórax sem intrusão no pescoço ou abdômen (Figura 5).

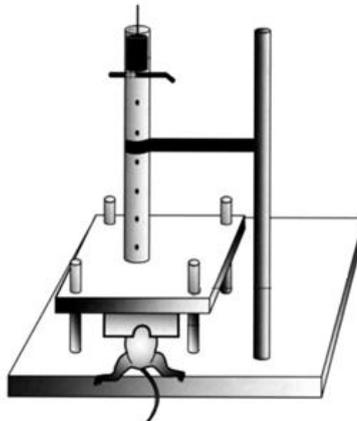


Figura 5: Esquemática de um modelo de contusão pulmonar bilateral isolada em rato. O animal anestesiado, foi posicionado em decúbito dorsal na base, o escudo protetor e a plataforma dispostos sobre o tórax do animal. O tubo vertical de aço inoxidável colocado sobre a plataforma permitiu com que o peso cilíndrico caísse sobre o tórax a partir do segundo furo do tubo como demonstrado na figura (RAGHAVENDRAN *et al.*, 2005)

As alturas para o peso cilíndrico oco em cima do tórax foram calculadas para gerar energias externas de impacto no tórax de 1,8, 2,0, 2,2, 2,45 e 2,7 J (RAGHAVENDRAN *et al.*, 2005), que correspondem as alturas no tubo vertical de aço inoxidável.

Uma melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos e dos processos celulares que ocorrem em lesão de contusão pulmonar isolada, poderiam melhorar significativamente o

diagnóstico, prognóstico e tratamento dessa condição tão importante (RAGHAVENDRAN *et al.*, 2005). E através desses modelos de contusão, o entendimento desses processos e mecanismos, pode ser adquirido.

2. JUSTIFICATIVA

O único método validado para a avaliação de dor em animais é a escala de expressão facial para ratos (SOTOCINAL *et al.*, 2011). Porém, apesar de ser uma ferramenta útil e confiável, já há dados na literatura que discutem a sua baixa sensibilidade (THOMAS *et al.*, 2016). Por isso, é necessário o desenvolvimento de outras ferramentas para a avaliação da dor em ratos em diferentes modelos experimentais. O método de nocicepção de Von Frey vem sendo utilizado em diversas publicações cujo objetivo principal é a avaliação de dor por lesão na região podal (YUE *et al.*, 2018) ou para a avaliação de hiperalgesia (SHAHID *et al.*, 2017). Mais recentemente, essa técnica foi proposta para ser realizada tanto na região plantar para a avaliação de dor no modelo de laminectomia (LU *et al.*, 2018), na região abdominal (região da lesão) para a avaliação de dor no modelo de pancreatite (LIAO *et al.*, 2018) e na região inguinal para avaliação da dor no modelo de cirurgia para reparação de hérnia inguinal (BREE *et al.*, 2015).

Tais publicações supracitadas serviram como impulsão para avaliação do método de nocicepção de Von Frey para ser utilizada como ferramenta de avaliação de dor no modelo experimental de contusão pulmonar, e para avaliação do qual a EEFR se mostrou pouco sensível.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar as metodologias mais eficazes para avaliação da dor em modelo de contusão pulmonar e lesão podal.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a sensibilidade da técnica de EEFR, Von Frey plantar e em tórax e semiflexível em tórax como ferramentas para avaliação da dor em modelo de contusão pulmonar e de lesão podal.
- Desenvolver um POP 1 para a utilização de Von Frey plantar para avaliação da dor em modelo de lesão podal no laboratório de fisiologia da respiração.
- Desenvolver um POP 2 para a utilização de ferramentas que se mostrarem eficazes na avaliação da dor em modelo de contusão pulmonar no laboratório de fisiologia da respiração.
- Comparar os resultados obtidos com método de Von Frey plantar, tórax e filamento semi-flexível no tórax antes e depois de treinamento do avaliador e refinamento da metodologia.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

No presente estudo, foram utilizados 48 ratos machos da linhagem Wistar, pesando entre 400 a 600 gramas, idade em torno de 12 semanas, oriundos do Biotério Central de Ratos, localizado no Centro de Ciências da Saúde (CCS) na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), estudo este aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) com número 127/16.

4.2 Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em três grupos experimentais: grupo controle (CTL), animais que não sofreram nenhum tipo de intervenção; grupo lesão podal (POD) por adjuvante completo de Freund, no qual foi produzida uma lesão crônica na região plantar direita; e o grupo constusão pulmonar (CP), no qual foi produzida uma contusão pulmonar.

O estudo foi dividido em dois experimentos: no experimento 1 foram utilizados 9 animais em cada grupo (total: 27 animais) e no experimento 2, foram utilizados 9 animais no grupo controle, 6 animais no grupo CP e 6 animais no grupo POD (total: 21 animais).

Os detalhes sobre a forma como foram realizadas as lesões estão descritos em procedimentos.

4.3 Divisão e etapas experimentais

4.3.1 Experimento 1

4.3.1.1 Treinamento prévio do avaliador

No treinamento do avaliador no experimento 1, foram utilizados 5 animais piloto e foram realizadas todas as etapas desse experimento, que detalhadas abaixo.

4.3.1.2 Aclimação no biotério

Com a chegada dos animais ao biotério do LFR oriundos do Biotério Central de Ratos, os mesmos foram aclimatados no biotério do Laboratório de Fisiologia da Respiração (LFR), localizado no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, CCS (UFRJ) por ao menos 5 a 7 dias, longe do local onde foram realizadas as avaliações. Foram mantidos em mini-isoladores com 48,3 cm de comprimento, 33,7 cm de largura, 21,4 cm de altura e área de 1154 cm² (Alesco, Rio de Janeiro, Brasil) dispostos em Racks Ventilados com água e ração ad-libitum, temperatura (22±2 °C) e umidade (50±10%) monitoradas e controle de iluminação com ciclos de 12 horas claro-escuro.

4.3.1.3 Marcação e tricotomia dos animais

Os ratos foram previamente anestesiados com Isoflurano (indução à 5% e manutenção à 2%), a numeração feita de 1 a 27 na base da cauda com caneta permanente preta e logo após era realizada a tricotomia (remoção dos pêlos) na região do apêndice xifóide com o auxílio de uma lâmina, água, sabão e gaze. Após as marcações e tricotomia, os animais eram acordados e recolocados em seus respectivos mini-isoladores. A marcação e a tricotomia dos animais foram realizadas durante a semana de aclimatação na estrutura de acrílico e filamentos do Von Frey ou conforme a necessidade para realização das lesões na semana experimental para posterior uso, ou seja, de forma variável.

4.3.1.4 Aclimatação na estrutura de acrílico e filamentos de Von frey

O processo de aclimatação consistia em manter cada animal na estrutura por 5 minutos durante 4 dias por diferentes pessoas e nesse período, recebia estímulos com os diferentes filamentos através dos orifícios da rede de arame até a região plantar direita e na região do tórax (apêndice xifóide) (Figura 6 e 7). O objetivo da aclimatação era adaptar o animal ao estímulo, a presença do avaliador e da haste do aparelho e ao ambiente da estrutura de acrílico aonde seria mantido durante os testes. Os animais que demonstravam sinais de estresse e agitação após os 4 dias de aclimatação não eram incluídos no estudo e seguiam em período de aclimatação por alguns dias extras para depois serem utilizados para a coleta de dados.

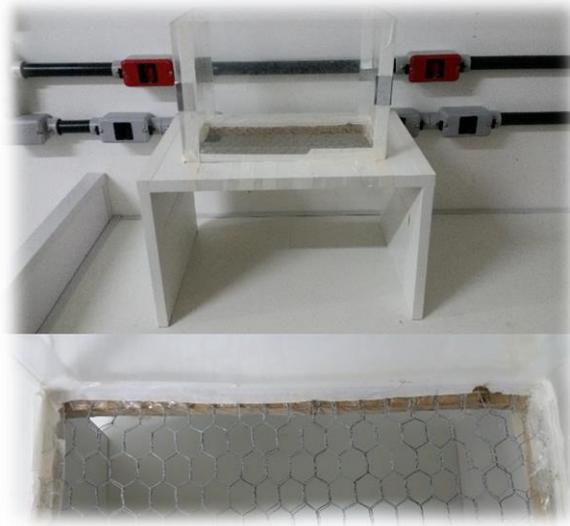


Figura 6: Estrutura de acrílico. Elaborado para a manutenção do rato para o teste de Von Frey e em detalhe a base aramada sobre a qual o animal fica apoiado

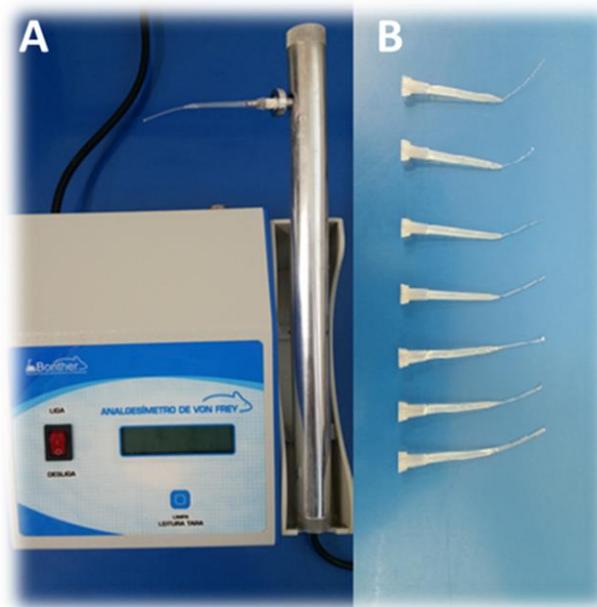


Figura 7: A - Analgesímetro de Von Frey / B - Filamentos utilizados no analgesímetro

4.3.1.5 Coleta de dados basais

Os valores basais foram coletados entre 1 e 3 dias antes da realização da lesão. Para a coleta dos valores basais, os animais já aclimatados e marcados, eram filmados por 2 minutos individualmente em uma gaiola aberta de mini-isolador, em seguida, era alocado na estrutura de acrílico durante 15 minutos para aclimação e durante os 2 minutos, foi realizada a avaliação pela escala de expressão facial para ratos (EEFR). Passados os 15 minutos, era iniciada a avaliação pelo método Von Frey (aparelho analgesímetro digital), primeiro realizado na região plantar, técnica mais comumente descrita em literatura, e em seguida realizado no apêndice xifoide (local da lesão no grupo contusão pulmonar). Em seguida, era feito um estímulo com um filamento único semi-flexível na região do tórax. Todos os tempos foram controlados por um cronômetro.

4.3.1.6 Avaliação da dor 1 hora e 24 horas pós-lesão (avaliação cega)

No dia em que ocorriam as lesões, um dos procedimentos de lesão era realizado (o grupo de lesões em cada dia era aleatório). Os animais no momento pós lesão eram colocados em microisoladores individualmente para que não ocorresse a interferência do fator estresse. Eram também filmados por 2 minutos individualmente em uma gaiola aberta de mini-isolador, em seguida, era alocado na estrutura de acrílico durante 15 minutos para aclimação e durante os 2 minutos, foi realizada a avaliação pela escala de expressão facial para ratos (EEFR). Passados os 15 minutos, era iniciada a avaliação pelo método Von Frey (aparelho analgesímetro digital), primeiro realizado na região plantar, técnica mais comumente descrita em literatura, e em seguida realizado no apêndice xifoide (local da lesão no grupo contusão pulmonar). Em seguida, era feito um estímulo com um filamento único semi-flexível na região do tórax.

Terminada a coleta de dados 24h pós lesão, os animais foram anestesiados com Isoflurano a 5% e eutanasiados por exsanguinação pelo sistema porta-hepático.

Todos os testes realizados com o analgesímetro de Von Frey ou com filamento semiflexível e avaliação da escala de expressão facial para ratos (EEFR) foram realizados em uma sala do laboratório separada da estrutura principal, sendo um ambiente com menor movimentação de pessoas e silencioso, minimizando assim, qualquer interferência ambiental externa, possível geradora de estresse.

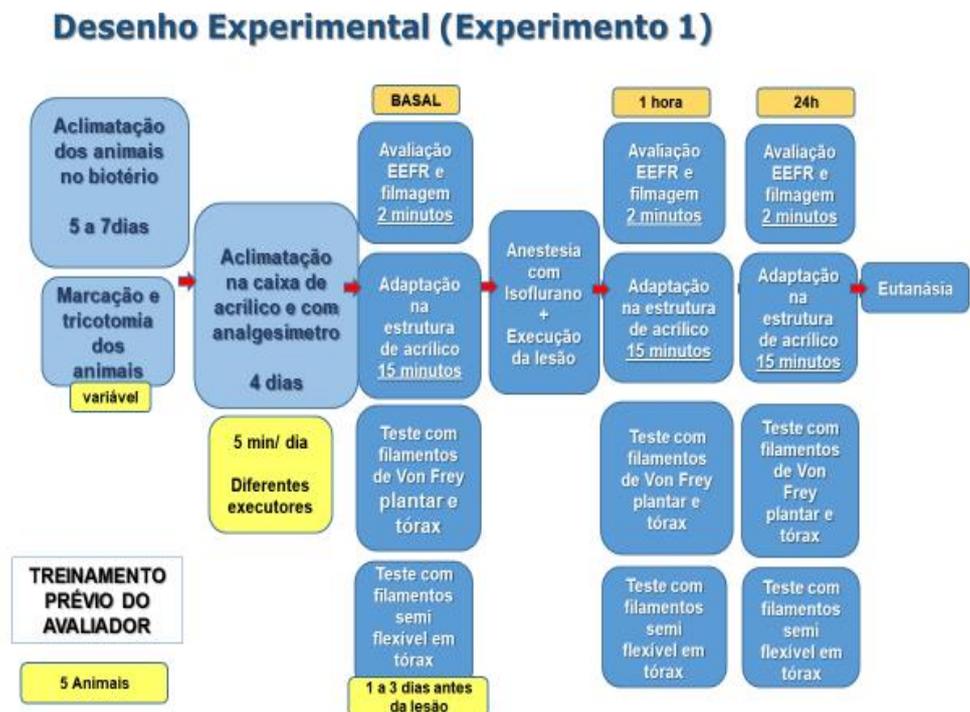


Figura 8: Desenho experimental (experimento 1). Exemplifica todo o processo realizado em materiais e métodos em forma de esquema, onde os pontos diferenciais deste experimento está descrito em amarelo

4.3.2 Experimento 2

Devido aos resultados obtidos no experimento 1 que não condizem com o que é descrito em literatura e também, como os autores não descrevem detalhadamente a metodologia, houve um refinamento em alguns itens metodológicos do experimento 1 que poderiam ser possíveis fatores de estresse aos animais levando à interferências nos resultados, então, houveram algumas diferenças que serão citadas a seguir.

