



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
FISIOLOGIA ANIMAL COMPARADA



**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DE ANALGÉSICOS NO PÓS-OPERATÓRIO
DE RATOS *WISTAR* SUBMETIDOS AO MODELO DE CIRURGIA
ESTEREOTÁXICA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Ft. Maria Fernanda Dorrego Antunes

Rio Grande, RS, Brasil

2013

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DE ANALGÉSICOS NO PÓS-OPERATÓRIO
DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS AO MODELO DE CIRURGIA
ESTEREOTÁXICA**

POR

Ft. Maria Fernanda Dorrego Antunes

Dissertação apresentada ao programa de Pós – Graduação em Ciências Fisiológicas: Fisiologia Animal Comparada da Universidade Federal de Rio Grande (FURG) como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fisiologia Animal Comparada.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Paula Horn

DEDICO:

**A minha amada e inesquecível avó Branca Lilia Rodrigues Lima (*In
memorian*), quem me ensinou a ler e escrever.**

*“Escrever é fácil. Você começa com uma letra maiúscula
e termina com um ponto final. No meio você coloca
idéias.”*

Pablo Neruda

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer em primeiro lugar, à Universidade Federal do Rio Grande (FURG) e principalmente ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Animal Comparada pela grande oportunidade de fazer parte do corpo discente.

A CAPES e ao REUNI pelas bolsas de mestrado que tive durante esses dois anos.

A Deus, por ser minha base forte, meu consolo, meu abrigo. Tudo devo àquele que morreu para me dar a vida.

Ao meu “paizinho”, pelo qual tenho muito respeito e admiração e que me apóia sempre em tudo que faço.

Minha mãe, a quem amo do meu jeito e que também me fez crescer como ser humano e me ensinou a dar valor a vida, mesmo que de uma forma diferente.

Meu irmão Matheus, que mesmo distante, diz implicitamente “eu te amo”.

Ao meu amor André, o qual é a minha grande fonte de inspiração nesta minha caminhada, companheiro de todos os momentos, sempre muito paciente e com uma palavra de conforto.

Minha querida orientadora prof^a Dr^a Ana Pula Horn, que me recebeu de braços abertos em seu grupo de pesquisa, sempre com um sorriso no rosto, com quem vivenciei muitos momentos engraçados e que jamais esquecerei. Muitas vezes, me acolheu em sua casa, a “pensão Horn” onde ficamos trabalhando até tarde, sem luz elétrica e com muita chuva. Me ensinou muito como professora e como pessoa. São muitas coisas para se dizer em tão poucas palavras. Então, obrigada por tudo e por me brindar com a tua amizade!

A todos os nosso bolsistas, Suellen, Débora, Magno, Marcos, Matheus. Muito obrigada a todos, pois sem vocês, nada disso seria possível, pois ninguém realiza nada sozinho.

Minha colega de faculdade e de mestrado Aline, com quem iniciei o mestrado desde a seleção até este momento final. Obrigada por todos os momentos que tivemos juntas, nos experimentos, nas risadas com chimarrão na sala 1 e por todo o resto. Te admiro muito.

Minha outra colega de mestrado Kamila, obrigada por toda ajuda no meu trabalho. Principalmente por receber aos domingos na tua casa para falar de trabalho e

ainda por me levar em casa. Nunca esquecerei todos os momentos descontraídos que passamos juntas.

A mais nova integrante do grupo, Franciele, minha colega de profissão, obrigada por toda ajuda e ensinamentos nos meus primeiros momentos no laboratório, pelas viagens aos sábados para a FURG, sempre com um biscoitinho para matar a fome no caminho.

Ao casal Eder e Gisele, amigos de longa data que tive a honra de conhecer durante a faculdade. Obrigada pelas caronas na madrugada e pelas muitas gargalhadas e momentos bons que passamos juntos.

A todos os integrantes do LabNeuro, pessoas simples e dedicadas com que tive a oportunidade de conviver durante esses dois anos.