O experimento 2 incorpora como diferenças, cuidados extras com relação a metodologia realizada no experimento 1, como: treinamento prévio mais longo do avaliador com a realização de testes piloto em cerca de 30 animais (5 animais piloto previamente ao experimento 1 com mais 27 animais utilizados no experimento 1 que serviram como aprendizado, já que os resultados não foram de acordo com o que é relatado em literatura) já com o domínio completo das técnicas, as aclimações dos animais foram realizadas por quatro dias, com duração de 10 minutos diários, sempre pela mesma pessoa que seria responsável pelas avaliações posteriores, os animais foram mantidos em um biotério no mesmo local onde eram realizadas as aclimações e avaliações dos mesmos e eram transportados apenas para a realização das lesões e os valores basais foram coletados sempre no mesmo dia da realização das lesões. As marcações ocorreram uma semana antes das aclimações no Von Frey e estrutura de acrílico, ou seja, foram pouco manipulados durante a semana experimental.

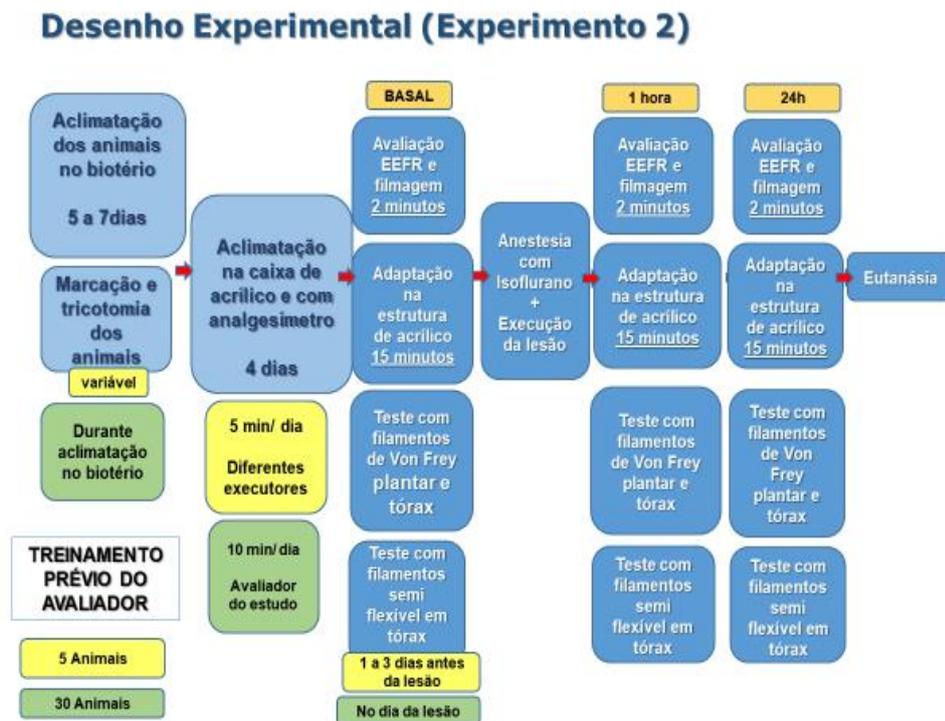


Figura 9: Desenho experimental (experimento 2). Exemplifica todo o processo realizado em materiais e métodos em forma de esquema, onde os pontos diferenciais deste experimento estão descritos em verde comparando com o método descrito no experimento 1 representado em amarelo.

4.4 Procedimentos Experimentais

4.4.1 Execução das lesões

As lesões ocorreram no Laboratório de Fisiologia da Respiração, localizado no IBCCF) e por uma pessoa diferente da responsável pela avaliação da dor (avaliador cego, não sabe qual lesão o animal possui e/ou qual grupo o mesmo pertence), onde seis animais por semana eram lesionados com intervalo de 1 hora e 30 minutos entre as lesões, para que o avaliador pudesse ter o tempo necessário para análise sem que as avaliações seguintes fossem prejudicadas. O indivíduo incumbido pela lesão, além de executá-la, anotava na folha da avaliação da dor, o horário da lesão e o número do animal para que fosse entregue ao avaliador junto com o animal lesado.

Todos os animais dos três grupos experimentais (CTL, POD e CP) foram anestesiados com isoflurano (indução à 5% e manutenção à 2%), testando o reflexo da pata antes iniciar qualquer procedimento. Nos 3 grupos, realizou-se a antissepsia da região plantar direita com gaze embebida com álcool 70%, pois no grupo controle e no grupo contusão pulmonar, os animais receberam a administração subcutânea na região plantar direita com seringa e agulha de insulina contendo 0,02 ml de solução salina, bem como realizado no grupo POD, mas com a inoculação do Adjuvante Completo de Freund. E nos grupos controle e lesão podal os animais foram posicionados na plataforma anestesiados por alguns minutos conforme realizado no grupo CP para a realização da contusão. Assim, em todos os grupos os animais passaram pela mesma sequência de procedimentos.

4.4.1.1 Lesão podal

Os animais foram anestesiados com isoflurano (indução à 5% e manutenção à 2%), testando o reflexo da pata antes iniciar qualquer procedimento, após a anestesia, realizou-se a antissepsia da região plantar direita com gaze embebida com álcool 70% e a lesão podal foi realizada através da administração subcutânea na região plantar direita com seringa e agulha

de insulina contendo 0,02 ml de Adjuvante Completo de Freund (composto por *Mycobacterium tuberculosis*; Sigma, St. Louis, MO, USA) (CAO *et al.*, 1998; FERREIRA *et al.*, 2001), após a inoculação, a região era comprimida pela mesma gaze por alguns segundos para que o líquido introduzido não extravazasse. Após o despertar, os animais foram mantidos em caixas individuais com identificação (número) do animal como citado no desenho experimental.

4.4.1.2 Contusão pulmonar

Os animais foram anestesiados com isoflurano (indução à 5% e manutenção à 2%), testando o reflexo da pata antes iniciar qualquer procedimento, após a anestesia, a contusão pulmonar foi induzida por queda de um peso de alumínio cilíndrico oco (0,3 kg) por meio de um tubo de aço inoxidável vertical de uma altura correspondente ao segundo furo (de cima para baixo) presente no mesmo, sobre uma plataforma de acrílico repousando sobre o tórax do animal (apêndice xifóide). A plataforma foi suspensa em guias de teflon para minimizar a fricção e facilitar a transferência de energia para o animal anestesiado. Uma característica fundamental do modelo foi um escudo protetor precordial (Plexiglas), que foi anexado à superfície inferior da plataforma de acrílico e diretamente em contato com o peito. Este escudo protegia o coração de contusão, e dirigiu a energia de impacto para as laterais do tórax. O escudo impediu intrusão no pescoço ou no abdômen. (RAGHAVENDRAN, 2005). Após o despertar, os animais foram mantidos em caixas individuais com identificação (número) do animal como dito anteriormente.

4.4.2 Avaliação pela Escala de Expressão Facial para Ratos (EEFR)

A avaliação foi realizada através da filmagem por 2 minutos (Figura 10) no momento da coleta dos valores basais como também, na avaliação da dor 1 e 24 horas pós lesão, individualmente de cada animal em um mini-isolador aberto sem o aramado. Os parâmetros de avaliação considerados na EEFR foram: compressão orbital, achatamento do nariz e bochechas,

alterações nas orelhas e alterações de vibrissas (SOTOCINAL *et al.*, 2011). E foram consideradas três pontuações para cada parâmetro (“unidades de ação” facial) citado acima: 0 = não há alteração aparente, 1 = moderadamente visível, 2 = alteração pronunciada. A elevação da pontuação está relacionada com maior expressão de dor.



Figura 10: Exemplificação da filmagem por 2 minutos com o animal dentro do microisolador aberto

A pontuação máxima que pode ser obtida na avaliação pela escala EEFR é de 8 pontos, indicando dor severa. Uma limitação dessa escala é que não foi descrita na publicação de Sotocinal *et al.* (2011) a pontuação máxima para resgate analgésico ou para indicação de eutanásia precoce.

Durante o estudo experimental não foi realizada a administração de analgésicos, já que o objetivo é a avaliação da dor de diferentes modelos experimentais e foi estipulado que se em qualquer momento que a escala facial apresentasse uma pontuação igual ou superior a 5 pontos, o animal seria retirado do estudo e sofreria eutanásia imediatamente.

4.4.3 Avaliação Nociceptiva com Von Frey e filamento semi-flexível.

4.4.3.1 Padronização do teste e escolha dos filamentos de Von Frey

Ao começar os testes piloto, foi verificado que os valores reais do teste nociceptivo de Von Frey para cada filamento eram em sua maioria muito distintos do que indica o fabricante. Foi então realizada uma sequência de 10 estímulos de 7 segundos com cada um dos 15 filamentos para padronização da força real executada por eles.

Foram escolhidos 7 filamentos dentre os 15 disponíveis para a execução do experimento, foram descartados os que eram muito semelhantes com o anterior. Foram selecionados os filamentos: 2, 4, 8, 9, 10, 13 e 15, que determinam a pressão média em gramas-força (gf) com valores, respectivos: 0,94/ 2,61/ 3,97/ 7,91/ 18,62/ 41,78/ 68,02 gf.

4.4.3.2 Realização do teste nociceptivo de Von Frey

O estímulo gerado pelo analgesímetro de Von Frey (Bonther, São Paulo, Brasil) acoplado ao filamento foi aplicado no centro da região plantar direita (Figura 11) para estudar o limiar de retirada. Em cada filamento testado, 3 retiradas ao estímulo eram o critério para determinar o limiar de retirada da pata (KAUPILLA, 1996). No tórax, o filamento foi aplicado perpendicularmente à esquerda ou à direita do local da lesão (apêndice xifóide) com força suficiente para provocar leve encurvamento do filamento, sendo de acordo com Bree *et al.* (2015) que cita a aplicação do filamento da forma supracitada, mas na região inguinal, perpendicular a ferida cirúrgica.

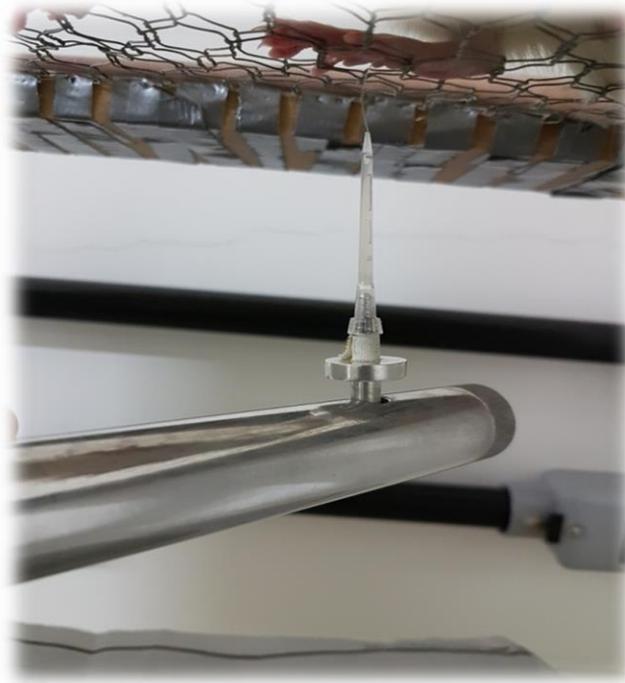


Figura 11: Estímulo com o filamento de Von Frey aplicado na região plantar direita

Antes de iniciar os testes foram realizados períodos de adaptação de 15 minutos (TIWARI, 2011; MANNELLI *et al.*, 2017; FUKUI *et al.*, 2017). Após os 15 minutos, os ratos já estavam bastante tranquilos, parecendo o suficiente para a aclimatação. As provas somente foram iniciadas quando os animais apresentaram-se calmos, terminada a exploração do ambiente e sem estarem deitados sobre a pata (CUNHA *et al.*, 2004).

Os valores de estimulação selecionados variam de 0,94 a 68,02 gf de acordo com os utilizados por Gunduz *et al* (2011) e Mannelli *et al.* (2017) que citam de 0 a 50 gf, conforme Safakhah *et al.* (2017) que apontam de 2 a 60 gf e conforme também Seto *et al.* (2017) que mencionam de 1 a 60 gf. O tempo de estimulação utilizado foi de 7 segundos (ZHAO *et al.*, 2004).