Professora Daniela Barros, quem admiro e respeito pela mulher que é. Te agradeço muito por tudo e pela tua amizade.

A todos os professores e funcionários (especialmente a Dna. Maria, sempre com um “bom dia” contagiante e um café fresquinho já bem cedinho da manhã) do ICB, com os quais tive a oportunidade de conhecer e aprender.

Enfim, a todos que cruzaram o meu caminho neste período, e que de uma forma ou de outra, me ajudaram na execução deste trabalho, meu **MUITO OBRIGADA!!!**

RESUMO

ANTUNES, Maria Fernanda Dorrego. **Investigação do Efeito de Analgésicos no Pós-Operatório de Ratos *Wistar* Submetidos ao Modelo de Cirurgia Estereotáxica.** 2013. 58 p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas: Fisiologia Animal Comparada. Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

A dor é um fenômeno que induz alterações fisiológicas que alteram e que podem até mesmo invalidar os resultados de um experimento. Nos protocolos de cirurgia estereotáxica (SS) em roedores não é comum a utilização de analgésicos no pós-operatório, sob o argumento de que os mesmos interferem nos resultados. Nosso objetivo foi investigar o efeito da administração de analgésicos no pós-operatório de ratos submetidos ao modelo de SS. Os parâmetros avaliados foram mudanças na ingestão de ração, no peso dos animais, possíveis alterações comportamentais e a astrogliose reativa. A cirurgia foi realizada nas coordenadas referentes ao estriado esquerdo. Foram utilizados ratos *Wistar* machos. O tramadol foi administrado a cada 12 h e o carprofeno a cada 24 h, ambos até os animais completarem 72 h de pós-operatório. O peso da ração mostra que todos os animais que sofreram cirurgia comeram significativamente menos do que os grupos Ctrl nos tempos 48 e 72 h após a SS. Quando o peso dos animais foi avaliado, os grupos SS+TM e SS+CP perderam significativamente mais peso do que os grupos Ctrl. Os testes comportamentais não apresentaram diferença estatística. Nosso estudo mostra que, para os parâmetros avaliados, não houve prejuízo aos animais que receberam analgesia após a cirurgia. Assim, concluímos que é possível o uso desses fármacos na rotina dos animais submetidos ao modelo de SS.

Palavras-chave: bem-estar animal, dor, analgesia, carprofeno, tramadol

ABSTRACT

ANTUNES, Maria Fernanda Dorrego. **Effect of analgesics in the postoperative recovery of male Wistar rats submitted to the model of intracerebral surgery.** 2013. 58 p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas: Fisiologia Animal Comparada. Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

Pain is a phenomenon that induces physiological changes that alter and may even invalidate the results of an experiment. Stereotaxic surgery (SS) in rodents is a worldwide used protocol in neuroscience, which certainly induce pain. However, the literature shows us that the use of an analgesic protocol is not a routine after SS, with the argument that they interfere with the results. Our objective in this work was to investigate the effect of two common groups of analgesics in postoperative recovery of rats subjected to SS model. Parameters such as changes in food intake, weigh of the animals, motor behavioral changes and possible reactive astrogliosis were investigated. The surgery was performed in male Wistar rats using the coordinates for the left striatum. Tramadol (TM), representative of the opioid class of drugs, was administered every 12 h and carprofen (CM), representative of the non-steroidal antiinflammatory class of drugs, every 24 h until 72 h postsurgery. Results showed that all animals that underwent surgery consumed less food than their control groups and both analgesics were not able to reverse these findings. Also, animals submitted to SS that received TM and CP lost more weight than their controls. Behavioral motor tests (open field, foot fault and beam walking) showed no statistical difference, suggesting that SS and the drugs do not interfere in the locomotor activity of the animals. GFAP was not different among groups, suggesting that SS and the analgesics do not influence reactive astrogliosis. Our study shows that, apart from a slight weigh loss, there was no disadvantage or damage to animals that received analgesia after surgery. So, based on our results, we recommend that neuroscientists take painkillers administration into routine.

Keywords: animal welfare, pain, analgesia, carprofen, tramadol

LISTA DE ABREVIATURAS

AINE- Anti-inflamatório não-esteroidal;

CE- Cirurgia Estereotáxica;

CONCEA- Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

COX- Ciclooxygenase;

COX-1- Ciclooxygenase-1;

COX-2- cicloxygenase-2;

CP- Carprofeno;

DBCA- Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos;

PG- Prostaglandina;

PGE- Prostaglandina E;

PGE₂- Prostaglandina E₂;

SNC- Sistema Nervoso Central;

TM- Tramadol;

5HT₃. 5-hydroxitriptamina, subtipo 3.

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO 1

FIGURA 1 – Open field test performed 24 and 72 h after stereotaxic surgery.....	31
FIGURA 2 – Foot fault test performed 24 and 72 h after stereotaxic surgery.....	32
FIGURA 3 – Beam walking test performed 24 and 48 h after stereotaxic surgery.....	33
FIGURA 4 – Food intake 24, 48 and 72 h after the stereotaxic surgery and the analgesics administration.....	34
FIGURA 5 – Body weigh is influenced by tramadol and carprofen administration	35
FIGURA 6 – Stereotaxic surgery ,tramadol and carprofendo not interefere in GFAP content.....	36

1. LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1- GUIA PARA OS AUTORES – Lab Animal.....	30
---	----

SUMÁRIO

PARTE I

RESUMO.....	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE ANEXOS	ix
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
2.1. BEM-ESTAR ANIMAL	1
2.2. DOR EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO	2
2.2.1. FISIOLOGIA DA DOR	4
2.2.2. VIAS NERVOSAS PERIFÉRICAS DA DOR.....	4
2.2.3. VIAS NERVOSAS CENTRAIS.....	5
2.2.4. TIPOS DE DOR.....	5
2.2.5. CIRURGIA ESTREOTÁXICA.....	6
2.2.6. INFLAMAÇÃO.....	6
2.3. ANALGESIA.....	7
2.3.1. O CARPROFENO.....	8
2.3.2. O TRAMADOL.....	9
3. OBJETIVOS	12

PARTE II

INTRODUCTION.....	16
METHODS	17
Animals.....	17
Stereotaxic surgery.....	17
Treatment with analgesics.....	18
Behavioral assessment.....	18
Open field	18
Foot fault test.....	18
Beam walking test.....	19
Body weigh and Food intake.....	19
Western blotting.....	19
Statistical analysis.....	20
RESULTS.....	20
Open field.....	20
Foot fault test.....	20

Beam walking test.....	21
Food intake and body weigh.....	21
Western blotting.....	21
DISCUSSION.....	21
AKNOWLEDGMENTS.....	25
REFERENCES.....	26
PARTE III	
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	37
1. PERSPECTIVAS.....	38
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
PARTE IV	
1. ANEXOS.....	44
1.1.GUIA PARA AUTORES- Lab Animal.....	44

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. BEM-ESTAR ANIMAL

O uso de animais em pesquisas biomédicas permitiu vários avanços científicos e tecnológicos que influenciaram o desenvolvimento de vacinas, antibióticos e anestésicos no último século. Sem a experimentação com animais de laboratórios tais pesquisas não poderiam ser realizadas (ANDRADE, 2002). Estudos em animais permeiam a história da humanidade desde os tempos pré-históricos até os dias de hoje (PAIXÃO, 1999), vindo contribuir para muitos dos avanços conquistados pela humanidade (CRISSIUMA, 2002). A questão ética no que diz respeito à utilização de animais em laboratório, os direitos dos animais e o bem-estar animal são assuntos de preocupação crescente na comunidade científica (DBCA do CONCEA, 2013; PAIXÃO, 1999).