O número de estímulos realizados, foi no mínimo de 3 e até completar 3 estímulos com a mesma resposta consecutiva (KAUPILLA, 1996), com intervalos de 5 segundos entre os

estímulos (TIWARI, 2011; MANNELLI *et al.*, 2017; GENARI *et al.*, 2017; SAFAKHAH *et al.*, 2017), sendo no máximo 5 estímulos (BREE *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2017). Em caso de 3 respostas positivas ou negativas, passou-se para a próxima medida ou para o próximo filamento respectivamente. Onde 3 respostas positivas em um único filamento, indicavam a primeira medida e o início para a determinação da próxima, totalizando 3 medidas com intervalo de 3 minutos entre as medidas. A média dos 3 valores das pressões obtidas, gerou o limiar de cada medida (ZHAO *et al.*, 2009; LIOU *et al.*, 2011). A média dos 3 limiares, foi considerada como o limiar de alodinia mecânica.

Foram consideradas respostas positivas ao estímulo na região plantar: retirada da pata (CABAÑERO, 2009; JINGE *et al.*, 2017) e flexão da pata (TIWARI, 2011). No tórax, as respostas positivas foram: esquivar-se, lambar-se, retirada da área onde ocorreu a aplicação do filamento ou imediatamente após a aplicação do mesmo.

Os filamentos foram aplicados de acordo com a sequência estabelecida acima, por forças crescentes, de menores para maiores pressões (SAFAKHAH *et al.*, 2017) primeiro na região plantar e depois na região do tórax. Quando a resposta a um filamento era negativa, era realizado um novo estímulo com o filamento seguinte, que determinaria uma pressão um pouco mais alta (CABAÑERO, 2009). Caso houvesse uma resposta positiva, esse era considerado o limiar de retirada para aquela medida daquele animal.

4.4.3.2 Realização do teste nociceptivo de Von Frey

A prova do filamento único semi-flexível foi realizada apenas na região do tórax, na mesma região em que foram realizados os estímulos com Von Frey e foram coletadas 3 medidas com um único estímulo cada e posterior média das 3 pressões adquiridas para obtenção do limiar, com intervalo de 3 minutos entre as medidas.

4.4.4 Eutanásia

Então, terminada a avaliação da dor de 24h, os animais foram anestesiados com isoflurano à 5% e realizada a eutanásia por exsanguinação pelo sistema porta hepático com o auxílio de uma tesoura, pinça e gaze, em um local distinto das avaliações por conta do odor de sangue (fator estressante para os outros animais), comumente executada no Laboratório de Fisiologia da Respiração (LFR). A carcaça foi devidamente descartada em um saco branco leitoso especificado como sendo de risco biológico e identificado com as iniciais do laboratório (LFR) e posteriormente congelada.

4.5 Planejamento Estatístico

O cálculo amostral considerou um poder de 80%, médias de 70 e 40% estimados através de dados da literatura. Os dados apresentaram distribuição normal pelo teste de Komogorov- Smirnof, então foi realizado o teste de ANOVA de duas vias e pos-hoc de Bonferoni. O nível de significancia será de 95% ($p \leq 0,05$). Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão. Os testes foram realizados pelo software Prisma 5.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Escala de Expressão Facial

Nos experimentos 1 e 2, após os processos de aclimação no biotério, aclimação na caixa de acrílico e filamentos do Von Frey, nos momentos basal, 1 hora e 24 horas pós lesão, os ratos foram filmados por 2 minutos e durante essa filmagem, foram observadas as unidades de ação facial da escala de expressão facial para ratos e determinados os valores dentro de uma escala de 0 a 2 para cada expressão facial e com a soma desses valores, obteve-se o escore da dor.

Em nenhum dos dois experimentos foi observada diferença estatística nos dados da escala de expressão fácil nos três grupos avaliados no experimento 1 ou no experimento 2. Os dados referentes à soma de pontos de cada animal (separados por grupo) está descrito na tabela.

Tabela 1: Resultados da pontuação total obtida pela avaliação da escala de expressão facial em ratos. No experimento 1, utilizando 27 animais (9 animais por grupo) e experimento 2, utilizando 21 animais (9 animais no grupo controle e 6 animais cada nos demais dois grupos (contusão pulmonar e lesão podal)), descrita em média \pm desvio padrão

	Controle	Contusão pulmonar	Lesão podal
Experimento 1			
Basal	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
1h	0 \pm 1	0 \pm 0	1 \pm 2
24h	1 \pm 1	0 \pm 0	1 \pm 2
Experimento 2			
Basal	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
1h	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
24h	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
Basal	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0

5.2 Testes Nociceptivos

5.2.1 Experimento 1

No experimento 1, após os processos de aclimação no biotério, aclimação na caixa de acrílico e filamentos do Von Frey, nos momentos basal, 1 hora e 24 horas pós lesão, os ratos foram filmados por 2 minutos, aclimatados por 15 minutos na estrutura de acrílico, e em seguida, iniciou-se o teste nociceptivo de Von Frey plantar, Von Frey em tórax e o filamento único semi-flexível.

Os resultados encontrados através da avaliação da nociceção pelo método Von Frey plantar no experimento 1 demonstram redução da força necessária para resposta positiva em todos os grupos 1h e 24h após ao momento de lesão ou apenas de anestesia (grupo controle) quando comparado a força necessária para resposta de retirada da pata no momento basal (Figura 12). Já que o grupo controle apresentou resposta semelhante aos grupos com lesão, não se tratou de um experimento útil para avaliar a eficácia da técnica. O mesmo resultado foi encontrado através da avaliação da nociceção pelo método Von Frey em tórax e no estímulo pelo filamento semi flexível no experimento 1 (Figura 13 e 14).

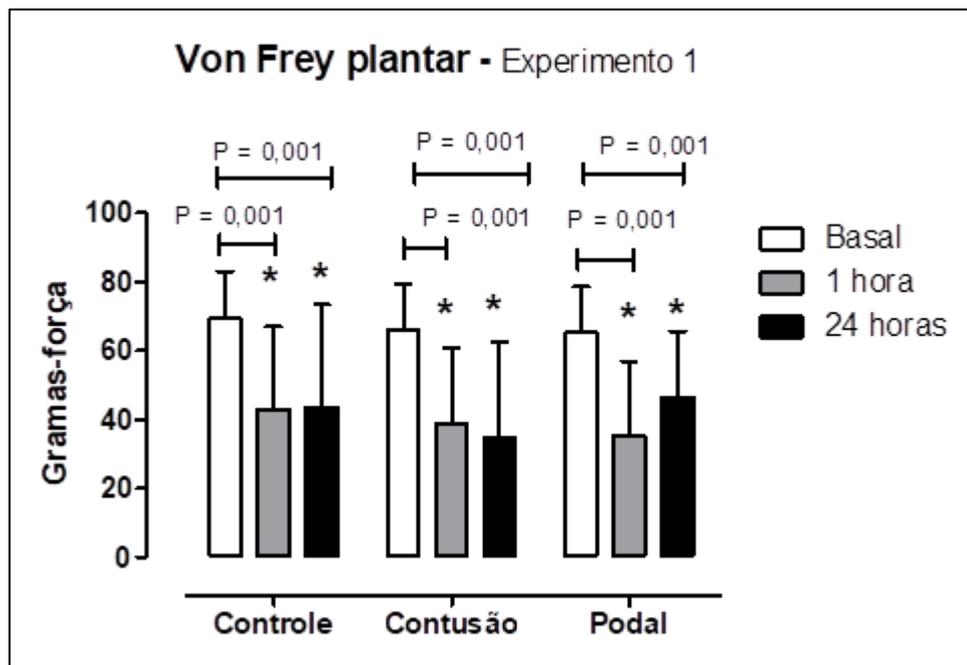


Figura 12: Gráfico dos dados obtidos a partir da avaliação pelo analgesímetro de Von Frey frente ao estímulo realizado na região plantar. Dados basais, após 1h e após 24h expressos em gramas de força para os grupos controle, contusão pulmonar e lesão podal do experimento 1

* representa diferença estatisticamente significativa frente ao respectivo momento basal

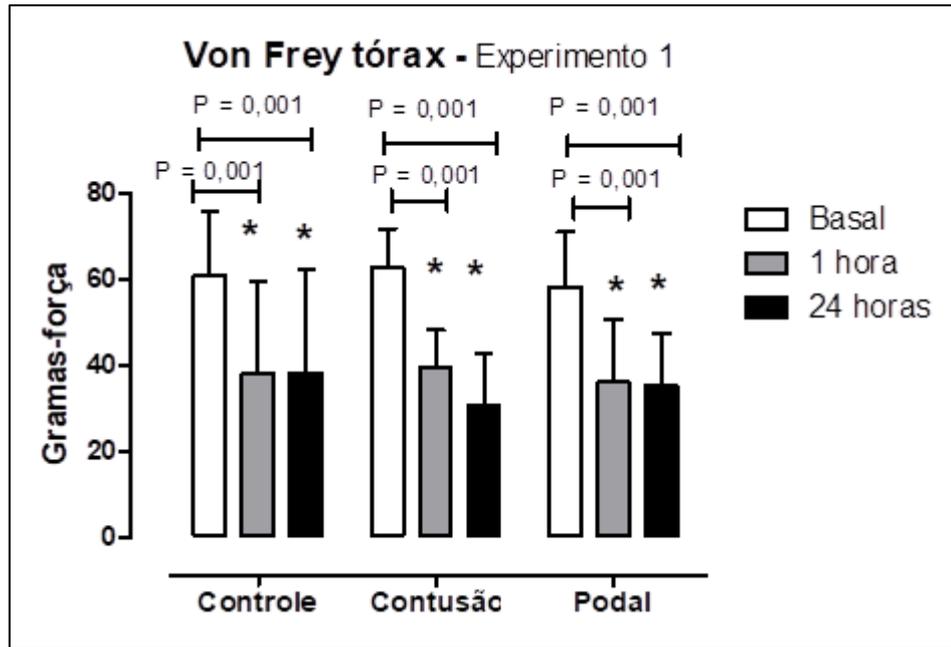


Figura 13: Gráfico dos dados obtidos a partir da avaliação pelo analgesímetro de Von Frey frente ao estímulo realizado na região do apêndice xifóide. Dados basais, após 1h e após 24h expressos em gramas de força para os grupos controle, contusão pulmonar e lesão podal em experimento 1

* representa diferença estatisticamente significativa frente ao respectivo momento basal

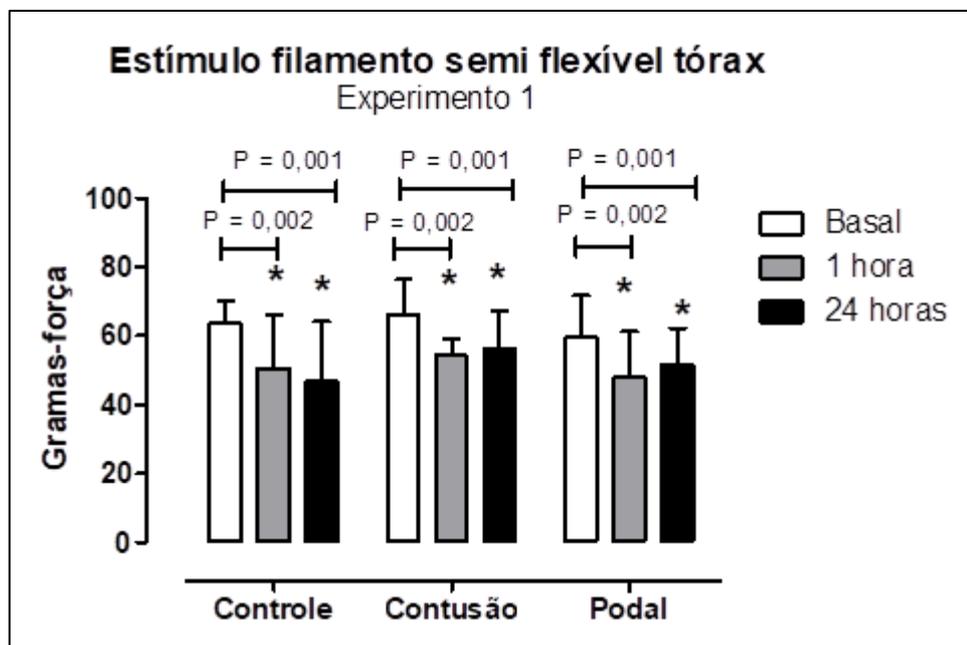


Figura 14: Gráfico dos dados obtidos a partir da avaliação pelo analgesímetro com estímulo realizado com filamento semi-flexível na região do apêndice xifóide. Dados basais, após 1h e após 24h expressos em gramas de força para os grupos controle, contusão pulmonar e lesão podal em experimento 1

* representa diferença estatisticamente significativa frente ao respectivo momento basal

5.2.2 Experimento 2

No experimento 2, após os processos de aclimação no biotério, aclimação na caixa de acrílico e filamentos do Von Frey, nos momentos basal, 1 hora e 24 horas pós lesão, os ratos foram filmados por 2 minutos, aclimatados por 15 minutos na estrutura de acrílico, em seguida, iniciou-se o teste nociceptivo de Von Frey plantar, Von Frey em tórax e o filamento único semi-flexível. Destaque para o refinamento da metodologia neste experimento 2, a partir dos resultados do experimento 1.

Avaliando os resultados encontrados através da avaliação da nocicepção pelo método Von Frey plantar no experimento 2, apenas no grupo que sofreu lesão podal foi observada redução do limiar de resposta ao estímulo nociceptivo (Figura 15). Pela resposta do experimento 2, o teste de Von Frey plantar se apresenta como uma ferramenta eficaz para avaliação de aumento da nocicepção frente a um estímulo de lesão podal, porém não frente a um estímulo de contusão pulmonar. Não foi observada redução do limiar de resposta ao estímulo nociceptivo em nenhum dos grupos (Figura 16), assim, o teste de Von Frey em tórax não parece ser uma ferramenta eficaz para avaliação de aumento da nocicepção frente a um estímulo de lesão podal ou ao estímulo de contusão pulmonar. Nos resultados encontrados através da avaliação da nocicepção pelo estímulo por filamento semi-flexível com analgesímetro no experimento 2, foi observada redução do limiar de resposta ao estímulo nociceptivo apenas no grupo de contusão pulmonar 24h após a lesão (Figura 17). O teste de pelo estímulo por filamento semi-flexível com analgesímetro em tórax não parece ser uma ferramenta eficaz para avaliação de aumento da nocicepção frente a um estímulo de lesão podal, e poderia ser útil avaliação de aumento da nocicepção contusão pulmonar.