Dessa forma, foi estabelecido pela Associação Mundial de Medicina Veterinária que “o objetivo de cada profissional que trabalhe com animais deve ser o de prover condições aos mesmos para que suas necessidades possam ser satisfeitas e os danos que a eles possamos causar sejam evitados”. Por isso, na área da Ciência de Animais de Laboratório, os pesquisadores tem o dever de proporcionar bem-estar aos animais, já que estes se encontram sob sua responsabilidade (DBCA do CONCEA, 2013; RIVERA, 2010).

É imprescindível proporcionar bem-estar aos animais de laboratório não apenas pela prática de uma ciência com dados confiáveis, mas também pela consideração que devemos ter para com os mesmos. Sendo assim, temos que nos valer de alguns fatores importantes para poder prover-lhes o bem-estar. Dentre esses fatores podemos citar: conhecer a etologia e a biologia do animal em estudo; conhecer o manejo e as condições ambientais adequadas à espécie; durante os procedimentos experimentais evitar estresse, dor, distresse; cuidados no transporte, etc (RIVERA, 2010).

Molento (2005) ressalta que das muitas definições propostas para bem-estar, a mais aceita no ambiente científico vem sendo aquela publicada por Broom (1988), segundo a qual o bem-estar de um indivíduo é seu estado em relação às suas tentativas de se adaptar ao seu ambiente (McMILLAN, 1999; BROOM, 1996; BROOM, 1991). Os efeitos sobre o bem-estar incluem aqueles provenientes de doença, traumatismos, fome, estimulação benéfica, interações sociais, condições de alojamento, tratamento

inadequado, manejo, transporte, procedimentos laboratoriais, mutilações variadas, tratamento veterinário ou alterações genéticas através de seleção genética convencional ou por engenharia genética (CLARK, 1997).

O bem-estar pode ser mensurado cientificamente. Para tanto, por exemplo, utilizam-se parâmetros indicativos da aptidão biológica de um indivíduo, como a avaliação do tempo de vida reprodutiva, a verificação de danos corporais e a frequência em que um indivíduo adoece. A avaliação do bem-estar animal é uma tarefa não muito fácil, já que eles não são capazes de se expressar com palavras e também nem sempre alterações em seu comportamento são indicadores de bem-estar ou de mal-estar (RIVERA, 2010).

Um dos fatores que apresenta grande dificuldade na sua avaliação é a dor, já que, como dito anteriormente, os animais não são capazes de se comunicar verbalmente. Segundo a literatura, a dor interfere nos padrões de bem-estar animal e acarreta variáveis indesejáveis à pesquisa, que podem interferir significativamente na interpretação dos estudos (FLECKNELL, 1994).

Pesquisas mostram que um protocolo pós-operatório sem a presença de dor determina uma melhor qualidade de recuperação, retornando o animal a uma alimentação normal mais rapidamente e, conseqüentemente, perdendo menos peso (TINDALL, 1993). Animais de laboratório expostos à dor pós-operatória em conseqüência de um procedimento cirúrgico tiveram índices fisiológicos e bioquímicos normalizados após a administração de analgésicos (CASTRO, 2010).

2.2. DOR EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO

Nas últimas décadas foram feitos muitos progressos relativos ao reconhecimento e ao manejo da dor animal (FLECKNELL, 2008). O termo dor é um conceito de difícil definição, existindo várias versões. Uma dessas definições é a que nos é apresentada pela *International Association for Study of Pain*, em que a dor humana é definida como “*Uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a uma lesão tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal dano*” (MERSKEY, 1979).

Assim, devemos utilizar critérios fisiológicos e comportamentais para determinar se uma experiência é dolorosa ou não para o animal. Muitas pessoas defendem que os animais vertebrados não têm a vertente emocional da dor, ou seja, a capacidade de processar a dor e sofrer, acreditando, assim, que eles não possuem a capacidade de ter

emoções semelhantes aos seres humanos (FLECKNELL, 2008). Porém, o homem e o animal apresentam em comum estruturas neurológicas e processos fisiológicos e, em virtude da existência, em animais, de manifestações comportamentais comparáveis àquelas observadas no homem quando em estado de dor, tornou-se, no mínimo, eticamente prudente aceitar que o sofrimento animal é equivalente ao sofrimento humano quando ambos forem sujeitos a um mesmo fator que induza a dor (OLFERT, 1998).

Uma vez que se sabe que os mecanismos nervosos que participam da resposta a estímulos dolorosos são similares nos animais e em humanos, se impõe a necessidade de erradicar o conceito de que os animais são tolerantes à dor (CARBONE, 2011). Embora muitos pesquisadores acreditem no princípio da analogia, ainda existe uma grande resistência por parte dos mesmos em aplicar protocolos de analgesia, alegando que estes interferem nos resultados da pesquisa (TINDALL, 1993). Já existem estudos comprovando que a dor inflamatória pode causar alterações na permeabilidade da barreira hemato-encefálica, fato esse que pode ter um efeito significativo e de grande impacto em estudos de distribuição de agentes terapêuticos no cérebro (WILLIS, 2008; HUBER, 2001). Assim sendo, é fundamental que neurocientistas apliquem protocolos de analgesia no pós-operatório de animais de experimentação.

Um resultado experimental pode sofrer alterações se o animal do estudo estiver sentindo dor e estresse. Por isso, um animal com dor ou estressado não é o objeto ideal de pesquisa. Assim, a aplicação de analgésicos durante um procedimento experimental que provoque dor nos animais envolve não somente uma questão ética, mas também está intimamente ligada ao bem-estar animal (RAEKALLIO, 2003).

Nos dias de hoje, em que o bem-estar animal é uma preocupação eminente, existem legislações estabelecidas para a aplicação de um tratamento mais humanitário aos animais de experimentação. No Brasil possuímos desde 08 de outubro de 2008 a lei 11.794, conhecida como Lei Arouca, a qual regula efetivamente a criação e o uso de animais para a pesquisa e o ensino em âmbito nacional (CARDOSO, 2010). Assim sendo, garantir o bem-estar do animal através do controle da dor torna-se uma obrigação dos pesquisadores.

Além disso, é sabido que, muitas vezes, a própria dor é muito mais estressante para o animal do estudo do que o próprio procedimento experimental. Sendo assim, a dor pode gerar alterações tanto do comportamento motor quanto no peso. Daquele porque o estresse provocado acarreta distúrbios nos sistemas nervoso e musculoesquelético

(tremores, convulsões, paralisia, pupila dilatada, reflexos lentos ou ausentes etc.), e deste último porque há uma diminuição do apetite do animal. Logo, roedores estressados não conseguem ter uma ingestão de água e comida de forma adequada e nem ter um bom desempenho nos testes comportamentais aplicados (RIVERA, 2002).

2.2.1. FISILOGIA DA DOR

O componente fisiológico da dor, chamado de *nociceção*, consiste nos processos de transdução do estímulo nocivo em sinais elétricos por nociceptores periféricos, condução dos sinais codificados por neurônios aferentes para o corno dorsal da medula espinhal e subsequente transmissão e modulação de sinais neurais em níveis espinhais e supraespinhais. Este processo, quando completo, permite a percepção consciente da dor (LEMKE, 2004). Existe uma diferença entre os termos nociceção e dor; o primeiro refere-se a manifestações neurofisiológicas geradas por estímulos nocivos e o segundo envolve a percepção de um estímulo aversivo, que requer a capacidade de assimilação e elaboração de impulsos sensoriais (TSAGARELI, 2013).

2.2.2. VIAS NERVOSAS PERIFÉRICAS DA DOR

A via rápida ou do trato neoespinotalâmico é a mais recente evolutivamente. É iniciada principalmente por estímulos mecânicos ou térmicos. Utiliza neurônios de axônios rápidos (grande diâmetro), as chamadas fibras A-delta (12-30m/s). Esta é a via que produz a sensação da dor aguda e bem localizada. O seu neurônio ocupa a lâmina I da medula espinhal e cruza imediatamente para o lado contrário. Aí ascende na substância branca na região antero-lateral até fazer sinapse principalmente no tálamo, mas também na formação reticular (TSAGARELI, 2013; SANKUHLER, 2009; SCHOFFNEGGER, 2008).