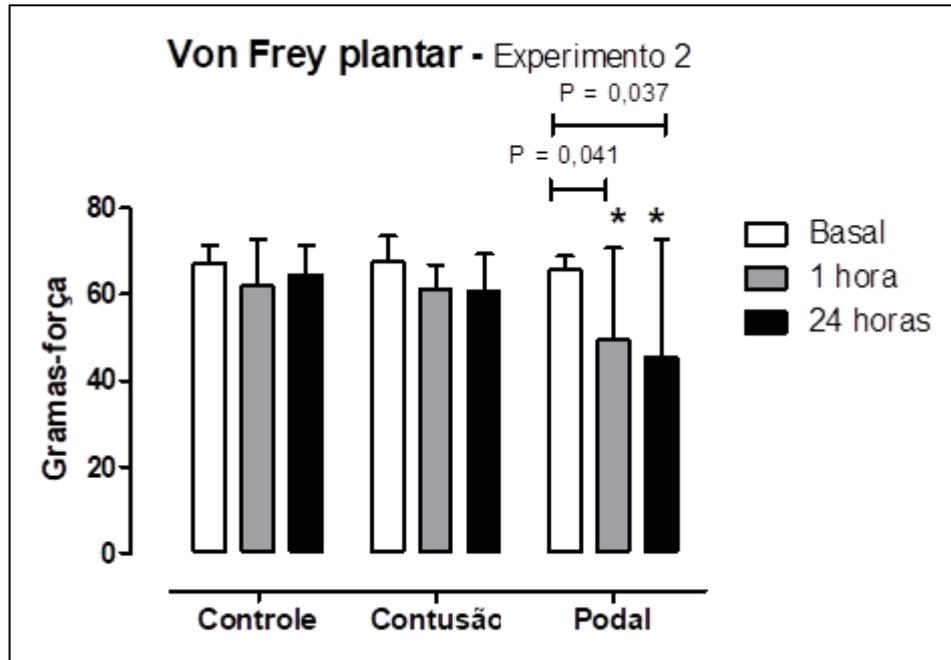


Figura 15: Gráfico dos dados obtidos a partir da avaliação pelo analgesímetro de Von Frey frente ao estímulo realizado na região plantar. Dados basais, após 1h e após 24h expressos em gramas de força para os grupos controle, contusão pulmonar e lesão podal no experimento 2.

* representa diferença estatisticamente significativa frente ao respectivo momento basal

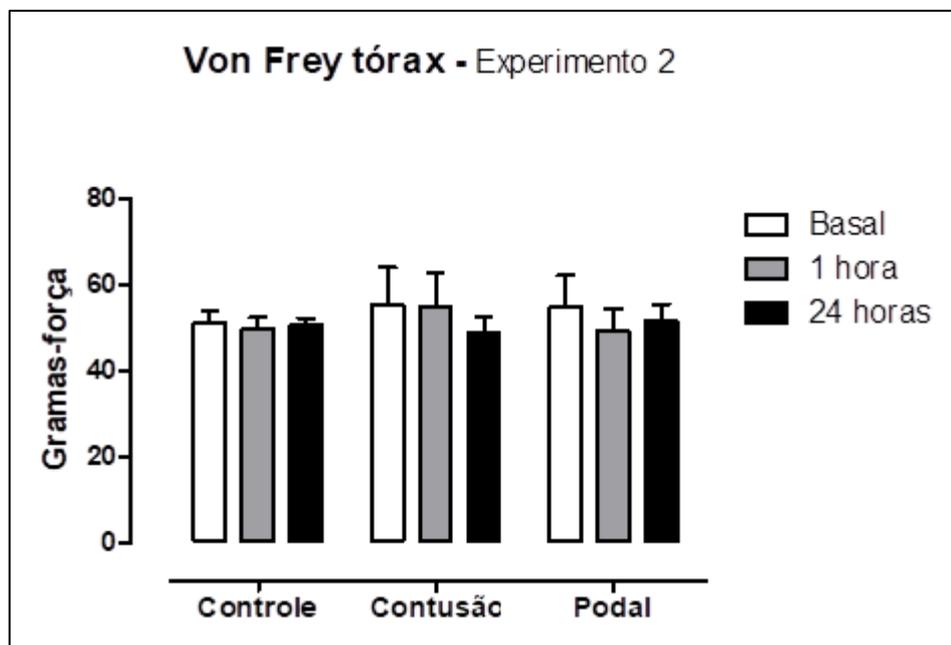


Figura 16: Gráfico dos dados obtidos a partir da avaliação pelo analgesímetro de Von Frey frente ao estímulo realizado na região do apêndice xifóide. Dados basais, após 1h e após 24h expressos em gramas de força para os grupos controle, contusão pulmonar e lesão podal em experimento 2

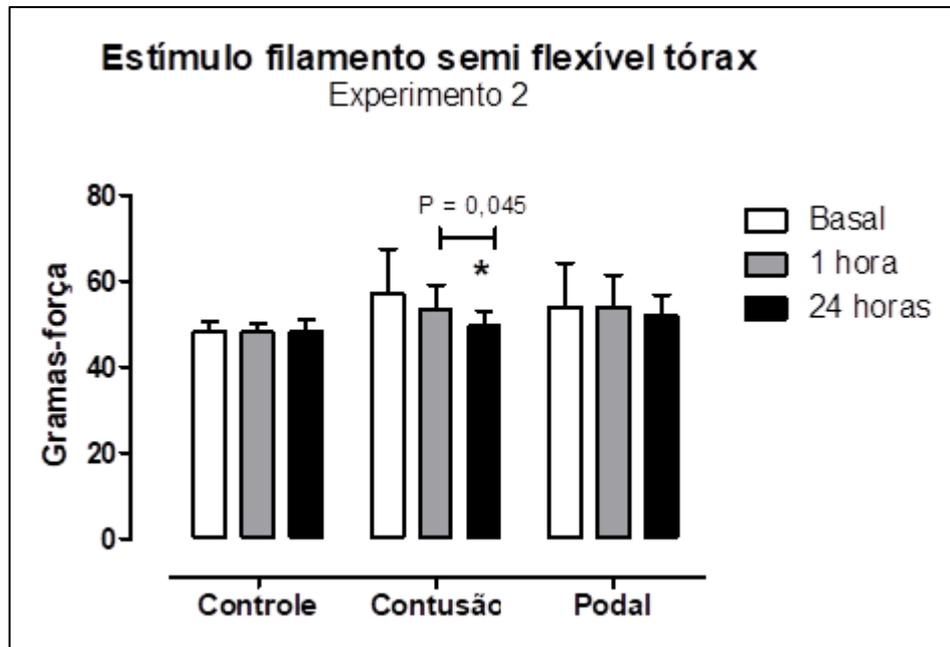


Figura 17: Gráfico dos dados obtidos a partir da avaliação pelo analgesímetro com estímulo realizado com filamento semi-flexível na região do apêndice xifóide. Dados basais, após 1h e após 24h expressos em gramas de força para os grupos controle, contusão pulmonar e lesão podal no experimento 2

* representa diferença estatisticamente significativa frente ao respectivo momento basal

Na experimentação animal, o tratamento da dor se torna importante fator de refinamento da pesquisa. Já foi comprovado que este traz benefícios não apenas para os animais, como também para os resultados de pesquisas (BULGER, 1987). Ainda nos dias atuais, há muita negligência no tratamento da dor de animais utilizados para este fim. O refinamento dos procedimentos de pesquisa envolvendo animais depende, em parte, de vias efetivas para prevenir e aliviar a dor que requer métodos eficazes e confiáveis para detectar e quantificar a mesma (ROUGHAN & FLECKNELL, 2003).

No nosso trabalho a EEFR não se mostrou sensível o suficiente para a detecção de dor em ratos que sofreram contusão pulmonar ou lesão podal, esse resultado corroborou com um dos fatores impulsionadores do trabalho, que foi essa mesma percepção durante a avaliação de

dor em um estudo do laboratório de fisiologia da respiração que utilizou o modelo de lesão por contusão pulmonar. Outras limitações dessa escala já foram citadas previamente por outros autores. Thomas *et al.* (2016) concluíram que, apesar da EEFR apresentar certas vantagens frente a avaliação de pontuação de comportamentos compostos de dor, a morfina pode afetar a expressão facial de ratos sem dor e influenciar o uso da EEFR em ratos medicados com opioides. Em ratos submetidos à dor cirúrgica aguda, esperavam-se escores do EEFR em ratos livres de dor e opióides fossem menores do que os observados e similares entre os grupos de tratamento (SOTOCINAL *et al.*, 2011). Importante, diferenças significativas foram detectadas entre os grupos de tratamento no início do estudo durante as duas fases do estudo. Esta inconsistência importante existia apesar da excelente confiabilidade global entre avaliadores. Valores basais da escala facial em camundongos mostraram diferenças entre cepas, sexo e métodos usados para a pontuação das unidades de ação facial (pontuação retrospectiva vs. prospectiva) (MILLER *et al.*, 2015)

De acordo com os resultados obtidos no experimento 1, as respostas foram discrepantes das encontradas por autores que utilizaram o método Von Frey plantar em modelos de lesão podal (ZHU *et al.*; 2006; BRENNAN *et al.*, 1996; ZHU *et al.*, 2005). O uso do teste de Von Frey plantar com modelo de lesão podal pelo próprio reagente de Freund obtiveram como resultado redução da força de estimulação necessária para retirada da pata em animais com lesão e manutenção do limiar basal nos animais controle (WU *et al.*, 2017 ; YUE *et al.*, 2018), enquanto no experimento 1 observou-se redução do limiar de retirada no grupo controle, que deveria ser nosso controle negativo; no grupo com lesão podal, que seria nosso controle positivo, e também no grupo de contusão pulmonar. Assim, dado o comportamento do controle positivo a metodologia utilizada para a realização do teste não parecia ser eficaz para a obtenção de dados confiáveis. Devido a avaliação de que outros fatores da metodologia poderiam estar influenciando nos resultados, apesar da metodologia do experimento 1 ter sido baseada em detalhes

descritos em literatura, foi elaborado o experimento 2, considerando alguns pontos de refinamento para adequação do POP proposto para que os dados descritos em literatura pudessem ser reproduzidos e o uso do Von Frey plantar como ferramenta de avaliação nociceptiva em modelo de contusão pulmonar pudesse ser avaliado. Apesar de não haverem dados prévios na literatura para descrever a resposta do grupo controle e grupo com lesão podal frente ao estímulo pela técnica de Von Frey em tórax e por estímulo por filamento semi flexível, era esperado que no grupo controle não houvesse redução de limiar de resposta frente ao grupo basal, porém houve. Então, também para estes estímulos propôs-se um refinamento da técnica a ser definida no procedimento operacional padrão e testada.

Como citado anteriormente, muitos artigos já foram publicados utilizando a técnica de Von Frey, porém os detalhes de metodologia com relação a tempo de treinamento prévio, tempo de aclimação, manejo dos animais, em geral não são descritos de forma detalhada (MANNELLI *et al.*, 2017; GENARI *et al.*, 2017; SAFAKHAH *et al.*, 2017; FUKUI *et al.*, 2017; JINGE *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2017), gerando dificuldade no momento de traçar o desenho experimental. Cabe ressaltar que de acordo com alguns estudos que discutem a crise da reprodutibilidade na pesquisa, dentre as causas citadas para esse problema, a falta de detalhamento da metodologia utilizada em diversas áreas de pesquisa figura como uma das principais causas de tornar-se difícil ou impossível a reprodução dos resultados (VASILEVSKY *et al.*, 2013). Além disso, cabe ressaltar que este foi o primeiro trabalho realizado no Laboratório de Fisiologia da Respiração com as técnicas de Von Frey plantar, de tórax ou com estimulação por filamento semi-flexível, sendo assim, os detalhes da metodologia tiveram que ser desenvolvidos nesse estudo, sendo por isso um dos objetivos o desenvolvimento do POP (APÊNDICE 1) para a avaliação de limiar nociceptivo para lesão podal por reagente de Freund e outro para a avaliação de redução de limiar nociceptivo em modelo de contusão pulmonar (APÊNDICE 2).

Já que angústia e a dor do animal podem introduzir variáveis na pesquisa, por alteração da fisiologia e do comportamento normal (ROLLIN, 2009; FESTING & ALTMAN, 2002; NEMZEK *et al.*, 2004), devemos considerar que no presente estudo em que se investiga a dor, a condição de estresse pode ser um fator indutor de variabilidade de resposta e determinação de falsos-positivos nos testes de avaliação de dor propostos. Alguns detalhes da metodologia utilizada no experimento 1 foram repensados no experimento 2, por terem sido considerados como possíveis indutores de estresse: 1) O tempo de aclimatação dos animais na estrutura de acrílico durante os dias de aclimatação prévios ao início do estudo; 2) a aclimatação dos animais não ter sido feita pela mesma pessoa que faria as avaliações durante o estudo; 3) Redução de transporte dos animais e cuidados com o manejo dos animais nos dias prévios e durante os dias de experimento 4) Padronização do momento de marcação dos animais e coleta de valores basais. Considera-se que tais mudanças contribuíram para minimização do estresse e consequente eliminação de resultados falso-positivos no experimento 2. Todos esses detalhes metodológicos foram descritos nos POPs resultantes desse estudo (APÊNDICE 1 e 2).