A via lenta, ou do trato paleoespinotalâmico é a mais primitiva em termos evolutivos. É iniciada pelos fatores químicos. Utiliza axônios lentos de diâmetro reduzido e velocidades de condução de apenas 0,5 a 2 m/s. Esta via produz dor mal localizada pelo indivíduo e contínua. O seu neurônio ocupa a lâmina V da medula espinhal e ascende depois de cruzar para o lado oposto no trato antero-lateral, às vezes não cruzando. Fazem sinapse na formação reticular, no colículo superior e na substância cinzenta periaqueductal (HARTMANN, 2004).

2.2.3. VIAS NERVOSAS CENTRAIS

As sensações corporais, táteis, térmicas e dolorosas convergem para o tálamo, que funciona como uma rede de interpretação sensitiva, em alguns de seus núcleos, alguns dos quais emitem projeções ao córtex cerebral, a partir do qual é possível a consciência da sensação dolorosa. A dor mais significativa do ponto de vista terapêutico é quase sempre aquela que é produzida pela via lenta. A via rápida produz apenas sensações de dor localizada e de duração relativamente curta que permitem ao organismo afastar-se do agente nociceptivo. A dor crônica tem origem quando os impulsos recebidos pela via lenta são integrados na formação reticular do tronco cerebral e no tálamo. Já a este nível há percepção consciente vaga da dor (WOOLF, 1995).

2.2.4. TIPOS DE DOR

A **dor aguda** se manifesta transitoriamente por um período curto e na maioria das vezes com causas facilmente identificáveis. Funciona como um alerta do corpo para lesões em tecidos, inflamações ou doenças, centralizada primeiro e depois capaz de se tornar difusa. Clinicamente, uma **dor crônica** é aquela que excede seis meses, sendo constante e intermitente. Quase sempre está associada a um processo de doença crônica (SCHOFFNEGGER, 2008).

Quando ocorre uma lesão na pele, receptores sensoriais (terminações nervosas) que enviam sinais que causam a percepção da dor são ativados nos tecidos cutâneos inferiores. São as **dores cutâneas**, localizadas e de curta duração, como queimaduras de primeiro grau e cortes superficiais (CLARK, 2007).

Uma **dor somática** tem origem nos ligamentos, ossos, tendões, vasos sanguíneos e nervos. Poucos receptores de dor nestas regiões produzem uma sensação mal localizada e de maior duração. É a dor que uma pessoa sente quando quebra o braço ou torce o tornozelo, por exemplo (VERGNOLLE, 2005).

A **dor visceral** se origina dentro dos órgãos e cavidades internas do corpo. Com menos receptores sensoriais ainda nestas áreas, produz uma sensação dolorida e de maior duração do que a dor somática, muito difícil de localizar – sendo muitas vezes associada a partes do corpo totalmente diferentes do local da lesão pelo paciente. O ataque cardíaco é um bom exemplo, podendo primeiramente causar dor no ombro, estômago, braço e na mão (VERGNOLLE, 2005).

2.2.5. A CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Um procedimento de rotina na área das Neurociências, e que gera dor nos animais de experimentação, é a cirurgia estereotáxica (CE). A palavra estereotaxia, a qual deriva do latim, *stereo*: tridimensional e *taxis*: arranjo é uma técnica moderna da neurocirurgia que permite a localização e o acesso preciso de estruturas intracranianas através de apenas um pequeno orifício no crânio. É uma forma minimamente invasiva de intervenção cirúrgica que usa um sistema de coordenadas tridimensional para localizar pequenos alvos no interior do corpo e para executar nestes alguma atividade, tal como ablação, biópsia, lesão, injeção, estimulação, implante, radiocirurgia e etc (PERRY, 1982).