Um outro fator considerado como possível causador da divergência de resultados com os descritos previamente em literatura foi a falta de treinamento prévio do avaliador. Na literatura é descrito necessidade de treinamento prévio antes de um avaliador executar um estudo utilizando o analgesímetro de Von Frey, porém, não é descrita uma padronização do tempo necessário de treinamento. No estudo 1, depois do avaliador já estar familiarizado com a técnica, realizou treinamento com 5 animais piloto com a técnica completa. Para o estudo 2, todos os animais do estudo 1, além dos pilotos que haviam sido realizados serviram como treinamento para o avaliador. Assim, descreveu-se em ambos os POPs (APÊNDICE 1 e 2) construídos no final do estudo a necessidade de intenso treinamento prévio para a realização adequada da técnica, segundo nossos resultados, treinamento com ao menos 30 animais.

Considerando que o experimento 2 foi o que teve metodologia válida para definir a eficácia das técnicas propostas como ferramenta de avaliação de redução da nocicepção em modelos lesão podal por reagente de Freund e em modelo de contusão pulmonar, esses dados serão discutidos com os obtidos previamente em outros estudos.

No estudo realizado por Wu *et al.* (2017), foram utilizados camundongos para avaliar o efeito de um analgésico para dor inflamatória local podal causada por administração de 0,01 mL de Adjuvante Completo de Freund, e corroborou com o resultado do presente estudo, havendo redução do limiar de resposta ao estímulo nociceptivo de Von Frey plantar no grupo com lesão em comparação ao grupo controle. Assim como também o resultado de Yue *et al.* (2018), em que foi administrado reagente de Freund associado a adeno-vírus. Estudos anteriores utilizaram o teste de Von Frey no local da lesão para avaliar dor. Alguns desses estudos realizaram estimulação em abdômen para avaliação de pancreatite crônica (LIAO *et al.*, 2018; QIAN *et al.*, 2011; FENG *et al.*, 2010; WINSTON *et al.*, 2005). Nesses estudos, um único teste consistia em 10 aplicações cada um por 1-2 s com um intervalo de 15 s entre aplicações permitem que o animal cesse qualquer resposta e retornar a uma posição relativamente inativa. Uma positiva resposta consistiu em o rato levantar a barriga (retirada resposta). Os dados foram expressos como uma porcentagem as respostas positivas com cada filamento para cada rato. Para esse modelo a técnica foi útil para detecção da dor causada por pancreatite. Diferença máxima entre os grupos controle e com pancreatite se deu em 5 semanas após indução da lesão, Controle aproximadamente 25% de vezes com resposta positiva grupo com pancreatite e em torno de 70% das vezes de resposta positiva em todos os estudos, utilizando filamento von Frey que gera 40.7 nN de pressão, esses dados não corroboraram com os resultados obtidos em nosso estudo, em que o Von Frey aplicado no local da lesão (apêndice xifóide) não foi capaz de detectar dor causada pela contusão pulmonar. Possivelmente ou pela diferença do modelo de lesão ou pela variação da técnica, estimulações multiplas seguidas nos estudos de pancreatite e

uma aplicação única no presente estudo. Já Bree *et al.* (2015) utilizaram a técnica de Von Frey no local da lesão para avaliação de dor em reparo de hérnia inguinal, como em nosso estudo utilizaram uma estimulação única, perpendicularmente à esquerda ou à direita do local da ferida cirúrgica, e também não observaram redução de limiar de respota nos animais com lesão frente aos animais controle.

Nos estudos de lesão da medula espinhal com avaliação da dor pela técnica de Von Frey plantar (LU *et al.*, 2018; LIOU *et al.*, 2007) mostraram-se úteis para avaliação da dor, não corroborando com o nosso estudo, pois o Von Frey plantar não foi eficaz para avaliação da dor em modelo de contusão pulmonar, que também foi a estimulação plantar, quando a lesão era realizada em outra região do corpo. Possivelmente por haver lesão neuropática com aumento da hipersensibilidade periférica no caso da lesão em medula e não no caso da contusão pulmonar.

A dor neuropática refere-se a dor que se origina da patologia do sistema nervoso. Seus sintomas incluem sensações dolorosas evocadas espontaneamente e estimuladas. Manifesta-se como parestesia, dor paroxística, hiperalgesia (a sensação de dor é significativamente aumentada) ou alodinia (estímulos não nocivos causam dor) (SHAHID *et al.*, 2017).

Não há estudos prévios com filamento semi-flexível, produz um estímulo mais intenso e foi útil pra detectar dor em 24h, mas não 1h. Porém, devido a necessidade de repetição do estudo, no experimento 2 foram utilizados apenas 6 animais por grupo (devido a limitação de tempo), aumentando o número de animais, deverá ser reavaliado se essa diferença também poderá ser verificada 1h após a contusão pulmonar e se efetivamente essa técnica consiste em uma ferramenta útil para avaliação de dor em modelo de contusão pulmonar.

Assim, esse trabalho visa, além de definir se a técnica de Von Frey (região plantar ou tórax) ou o estímulo com filamento semi-flexível no tórax são ferramentas úteis para avaliação de dor no modelo de contusão pulmonar e também padronizar o tempo de treinamento e

detalhes da execução dessas técnicas para que elas possam determinar dados confiáveis e reprodutíveis.

6. CONCLUSÕES

A escala de EEFR não se mostrou uma ferramenta sensível para avaliação de dor 1 e 24 horas após desenvolvimento de lesão podal por reagente de Freund ou após contusão pulmonar em ratos.

A técnica de Von Frey plantar e em tórax não são ferramentas úteis para avaliação de nocicepção em modelo de contusão pulmonar. A técnica de estimulação por filamento semi flexível em tórax parece ser uma ferramenta útil para a avaliação de nocicepção até 24h após contusão pulmonar em ratos.

Detalhes com relação ao tempo de treinamento prévio, tempo de aclimatação, manejo dos animais devem ser considerados para realização do teste de Von Frey plantar para modelo de lesão podal e teste de estímulo por filamento semi flexível para modelo de contusão pulmonar.

8. PRODUTO FINAL DA DISSERTAÇÃO

8.1 Procedimento Operacional Padrão para utilização dos testes nociceptivos de Von Frey plantar e com filamento semi-flexível em tórax no laboratório de Fisiologia da Respiração

Foi inicialmente elaborado um POP piloto, e foi realizado o experimento 1, frente a resposta de redução de limiar nociceptivo com os três tipos de estímulo mesmo no grupo sem lesão (controle), foi necessária a reavaliação da metodologia e detalhamento dessas técnicas no POP construído ao fim do experimento 2.

Foram elaborados POPs para: Utilização da técnica de Von Frey Plantar para detecção de dor em modelo de lesão podal no Laboratório de Fisiologia da Respiração (APÊNDICE 1) e outro para Utilização da técnica de estímulo com filamento semi-flexível para detecção de dor em modelo de contusão pulmonar no Laboratório de Fisiologia da Respiração (APÊNDICE 2); já que essas duas técnicas foram as que, a partir de nossos resultados, se mostraram eficazes.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTEMEIER, W. A. et al. **Mechanical ventilation with moderate tidal volumes synergistically increases lung cytokine response to systemic endotoxin.** American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology, v. 287, n. 3, p. 533–542, 2004.

ANDREWS, K. **The effect of changes in temperature and humidity on the accuracy of von Frey hairs.** J Neurosci Methods, v. 50, n. 1, p. 91-3, 1993.

BEIRITH, A.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B.; HESSS, S. C.; MESSANA, I.; FERRARI, F.; YUNES, R. A. **Study of the antinociceptive action of the ethanolic extract and the triterpene 24-hydroxytormentonic acid isolated from *Ocotea suaveolens* (Meissn) Hassler.** Planta Med., v. 65, p. 50 – 55, 1999.

BORTALANZA, L. B.; FERREIRA, J.; HESS, S. C.; MONACHE, F. D.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Anti-allodynic action of the tormentic acid, a triterpene isolated from plant, against neuropathic and inflammatory persistent pain in mice.** *European Journal of Pharmacology*, v. 453, p. 203–208, 2002.

BREE, D.; MORIARTY, O.; O'MAHONY, C. M.; MORRIS, B.; BANNERTON, K.; BROOM, D. C.; KELLY, J. P.; ROCHE, M.; FINN, D. P. **Development and Characterization of a Novel, Anatomically Relevant Rat Model of Acute Postoperative Pain.** *The Journal of Pain*, v. 16, n. 5, p. 421–435, 2015.

BRENNAN, T. J.; VANDERMEULEN, E. P.; GEBHART, G. F. **Characterization of a rat model of incisional pain.** *Pain*, v. 64, p. 493–501, 1996.

BRONDANI, J. T.; MAMA, K. R.; LUNA, S. P. WRIGHT, B. D.; NIYOM, S.; AMBROSIO, J.; VOGEL, P. R.; PADOVANI, C. R. **Validation of the English version of the UNESP-Botucatu multidimensional composite pain scale for assessing postoperative pain in cats.** *BMC Veterinary Research*, v. 9, p. 143, 2013.

BULGER, R. E. **Use of animals in experimental research: a scientist's perspective.** *Anat Rec*, v. 219, n. 3, p. 215-220, 1987.

CABAÑERO, D.; CAMPILLO, A.; CELERIER, E.; ROMERO, A.; PUIG, M. M. **Pronociceptive effects of remifentanil in a mouse model of postsurgical pain: effect of a second surgery.** *Anesthesiology*, v. 111, n. 6, p. 1334-1345, 2009.

CAO, Y. Q.; MANTYH, P. W.; CARLSON, E. J.; GILLESPIE, A. M.; EPSTEIN, C. J. H.; BASBAUM, A. I. **Primary afferent tachykinins are required to experience moderate to intense pain.** *Nature*, v. 392, p. 390-394, 1998.

CHIUMELLO, D.; PRISTINE, G.; SLUTSKY, A. S. **Mechanical Ventilation Affects Local and Systemic Cytokines in an Animal Model of Acute Respiratory Distress Syndrome.**

American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, v. 160, n. 1, p. 109-116, 1999.

CODERRE, T. J.; MELZACK, R. **The contribution of excitatory amino acids to central sensitization and persistent nociception after formalin-induced tissue injury.** J. Neurosci., v. 12, p. 3665 – 3670, 1992.

CODERRE, T. J. **The role of excitatory amino acid receptors and intracellular messengers in persistent nociception after tissue injury in rats.** Mol. Neurobiol., v. 7, p. 229 – 246, 1993.

CODERRE, T. J.; YASHPAL, K. **Intracellular messengers contributing to persistent nociception and hyperalgesia induced by L-glutamate and substance P in the rat formalin pain model.** Eur. J. Neurosci., v. 6, p. 1328 – 1334, 1994.

COHN S. M. **Pulmonary contusion: review of the clinical entity.** J Trauma, v. 42, p. 973–9, 1997.

CONZEMIUS, M. G.; HILL, C. M.; SAMMARCO, J. L.; PERKOWSKI, S. Z. **Correlation between subjective and objective measures used to determine severity postoperative pain in dog.** Journal of The American Veterinary Medical Association, v. 220, n. 11, p. 1619-1622, 1997.

CUNHA, T. M.; VERRI, W. A. Jr.; VIVANCOS, G. G.; MOREIRA, I. F.; REIS, S.; PARADA, C. A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. **An electronic pressure-meter nociception paw test for mice.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 37, n. 3, p. 401-407, 2004.

DARWIN, C. **The expression of the emotions in man and animals.** London: Albemarle, 1872.

DE RANTERE, D.; SCHUSTER, C. J.; REIMER, J. N.; PANG, D. S. **The relationship between the rat grimace scale and mechanical hypersensitivity testing in three experimental pain models.** Eur J Pain, 2015.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S. G. **The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats.** *Pain*, v. 4, p. 161, 1977.

EISENBERGER, N.; COLE, S. W. **Social neuroscience and health: neurophysiological mechanisms linking social ties with physical health.** *Nat Neurosci*, v. 15, p. 669–674, 2012.

FENG, Q. X.; WANG, W.; FENG, X. Y.; MEI, X. P.; ZHU, C.; LIU, Z. C.; LI, Y. Q.; DOU, K. F.; ZHAO, Q. C. **Astrocytic activation in thoracic spinal cord contributes to persistent pain in rat model of chronic pancreatitis.** *Neuroscience*, v. 167, p. 501–509, 2010.

FERREIRA, J.; CAMPOS, M. M.; PESQUERO, J. B.; ARAUJO, R. C.; BADER, M.; CALIXTO, J. B. **Evidence for the participation of kinins in Freund's adjuvant-induced inflammatory and nociceptive responses in kinin B1 and B2 receptor knockout mice.** *Neuropharmacology*, v. 41, p. 1006–1012, 2001.

FESTING, M. F.; ALTMAN, D. G. **Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals.** *ILAR J*, v. 43, p. 244–258, 2002.

FIRTH, A. M.; HALDANE, S. L. **Development of a scale to evaluate postoperative pain in dogs.** *Journal of The American Veterinary Medical Association*, v. 214, n. 5, p. 651–659, 1999.

FUKUI, D.; KAWAKAMI, M.; MATSUMOTO, T.; NAIKI, M. **Stress enhances gait disturbance induced by lumbar disc degeneration in rat.** *Eur Spine J*, 2017.

GALLEY, H. F. Mice, men, and medicine. *Br J Anaesth*, v. 105, p. 396–400, 2010.

GAYNOR, J. S. **Is postoperative pain management important in dogs and cats?** *Veterinary Medicine*, v. 94, n. 3, p. 254–258, 1999.