Essa técnica cirúrgica em roedores abrange as seguintes etapas: tricotomia dos pelos do animal na região superior da cabeça, incisão da pele para exposição da calota craniana, raspagem do periósteo e por último, a craniotomia para permitir o acesso ao tecido cerebral. Todos esses passos provocam dor, já que estímulos nocivos que resultam em uma sensação de dor rápida, fina e bem localizada (na pele e no periósteo) refletem no geral, a ação das fibras A δ . Além disso, devido ao procedimento lesivo, conseqüentemente ocorre uma reação inflamatória local. A incisão cirúrgica no cérebro, por causar uma lesão, também desencadeia todos os processos da cascata inflamatória, nesse local estimulada principalmente pela microglia ativada, aumentando assim, a pressão intracraniana.

2.2.6. INFLAMAÇÃO

A inflamação pode ser definida como a reação do tecido vivo vascularizado à injúria local, que pode ser de natureza química, física ou biológica. O processo inflamatório, sob determinado ponto de vista, pode ser encarado como um mecanismo de defesa do organismo e, como tal, atua destruindo (fagocitose e anticorpos), diluindo (plasma extravasado) e isolando ou sequestrando (malha de fibrina) o agente agressor, além de abrir caminho para os processos de reparação (cicatrização e regeneração) do tecido afetado. Entretanto, a inflamação pode ser potencialmente danosa, uma vez que em sua manifestação pode lesar o próprio organismo, às vezes de forma mais deletéria que o próprio agente injuriante (ZHAO, 2010).

Como as contribuições para a elucidação dos mecanismos celulares envolvidos com a dor inflamatória, tem sido demonstrado que os estímulos inflamatórios não são diretamente induzidos pela liberação de prostaglandinas. Em vez disso, está bem definido que uma cascata seqüencial de citocinas e quimiocinas precedem a liberação desses mediadores (CUNHA, 2005). Conforme Hilário e colaboradores (2006), quando ocorre uma lesão na membrana celular, a enzima fosfolipase A2 é ativada por citocinas pró-inflamatórias degradando os fosfolípidos, resultando na produção de ácido araquidônico. Este, ao ser metabolizado, forma os leucotrienos pela ação da enzima lipoxigenase, e as prostaglandinas, as prostaciclina e os tromboxanos pela ação da enzima ciclooxigenase (COX).

As prostaglandinas (PGs) são importantes mediadores da dor, febre e inchaço na inflamação. A PGE2 é um mediador inflamatório com importante atividade pirogênica e no aumento da sensibilidade à dor (BOTTING, 2006). Vários mediadores que induzem a dor, incluindo a bradicinina e a histamina, são liberados estimulando nociceptores nos locais da inflamação (SHOELSON, 2003). Segundo Lee (2003), existem duas isoformas da enzima ciclooxigenase (COX) que possuem diferentes estruturas e funções, sendo conhecidas como ciclooxigenase (COX-1) e ciclooxigenase (COX-2). A COX-1 é considerada uma isoforma constitutiva. A COX-2 está presente nos locais de inflamação, sendo por isso denominada de enzima indutiva. Engelhardt (1996) afirma que, os efeitos secundários indesejáveis dos AINEs sobre o estômago e os rins são provavelmente devido a inibição da COX-1 e o benefício é atribuído a inibição da COX-2.

Segundo Hucho (2005), a resposta inflamatória é essencial para a sobrevivência, por tentar proteger o organismo de estímulos nocivos. As funções da inflamação incluem a destruição ou inativação do agente ou irritante inicial e então a limpeza dos debris celulares na área para que o reparo tecidual possa ocorrer (WALDER, 2010).