GENARI, B.; FERREIRA, M. B. C.; MEDEIROS, L. F.; DE FREITAS, J. S.; CIOATO, S. G.; TORRES, I. L. da S.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; LEITUNE, V. C. B.; COLLARES, F. M.; SAMUEL, S. M. W. **Anti-inflammatory effect of an adhesive resin**

containing indomethacinloaded nanocapsules. Archives of Oral Biology, v. 84, p. 106–111, 2017.

GRILL, H. J.; NORGREN, R. **The taste reactivity test. I. Mimetic responses to gustatory stimuli in neurologically normal rats.** Brain Research, v. 143, n. 2, p. 263-279, 1978.

GUNDUZ, O.; OLTULU, C.; BULDUM, D.; GUVEN, R.; ULUGOL, A. **Anti-allodynic and anti-hyperalgesic effects of ceftriaxone in streptozocin-induced diabetic rats.** Neurosci Lett, v. 491, n. 1, p. 23-25, 2011.

HAMIL, K. G.; HALL, S. H. **Cloning of rat Sertoli cell follicle-stimulating hormone primary response complementary deoxyribonucleic acid: regulation of TSC-22 gene expression.** Endocrinology, v. 134, p. 1205–1212, 1994.

HAMPSHIRE, V.; ROBERTSON, S. **Using the facial grimace scale to evaluate rabbit wellness in post-procedural monitoring.** Lab Anim (NY), v. 44 , n. 7, p. 259-260, 2015.

HANSEN, B. D. **Assessment of pain in dogs: veterinary clinical studies.** ILAR Journal, v. 44, n.3, p.197-205, 2003.

HANSEN, B. **Through a glass darkly: using behavior to access pain.** Seminars in Veterinary Medicine and surgery (small animal), v. 12, n. 3, p. 61-74, 1997.

HASKINS, S. C. **Use of analgesics postoperatively and in a small animal intensive care setting.** Journal of The American Veterinary Medical Association, v. 191, n. 10, p. 1266-1268, 1987.

HELLYER, P. W. Pain identification. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, C. E. **Textbook of Veterinary Internal Medicine.** 6. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, p. 16-21, 2005.

HENDRIX, P.K.; RAFFE, M.R.; ROBINSON, E.P.; FELICE, L.J.; RANDALL, D.A. **Epidural administration of bupivacaine, morphine or their combination for postoperative analgesia in dogs.** Journal of American Veterinary Medicine Association, v. 209, n. 3, p. 598-607, 1996.

HESS, S. C.; MONACHE, F. D. **Divergioic acid, a triterpene from Vochysia divergens.** J. Braz. Chem. Soc., v. 10, p. 104 – 106, 1999.

HOLDEN, E.; CALVO, G.; COLLINS, M.; BELL, A.; REID, J.; SCOTT, E. M.; NOLAN, A. M. **Evaluation of facial expression in acute pain in cats.** Journal of Small Animal Practice, v. 55, n. 12, p. 615-621, 2014.

HOLTON, L. L.; SCOTT, E. M.; NOLAN, A. M.; REID, J.; WELSH, E.; FLAHERTY, D. **Comparison of three methods used for assessment of pain in dogs.** Journal of The American Veterinary Medical Association, v. 212, n. 1, p. 61-66, 1998.

HOLTON, L.; REID, J.; SCOTT, E. M.; PAWSON, P.; NOLAN, A. **Development of a behavior-based scale to measure acute pain in dogs.** The Veterinary Record, v. 148, n. 17, p. 525-531, 2001.

HOUGHTON, P. J.; LIAN, L. M. **Triterpenoids from Desfontainia spinosa.** Phytochemistry, v. 25, p. 1939 – 1944, 1986.

INTERNACIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN (IASP). **Subcommittee on taxonomy.** *Pain*, v. 6, p. 249, 1979.

IRVIN, C. G.; BATES, J. H. **Measuring the lung function in the mouse: the challenge of size.** Respiratory Research, v. 4, n. 1, p. 4, 2003.

JINGE, T.; XIN, Z.; TINGTING, Y.; YONGMING, X.; SHA OFENG, P.; YINGYING, L.; DONGPING, D. **Swimming Training Reduces Neuroma Pain by Regulating Neurotrophins.** Medicine & Science in Sports & Exercise, Publish Ahead of Print, 2017.

KAUPPILA, T.; XU, X. J. **Sciatic nerve section induces mechanical hyperalgesia in skin adjacent to the deafferented region in rats: lack of correlation with autotomy behavior.** *Neurosci Lett*, v. 211, n. 1, p. 65-7, 1996.

KITAGAWA, J.; KANDA, K.; SUGIURA, M.; TSUBOI, Y.; OGAWA, A.; SHIMIZU, K.; KOYAMA, N. KAMO, H.; WATANABE, T.; REN, K.; IWATA, K. **Effect of Chronic Inflammation on Dorsal Horn Nociceptive Neurons in Aged Rats.** *J Neurophysiol*, v. 93, p. 3594 –3604, 2005.

LAMONT, L. A.; TRANQUILLI, W. J.; GRIMM, K. A. **Physiology of pain.** *The Veterinary Clinics of North America: small animal practice*, v. 30, n. 4, p. 703-728, 2000.

LANGFORD, D. J.; BAILEY, A. L., et al. **Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse.** *Nature Methods*, v. 7 , n. 6, p. 447-449, 2010.

LEACH, M. C.; KRISTEL, K.; MILLER, A. L.; DI PERROTOLO, M. S.; SOTOCINAL, S. G. **The assessment of post-vasectomy pain in mice using behaviour and the mouse grimace scale.** *Plos One*, v. 7, n. 4, 2012.

LEE, K. H.; LIN, Y. M.; WU, T. S.; ZHANG, D. C.; YAMAGISHI, T.; HAYASHI, T.; HALL, I. H.; CHANG, J. J.; WU, R. Y.; YANG, T. H. 1988. **The cytotoxic principles of *Prunella vulgaris*, *Psychotria serpens*, and *Hyptis capitata*: ursolic acid and related derivatives.** *Planta Med.* v. 54, p. 308 – 311, 1988.

LIAO, L. A.; LONG, H. A.; ZHANG, L. B.; CHEN, H. B.; ZHOU, Y. A.; YE, N. A., et al. **Evaluation of pain in rats through facial expression following experimental tooth movement.** *European Journal of Oral Sciences*, v. 122, n. 2, 2014.

LIAO, Y. H.; WANG, J.; WEI, Y. Y.; ZHANG, T.; ZHANG, Y.; ZUO, Z. F.; TENG, X. Y.; LI, Y. Q. **Histone deacetylase 2 is involved in μ -opioid receptor suppression in the spinal dorsal horn in a rat model of chronic pancreatitis pain.** *Molecular Medicine Reports*, v. 17, p. 2803-2810, 2018.

LILLEY, E. A.; ARMSTRONG, R. B.; CLARK, N. C.; GRAY, P. D.; HAWKINS, P. A.; MASON, K. D., et al. **Refinement of animal models of sepsis and septic shock.** *Shock*, v. 43, n. 4, 2015.

LIU, J. T.; LIU, F. C.; HSIN, S. T.; YANG, C. Y.; LUI, P. W. **Inhibition of the cyclic adenosine monophosphate pathway attenuates neuropathic pain and reduces phosphorylation of cyclic adenosine monophosphate response element-binding in the spinal cord after partial sciatic nerve ligation in rats.** *Anesthesia and analgesia*, v. 105, n. 6, 2007.

LIU, J. T.; LIU, F. C.; MAO, C. C.; LAI, Y. S.; DAY, Y. J. **Inflammation confers dual effects on nociceptive processing in chronic neuropathic pain model.** *Anesthesiology*, v. 114, n. 3, p. 660-672, 2011.

LONG, H.; LIAO, L.; GAO, M.; MA, W.; ZHOU, Y.; JIAN, F.; WANG, Y.; LAI, W. **Periodontal CGRP contributes to orofacial pain following experimental tooth movement in rats.** *Neuropeptides*, v. 52, p. 31-37, 2015.

LU, T.; WU, X.; WEI, N.; LIU, X.; ZHOU, Y.; SHANG, C; DUAN, Y.; DONG, Y. **Lipoxin A4 protects against spinal cord injury via regulating Akt/nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2/heme oxygenase-1 signaling.** *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 97, p. 905–910, 2018.

MALMBERG, A. B.; BASBAUM, A.I. **Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates.** *Pain*, v. 76, p. 215– 222, 1998.

MANNELLI, L. D. C.; MARESCA, M.; MICHELI, L.; FARINA, C.; SCHERZ, M. W.; GHELARDINIL, C. **A rat model of FOLFOX-induced neuropathy: effects of oral dimiracetam in comparison with duloxetine and pregabalin.** *Cancer Chemother Pharmacol*, v. 80, p. 1091–1103, 2017.

MATHEWS, K. A. **Pain assessment and general approach to management: management of pain.** The Veterinary Clinics of North America: small animal practice, v. 30, n. 4, p. 729-755, 2000.

MATSUMIYA, L. C.; SORGE, R. E.; SOTOCINAL S. G.; TABAKA J. M.; WIESKOPF, J. S.; ZALOUM, A.; KING, O. D.; MOGIL, J. S. **Using the Mouse Grimace Scale to Reevaluate the Efficacy of Postoperative Analgesics in Laboratory Mice.** Journal of the American Association for Laboratory Animal Science, v. 51, n. 1, p. 42–49, 2012.

MEERT, T. F.; VERMEIRSCH, H. A. **A preclinical comparison between different opioids: antinociceptive versus adverse effects.** Pharmacology, Biochemistry and Behavior, v. 80, p. 309–326, 2005.

MELZACK, R.; WALL, P. **Desafio da Dor**, tradução Nestor Rodrigues, Fundação Calouste Gulbenkian, 1987.

MILLER, A. L.; LEACH, M. C. **The mouse grimace scale: A clinically useful tool?** Plos One, v. 10, n. 9, 2015.

MILLER, P. R.; CROCE, M. A; BEE, T. K, et al. **ARDS after pulmonary contusion: accurate measurement of contusion volume identifies high-risk patients.** J Trauma, v. 51, p. 223– 8, 2001.

MOLLER, K. A.; JOHANSSON, B.; BERGE, O. G. **Assessing mechanical allodynia in the rat paw with a new electronic algometer.** J Neurosci Methods, v. 84, n. 1-2, p. 41-7, 1998.

MORTON, C.M.; REID, J.; SCOTT, E.M.; HOLTON, L.L.;NOLAN, A.M. **Application of a scaling model to establish and validate an interval level pain scale for assessment of acute pain in dogs.** American Journal of Veterinary Research, v. 66, n. 12, p. 2154-2166, 2005.

MORTON, D.B.; GRIFFITHS, P.H.M. **Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment.** Veterinary Record, v. 116, p. 431-436, 1985.

NEMZEK, J. A.; XIAO, H. Y.; MINARD, A. E.; BOLGOS, G. L.; REMICK, D. G. **Humane endpoints in shock research.** *Shock*, v. 21, p. 17–25, 2004.

OLIVER V.; DE RANTERE, D.; RITCHIE, R.; CHISHOLM, J.; HECKER, K. G.; PANG, D. **S. J. Psychometric Assessment of the Rat Grimace Scale and Development of an Analgesic Intervention Score.** *PLoS ONE*, v. 9, n. 5, 2014.

POGATZKI, E. M.; GEBHART, G. F.; BRENNAN, T. J. **Characterization of Adelta and C-fibers innervating the plantar rat hindpaw one day after an incision.** *J. Neurophysiol*, v. 87, p. 721–731, 2002.

PRÉFONTAINE, L.; DMV1, HÉLIE, P.; DMV; DACVP2; VACHON P.; DMV, PhD, DACLAM1. **Postoperative pain in Sprague Dawley rats after liver biopsy by laparotomy versus laparoscopy.** *Lab animal*, v. 44, n. 5, 2015.

QIAN, N. S.; LIAO, Y. H.; FENG, Q. X.; TANG, Y.; DOU, K. F.; TAO, K. S. **Spinal toll like receptor 3 is involved in chronic pancreatitis-induced mechanical allodynia of rat.** *Molecular Pain*, v. 7, n. 15, 2011.

RAGHAVENDRAN, K.; DAVIDSON, B. A.; HELINSKI, J. D.; MARSCHKE, C. J.; MANDERSCHIED, P.; WOYTASH, J. A.; NOTTER, R. H.; KNIGHT, P. R. **A rat model for isolated bilateral lung contusion from blunt chest trauma.** *Anesth Analg*, v. 101, n. 5, p. 1482-9, 2005.

RAGHAVENDRAN, K.; NOTTER, R. H.; DAVIDSON, B. A.; HELINSKI, J. D.; KUNKEL, S. L.; KNIGHT, P. R. **Lung contusion: inflammatory mechanisms and interaction with other injuries.** *Shock*, v. 32, n. 2, p. 122-30, 2009.

REID, J.; NOLAN, A.M.; HUGHES, J.M.L.; LASCELLES, D.; PAWSON, P.; SCOTT, E.M. **Development of short-form Glasgow Composite measure pain scale (CMPS-SF) and derivation of an analgesic intervention score.** *Animal Welfare*, v. 16, n. S, p. 97-104, 2007.

RICARD, J. D.; DREYFUSS, D.; SAUMON, G. **Production of inflammatory cytokines in ventilator-induced lung injury: a reappraisal.** American journal of respiratory and critical care medicine, v. 163, n. 5, p. 1176-1180, 2001.

ROLLIN, B. E. **Scientific autonomy and the 3Rs.** Am J Bioeth, v. 9, p. 62–64, 2009.

ROUGHAN, J. V.; BERTRAND, H. G. M. J.; ISLES, H. M. **Meloxicam prevents COX-2-mediated post-surgical inflammation but not pain following laparotomy in mice.** European Journal of Pain (United Kingdom), v. 20, n. 2, 2016.

ROUGHAN, J. V.; FLECKNELL, P. A. **Evaluation of a short duration behaviour-based post-operative pain scoring system in rats.** Eur J Pain, v. 7, n. 5, p. 397-406, 2003.

RUSSELL, W.; BURCH, R. **Principles of Humane Experimental Technique.** C. C. Thomas. Springfield, 1959.

SAFAKHAH, H. A.; KOR, N. M.; BAZARGANI, A.; BANDEGI, A. R.; POURBADIE, H. G.; KHOSHKHOLGH-SIMA, B.; GHANBARI, A. **Forced exercise attenuates neuropathic pain in chronic constriction injury of male rat: an investigation of oxidative stress and inflammation.** Journal of Pain Research, v. 10, p. 1457–1466, 2017.

SAMAD, T.; MOORE, K. A.; SAPIRTEIN, A.; BILLET, S.; ALLCHORNE, A.; POOLE, S.; BONVENTRE, J.V.; WOOLF, C. J. **Interleukin-1h-mediated induction of COX-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity.** Nature, n. 410, p. 471 – 475, 2001.

SELTZER, Z.; DUBNER, R.; SHIR, Y. **A novel behavioural model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury.** Pain, v. 43, p. 205–218, 1990.

SETO, Y; TAKASE, M.; TSUJI, Y.; TO, H. **Pregabalin reduces cisplatin-induced mechanical allodynia in rats.** Journal of Pharmacological Sciences, v. 134, p. 175 e 180, 2017.

SHAHID, M.; SUBHAN, F.; AHMAD, N.; ULLAH, I. **A bacosides containing Bacopa monnieri extract alleviates allodynia and hyperalgesia in the chronic constriction injury**

model of neuropathic pain in rats. BMC Complementary and Alternative Medicine, v. 17, p. 293, 2017.

SHEPARD, G. H.; FERGUSON, J. L.; FOSTER, J. H. **Pulmonary contusion.** Ann Thorac Surg, v. 7, n. 2, p. 110-9, 1969.

SOTOCINAL, S. G.; SORGE, R. E., et al. **The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions.** Mol Pain, v. 7, p. 55, 2011.

THOMAS, A.; MILLER, A.; ROUGHAN, J.; MALIK, A.; HAYLOR, K.; SANDERSEN, C.; FLECKNELL, P.; LEACH, M. **Efficacy of Intrathecal Morphine in a Model of Surgical Pain in Rats.** PLOS ONE, 2016.

TIWARI, V.; KUHAD, A.; CHOPRA, K. **Emblica officinalis Corrects Functional, Biochemical and Molecular Deficits in Experimental Diabetic Neuropathy by Targeting the Oxido-nitrosative Stress Mediated Inflammatory Cascade.** Phytother Res, 2011.

TOYE, F.; SEERS, K.; BARKER, K. **Including qualitative research in pain education.** International Association for the Study of Pain, 2018.

VASILEVSKY, N. A.; BRUSH, M. H.; PADDOCK, H.; PONTING, L.; TRIPATHY, S. J.; LAROCCA, G. M; HAENDEL, M. A. 2013. **On the reproducibility of science: unique identification of research resources in the biomedical literature.** PeerJ, 2013.

WAGNER, A.E.; WORLAND, G.A.; GLAWE, J.C.; HELLYER, P.W. **Multicenter, randomized controlled trial of pain- related behaviours following routine neutering in dogs.** Journal of American Veterinary Medicine Association, v. 233, n. 1, p. 109 – 115, 2008.

WAITE, M. E.; TOMKOVICH, A.; QUINN, T. L.; SCHUMANN, A. P.; DEWBERRY, L. S.; TOTSCH, S. K.; SORGE, R. E. **Efficacy of common analgesics for postsurgical pain in rats.** Am Assoc Lab Anim Sci, v. 54, n. 4, p. 420-425, 2015.

WASSEF, M. R. **Concepts of Preemptive Analgesia for postoperative Pain.** The Mount Sinai Journal of Medicine, v. 65, n.4, 1998.

WEISSMAN, C. **The metabolic response to stress: An overview and update.** Anesthesiology, v.73, p. 308-327, 1990.

WHITTAKER, A. L.; LEACH, M. C.; PRESTON, F. L.; LYMN, K. A.; HOWARTH, G. S. **Effects of acute chemotherapy-induced mucositis on spontaneous behavior and the grimace scale in laboratory rats.** Lab Anim, 2015.

WILLIAMS, A. C de C. **Facial expression of pain: an evolutionary account.** Behav Brain Sci., 2002.

WINSTON, J. H; HE, Z. J.; SHENOY, M.; XIAO, S. Y.; PASRICHA, P. J. **Molecular and behavioral changes in nociception in a novel rat model of chronic pancreatitis for the study of pain.** Pain, v. 117, p.214 –222, 2005.

WU, P. C.; HSIAO, H. T.; LIN, Y. C.; SHIEH, D. B.; LIU, Y. C. **The analgesia efficiency of ultrasmall magnetic iron oxide nanoparticles in mice chronic inflammatory pain model.** Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, v. 13, p. 1975–1981, 2017.

YANG, Z.; LUO, W.; HOU, J.; ZHAO, Z.; JIAN, F.; WAMALWA, P.; LAI, W.; WANG, J.; WANG, Y.; LIAO, Z. **Development of a behavior model of pain induced by experimental tooth movement in rats.** Eur J Oral Sci, v. 117, p. 380–384, 2009.

YUE, J.; WANG, X. S.; GUO, Y. Y.; ZHENG, K. Y.; LIU, H. Y.; HU, L. N.; ZHAO, M. G.; LIU, S. B. **Anxiolytic effect of CPEB1 knockdown on the amygdala of a mouse model of inflammatory pain.** Brain Research Bulletin, v. 137, p. 156–165, 2018.

ZAHN, P. K.; BRENNAN, T. J. **Intrathecal metabotropic glutamate receptor antagonists do not decrease mechanical hyperalgesia in a rat model of postoperative pain.** Anesth. Analg., v. 87, p. 1354–1359, 1998.

ZHANG, Y.; LI, A.; XIN, J.; REN, K.; BERMAN, B. M.; LAO, L.; ZHANG, R.-X. **Electroacupuncture alleviates chemotherapy-induced pain through inhibiting phosphorylation of spinal CaMKII in rats.** *Eur J Pain*, 2017.

ZHAO C.; TALL, J. M.; MEYER, R. A.; RAJA, S. N. **Antiallodynic effects of systemic and intrathecal morphine in the spared nerve injury model of neuropathic pain in rats.** *Anesthesiology*, v. 100, n. 4, p. 905-911, 2004.

ZHAO, W. J.; NIE, H. Z.; GAO, Z. Y.; ZHAO, Q.; YIN, M. **WITHDRAWN: Spinal d-amino acid oxidase contributes to the pathogenesis of hyperalgesia in the rat formalin test.** *Neuroscience*, 2009.

ZHU, C. Z.; HSIEH, G.; EI-KOUHEN, O.; WILSON, S. G.; MIKUSA, J. P.; HOLLINGSWORTH, P. R.; CHANG, R.; MORELAND, R. B.; BRIONI, J.; DECKER, M. W.; HONORE, P. **Role of central and peripheral mGluR5 receptors in post-operative pain in rats.** *Pain*, v. 114, p. 195–202, 2005.

ZHU, C. Z.; NIKKEL, A. L.; MARTINO, B.; BITNER, R. S.; DECKER, M. W.; HONORE, P. **Dissociation between post-surgical pain behaviors and spinal Fos-like immunoreactivity in the rat.** *European Journal of Pharmacology*, v. 531, p. 108–117, 2006.

APÊNDICE 1

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO	
TÍTULO: Utilização da técnica de Von Frey Plantar para detecção de dor em modelo de lesão podal no Laboratório de Fisiologia da Respiração		
1. OBJETIVO		
Padronizar a técnica do teste de Von Frey plantar para avaliação de lesão podal em ratos no Laboratório de Fisiologia da Respiração.		
2. APLICAÇÃO		
Laboratório de Fisiologia da Respiração		
3. RESPONSÁVEIS PELA EXECUÇÃO		
Pesquisadores, docentes, alunos e técnicos do Laboratório de Fisiologia da Respiração.		
4. MATERIAIS UTILIZADOS		
<ul style="list-style-type: none"> • Analgesímetro Digital; • Filamentos de Von Frey; • Estrutura de acrílico com base aramada; • Planilha para registro das medidas (pressões) captadas pelo aparelho. 		
4.1 Analgesímetro Digital e filamentos de Von Frey		
<ul style="list-style-type: none"> • O analgesímetro de Von Frey (Bonther, São Paulo, Brasil), é constituído por uma haste aonde são conectados os filamentos flexíveis, que fica ligado a um aparelho capaz de medir a força máxima aplicada. 		
		
<p style="text-align: center;"><i>Figura 1 - Analgesímetro de Von Frey e filamentos utilizados no analgesímetro.</i></p>		



PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO



TÍTULO: Utilização da técnica de Von Frey Plantar para detecção de dor em modelo de lesão podal no Laboratório de Fisiologia da Respiração

4.2 Estrutura de acrílico

- A estrutura é constituída em madeira, acrílico e uma grade aramada. A base mede 510 cm² e é recoberta pela grade aramada com aberturas de 0,5 cm de lado, que permite a realização do teste, mas sem que as patas dos animais se prendam ou ultrapasassem os espaços

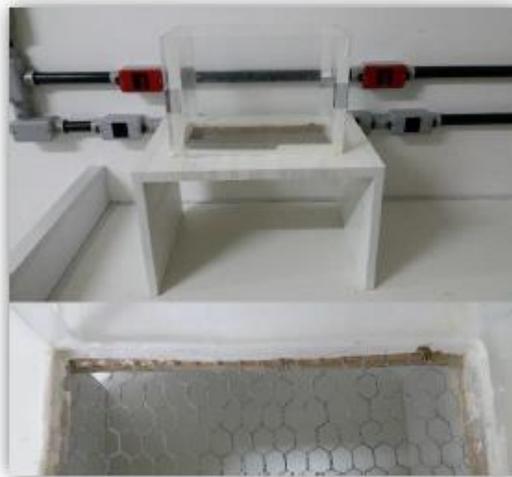


Figura 2 Estrutura para manutenção do rato para teste de Von Frey e em detalhe a grade sobre a qual o animal fica apoiado.

5. PROCEDIMENTOS

- **5.1 Aclimação dos animais**

5.1.1 Aclimação no biotério

- Os animais devem ficar no mesmo ambiente controlado (umidade e temperatura) que ficarão durante os dias que estiverem em experimento, em gaiolas microisoladoras (sempre que possível) com água e ração *Ad libitum* de cinco a sete dias antes do início do período de aclimação na caixa de acrílico.



PROCEDIMENTO OPERACIONAL
PADRÃO



TÍTULO: Utilização da técnica de Von Frey Plantar para detecção de dor em modelo de lesão podal no Laboratório de Fisiologia da Respiração

5.1.2 Aclimação na caixa de acrílico e ao estímulo pelo aparelho de Von Frey

- Antes de iniciado o período de avaliação dos animais, eles devem se adaptar a estarem por algum tempo na estrutura de metacrilato aonde serão realizados os testes. Devem ser colocados durante 4 dias prévios ao dia da coleta de valores basais dentro da estrutura, aonde devem permanecer por 10 minutos pelo mesmo avaliador que vai realizar a coleta nos dias de experimento. Durante esse período, esse avaliador deve estimular a região plantar do animais utilizando diferentes filamentos flexíveis de Von Frey que serão utilizados no estudo conectados ao analgesímetro.

5.2 Separação dos filamentos para o teste

- Separar os filamentos 2, 4, 8, 9, 10, 13 e 15 (numerados por ordem de espessura), que determinam a pressão média em gramas de força (gf) com valores, respectivos: 0,94/ 2,61/ 3,97/ 7,91/ 18,82/ 41,78/ 68,02.

5.3 Período de adaptação

- Antes de iniciar os testes, deve ser realizado um período de adaptação de 15 minutos (TIWARI, 2011; MANNELLI et al., 2017; FUKUI et al., 2017).
- Os testes só devem ser iniciados quando os ratos estiverem calmos, sem realizar exploração do ambiente e sem estarem deitados sobre as patas (CUNHA et al., 2004).

5.4 Aplicação do teste

- O estímulo deve ser aplicado no centro da região plantar por 7 segundos para estudar o limiar de retirada.
- Para cada filamento testado, devem ser feitos de 3 a 5 estímulos com intervalos de 5 segundos entre os estímulos (TIWARI, 2011; MANNELLI et al., 2017; GENARI et al., 2017; SAFAKHAH et al., 2017). Esses estímulos definem se a resposta ao filamento será positiva ou negativa (definido por três respostas positivas ou três respostas negativas ao estímulo) (KAUPILLA, 1996). Os filamentos são aplicados em sequência, por forças crescentes, de menores para maiores pressões (SAFAKHAH et al., 2017)



PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO



TÍTULO: Utilização da técnica de Von Frey Plantar para detecção de dor em modelo de lesão podal no Laboratório de Fisiologia da Respiração

- Se a resposta for negativa, o procedimento será repetido com o seguinte filamento mais espesso. Se a resposta for positiva, o limiar de retirada da pata será calculado através do cálculo da média dos três valores de pressão positivas. Depois de calculado o valor de limiar de retirada da pata, deve-se aguardar 3 minutos para repetir o procedimento para a obtenção da segunda, e em seguida da terceira medida. A média dos 3 valores das pressões obtidas, gera o limiar de cada medida (ZHAO *et al.*, 2009; LIOU *et al.*, 2011). A média dos 3 limiares, é considerada como o limiar de alodinia mecânica para cada animal naquele momento (ficha de coleta de dados em anexo).
- São consideradas respostas positivas ao estímulo: retirada da pata (CABAÑERO, 2009; JINGE *et al.*, 2017) e flexão da pata, desconsiderando o ato de caminhar (TIWARI, 2011).
- **5.6 Recomendações importantes**
 - A aclimação e os testes devem ser feitos em ambiente tranquilo, sem ruídos.
 - O treinamento prévio do avaliador é externamente importante para a realização dos testes, deve ser feito, pelo menos, com 30 animais antes de iniciadas as avaliações.
 - As aclimações dos animais devem ser realizadas sempre pela pessoa que for responsável pelas avaliações posteriores para minimizar o estresse do animal.
 - Os animais devem ser mantidos em um biotério no mesmo local da avaliação, e transportados apenas para a realização das lesões, para minimizar o estresse.
 - Os valores basais coletados sempre no mesmo dia da realização da lesão.
 - Caso forem realizadas marcações, os animais devem ser manuseados pelo menos uma semana antes do período de aclimação com analgesímetro, também para reduzir o estresse dos animais.

6. PRECAUÇÕES DE BIOSSEGURANÇA

Jaleco e luva descartável para o manuseio dos animais.



PROCEDIMENTO OPERACIONAL
PADRÃO



TÍTULO: Utilização da técnica de Von Frey Plantar para detecção de dor em modelo de lesão podal no Laboratório de Fisiologia da Respiração

7. DOCUMENTOS DE REFERÊNCIA

- CABAÑERO, D.; CAMPILLO, A.; CELERIER, E.; ROMERO, A.; PUIG, M. M. Pronociceptive effects of remifentanil in a mouse model of postsurgical pain: effect of a second surgery. *Anesthesiology*, v. 111, n. 6, p. 1334-1345, 2009.
- CUNHA, T. M.; VERRI, W. A. Jr.; VIVANCOS, G. G.; MOREIRA, I. F.; REIS, S.; PARADA, C. A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 37, n. 3, p. 401-407, 2004.
- FUKUI, D.; KAWAKAMI, M.; MATSUMOTO, T.; NAIKI, M. Stress enhances gait disturbance induced by lumbar discs degeneration in rat. *Eur Spine J*, 2017.
- GENARI, B.; FERREIRA, M. B. C.; MEDEIROS, L. F.; DE FREITAS, J. S.; CIOATO, S. G.; TORRES, I. L. da S.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; LEITUNE, V. C. B.; COLLARES, F. M.; SAMUEL, S. M. W. Anti-inflammatory effect of an adhesive resin containing indomethacinloadednanocapsules. *Archives of Oral Biology*, v. 84, p. 106-111, 2017.
- JINGE, T.; XIN, Z.; TINGTING, Y.; YONGMING, X.; SHAOFENG, P.; YINGYING, L.; DONGPING, D. Swimming Training Reduces Neuroma Pain by Regulating Neurotrophins. *Medicine & Science in Sports & Exercise, Publish Ahead of Print*, 2017.
- KAUPPILA, T.; XU, X. J. Sciatic nerve section induces mechanical hyperalgesia in skin adjacent to the deafferented region in rats: lack of correlation with autotomy behavior. *Neurosci Lett*, v. 211, n. 1, p.65-7, 1996.
- LIOU, J. T.; LIU, F. C.; MAO, C. C.; LAI, Y. S.; DAY, Y. J. Inflammation confers dual effects on nociceptive processing in chronic neuropathic pain model. *Anesthesiology*, v. 114, n. 3, p. 660-672, 2011.
- MANNELLI, L. D. C.; MARESCA, M.; MICHELI, L.; FARINA, C.; SCHERZ, M. W.; GHELARDINIL, C. A rat model of FOLFOX-induced neuropathy: effects of oral dimiracetam in comparison with duloxetine and pregabalin. *Cancer ChemotherPharmacol*, v. 80, p. 1091-1103, 2017.
- SAFAKHAH, H. A.; KOR, N. M.; BAZARGANI, A.; BANDEGI, A. R.; POURBADIE, H. G.; KHOSHKHOLGH-SIMA, B.; GHANBARI, A. Forced exercise attenuates neuropathic pain in chronic constriction injury of male rat: an investigation of oxidative stress and inflammation. *Journal of Pain Research*, v. 10, p. 1457-1466, 2017.
- TIWARI, V.; KUHAD, A.; CHOPRA, K. Emblica officinalis Corrects Functional, Biochemical and Molecular Deficits in Experimental Diabetic Neuropathy by Targeting the Oxido-nitrosative Stress Mediated Inflammatory Cascade. *Phytother Res*, 2011.
- ZHAO, W. J.; NIE, H. Z.; GAO, Z. Y.; ZHAO, Q.; YIN, M. WITHDRAWN: Spinal d-amino acid oxidase contributes to the pathogenesis of hyperalgesia in the rat formalin test. *Neuroscience*, 2009.



PROCEDIMENTO OPERACIONAL
PADRÃO



TÍTULO: Utilização da técnica de Von Frey Plantar para detecção de dor em modelo de lesão podal no Laboratório de Fisiologia da Respiração

ANEXO: Ficha de coleta de dados

Adaptação		Horário de início:		Horário de fim:	
Fil.	1º medida __: __	2º medida __: __	3º medida __: __		
2					
4					
8					
9					
10					
13					
15					
limiar		limiar		limiar	

APÊNDICE 2

	<p>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO</p>	
<p>TÍTULO: Utilização da técnica de estímulo com filamento semi flexível para detecção de dor em modelo de contusão pulmonar no Laboratório de Fisiologia da Respiração</p>		
<p>1. OBJETIVO</p> <p>Padronizar a técnica de estímulo com o filamento semi flexível em tórax para avaliação de resposta nociceptiva frente ao modelo de contusão pulmonar em ratos no Laboratório de Fisiologia da Respiração.</p> <p>2. APLICAÇÃO</p> <p>Laboratório de Fisiologia da Respiração</p> <p>3. RESPONSÁVEIS</p> <p>Pesquisadores, docentes, técnicos e alunos do Laboratório de Fisiologia da Respiração</p> <p>4. MATERIAIS UTILIZADOS</p> <ul style="list-style-type: none"> • Analgesímetro digital; • Filamento semi flexível; • Estrutura de acrílico com base aramada; <p>4.1 Analgesímetro Digital e filamento semiflexível</p> <ul style="list-style-type: none"> • O analgesímetro (Bonther, São Paulo, Brasil), é constituído por uma haste aonde é conectado o filamento semi flexível, que fica ligado a um aparelho capaz de medir a força máxima aplicada. <div style="text-align: center;">  </div> <p><i>Figura 1: Analgesímetro e filamento semi flexível</i></p>		



PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO



TÍTULO: Utilização da técnica de estímulo com filamento semi flexível para detecção de dor em modelo de contusão pulmonar no Laboratório de Fisiologia da Respiração

4.2 Estrutura de acrílico

- A estrutura é constituída em madeira, acrílico e uma grade aramada. A base mede 510 cm² e é recoberta pela grade aramada com aberturas de 0,5 cm de lado, que permite a realização do teste, mas sem que as patas dos animais se prendam ou ultrapassem os espaços.

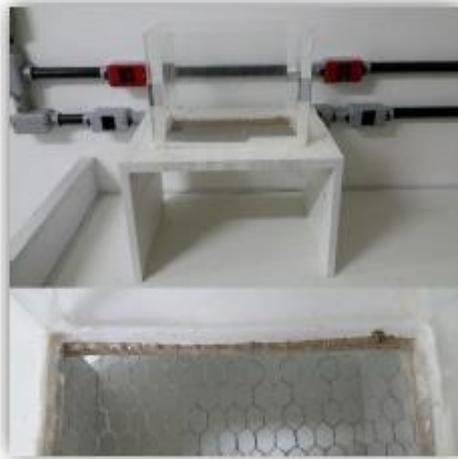


Figura 2: Estrutura para manutenção do rato para teste de estimulação por filamento semi flexível em tórax e em detalhe a grade sobre a qual o animal fica apoiado.

5. PROCEDIMENTOS

5.1 Aclimação e tricotomia dos animais

5.1.1 Aclimação no biotério

- Os animais devem ficar no mesmo ambiente controlado (umidade e temperatura) que ficarão durante os dias que estiverem em experimento, em gaiolas microisoladoras (sempre que possível) com água e ração *Ad libitum* de cinco a sete dias antes do início do período de aclimação na caixa de acrílico.

5.1.2 Tricotomia do animal

- Durante o período de aclimação no biotério, animais devem ser anestesiados com o isofurano (indução à 5% e manutenção à 2%) para que seja realizada a tricotomia na região



PROCEDIMENTO OPERACIONAL
PADRÃO



TÍTULO: Utilização da técnica de estímulo com filamento semi flexível para detecção de dor em modelo de contusão pulmonar no Laboratório de Fisiologia da Respiração

do apêndice xifóide (local aonde será realizado o estímulo) com o auxílio de uma lâmina, água, sabão e gaze.

5.1.3 Aclimação na caixa de acrílico e ao analgesímetro com filamento semi flexível

- Antes de iniciado o período de avaliação dos animais, eles devem se adaptar a estarem por algum tempo na estrutura de metacrilato aonde serão realizados os testes. Devem ser colocados durante 4 dias prévios ao dia da coleta de valores basais dentro da estrutura, aonde devem permanecer por 10 minutos pelo mesmo avaliador que vai realizar a coleta nos dias de experimento. Durante esse período, esse avaliador deve estimular a região do apêndice xifóide dos animais com o filamento semi flexível conectado ao analgesímetro.

5.2 Período de adaptação

- Antes de iniciar os testes, deve ser realizado um período de adaptação de 15 minutos (TIWARI, 2011; MANNELLI et al., 2017; FUKUI et al., 2017).
- Os testes só devem ser iniciados quando os ratos estiverem calmos, sem realizar exploração do ambiente e sem estarem deitados sobre as patas (CUNHA et al., 2004).

5.3 Aplicação do teste

- O estímulo deve ser aplicado na região do apêndice xifóide por 7 segundos para avaliar qual a pressão gerada pelo filamento semi flexível que desencadeia reação positiva. Devem ser coletadas 3 medidas com estimulação pelo filamento semi flexível e cálculo da média dos 3 valores de pressão para a definição do limiar de reação por estimulação com filamento semi flexível. Deve ser respeitado um intervalo de 3 minutos entre as medidas.
- No tórax, as respostas positivas classificadas são: esquivar-se, lamber-se, retirada da área onde ocorre a aplicação do filamento ou imediatamente após a aplicação do mesmo (adaptado de BREE et al., 2015).
- O filamento é aplicado perpendicularmente na área do apêndice xifóide, com força suficiente para provocar leve encurvamento do filamento (adaptado de BREE et al., 2015).



PROCEDIMENTO OPERACIONAL
PADRÃO



TÍTULO: Utilização da técnica de estímulo com filamento semi flexível para detecção de dor em modelo de contusão pulmonar no Laboratório de Fisiologia da Respiração

5.4 Recomendações importantes

- A aclimação e os testes devem ser feitos em ambiente tranquilo, sem ruídos.
- O treinamento prévio do avaliador é externamente importante para a realização dos testes, deve ser feito, pelo menos, com 30 animais antes de iniciadas as avaliações.
- As aclimações dos animais devem ser realizadas sempre pela pessoa que for responsável pelas avaliações posteriores para minimizar o estresse do animal.
- Os animais devem ser mantidos em um biotério no mesmo local da avaliação, e transportados apenas para a realização das lesões, para minimizar o estresse.
- Os valores basais coletados sempre no mesmo dia da realização da lesão.
- Caso forem realizadas marcações, os animais devem ser manioulados pelo menos uma semana antes do período de aclimação com analgesímetro, também para reduzir o estresse dos animais.

6. PRECAUÇÕES DE BIOSSEGURANÇA

Jaleco e luva descartável para o manuseio dos animais.



PROCEDIMENTO OPERACIONAL
PADRÃO



TÍTULO: Utilização da técnica de estímulo com filamento semi flexível para detecção de dor em modelo de contusão pulmonar no Laboratório de Fisiologia da Respiração

7. DOCUMENTOS DE REFERÊNCIA

- BREE, D.; MORIARTY, O.; O'MAHONY, C. M.; MORRIS, B.; BANNERTON, K.; BROOM, D. C.; KELLY, J. P.; ROCHE, M.; FINN, D. P. Development and Characterization of a Novel, Anatomically Relevant Rat Model of Acute Postoperative Pain. *The Journal of Pain*, v. 16, n. 5, p. 421-435, 2015.
- CUNHA, T. M.; VERRI, W. A. Jr.; VIVANCOS, G. G.; MOREIRA, I. F.; REIS, S.; PARADA, C. A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 37, n. 3, p. 401-407, 2004.
- FUKUI, D.; KAWAKAMI, M.; MATSUMOTO, T.; NAIKI, M. Stress enhances gait disturbance induced by lumbar disc degeneration in rat. *Eur Spine J*, 2017.
- MANNELLI, L. D. C.; MARESCA, M.; MICHELI, L.; FARINA, C.; SCHERZ, M. W.; GHELARDINIL, C. A rat model of FOLFOX-induced neuropathy: effects of oral dimiracetam in comparison with duloxetine and pregabalin. *Cancer Chemother Pharmacol*, v. 80, p. 1091-1103, 2017.
- TIWARI, V.; KUHAD, A.; CHOPRA, K. *Emblca officinalis* Corrects Functional, Biochemical and Molecular Deficits in Experimental Diabetic Neuropathy by Targeting the Oxido-nitrosative Stress Mediated Inflammatory Cascade. *Phytother Res*, 2011.