Por outro lado, a inflamação também é prejudicial ao organismo. Por exemplo, em um caso de lesão cerebral por encefalopatia. Nesse caso, ocorre um processo inflamatório que pode causar edema cerebral, acarretando num aumento da pressão intracraniana do paciente. Consequentemente, o cérebro, sem ter lugar para onde se expandir, fica comprimido e isso pode causar morte de tecido neuronal. Fato que pode ter seqüelas reversíveis ou não, dependendo da área afetada (LEE, 2013).

2.3 ANALGESIA

A maioria dos animais de experimentação não recebe um protocolo de analgesia após um procedimento cirúrgico, por isso, o controle da dor configura-se uma questão de grande preocupação. Como já citado anteriormente, pesquisas mostram que um protocolo pós-operatório sem a presença de dor determina uma melhor qualidade de recuperação e o animal retornará a uma alimentação normal e perderá menos peso (TINDALL, 1993).

Um problema recorrente relatado por pesquisadores é a manutenção efetiva da analgesia no pós-cirúrgico, que depende da potência de ação do analgésico e da via de administração. Com esse argumento alguns pesquisadores deixam de usar os analgésicos, como se essa fosse a melhor solução para o problema. Além disso, muitas pesquisas optam por não utilizar analgésicos quando o protocolo experimental causa dor justificando que os fármacos alteram os resultados. Porém, os próprios processos dolorosos causam uma gama de alterações fisiológicas que interferem nos eixos neuroendócrinos, aumentando os níveis de aldosterona, cortisol, catecolaminas e provocando alterações respiratórias. Por isso, experimentos que provoquem dor podem alterar os resultados que utilizem parâmetros relacionados e, infelizmente, muitos pesquisadores ainda não discutem esse tema (CARBONE, 2011; RIVERA, 2010).

Os fármacos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) e os opióides desempenham um importante papel no controle da dor, atuando em estruturas periféricas e centrais (VONKEMAN, 2010). Os analgésicos opióides têm sua atuação em receptores opióides, os quais encontram-se em várias regiões do Sistema Nervoso Central (SNC). Causam inibição da aferência da dor na medula espinhal e, simultaneamente, ativam as vias corticais descendentes inibitórias da dor, levando, assim, à analgesia (KATZUNG, 2010; RANG, 2003).

Além da atividade anti-inflamatória, os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) também são utilizados no combate à dor e à febre. O mecanismo de ação principal da maioria dos AINEs faz-se pela inibição da COX, a qual converte o ácido aracdônico em eicosanoides, mediadores responsáveis pela inflamação (BRICKS, 1998), inibindo a síntese de PGE e tromboxanos. Segundo Munford 2001, a inibição da síntese de PGE pela enzima cicloxigenase responde, pelo menos em parte, por suas propriedades anti-inflamatória, analgésica e antipirética.

2.3.1. O CARPROFENO

Novos AINES, incluindo o CP, têm sido desenvolvidos com o objetivo de aumentar a atividade antiinflamatória, reduzindo-se seus efeitos colaterais. O CP é um ácido carboxílico e pertence à classe de AINES conhecida como derivados do ácido aril propiônico, que também inclui o ibuprofeno, o cetoprofeno, o naproxeno e o fenoprofeno (ALENKA, 2005; ZHU, 2003).

O CP inibe a COX, bloqueando a produção de PGs e possuindo assim ação analgésica, antiinflamatória e antipirética. É também o agente mais lipofílico dentre a classe dos ácidos propiônicos. Equivale em potência à indometacina, entretanto, menos provável em se causar sangramento do trato gastrointestinal, sendo consideravelmente mais potente no controle dos sinais de dor crônica que os antiinflamatórios tradicionais, tais como a aspirina (ALENKA, 2005).

O mecanismo primário de ação do CP não está bem estabelecido, entretanto especulações giram em torno da inibição da migração neutrofílica, envolvimento nas respostas humorais e celulares imune-mediadas e a sua influência nos moduladores espinhais e centrais da dor. Apesar dos efeitos terapêuticos do CP não serem principalmente dependentes da síntese de PGs, ele é um inibidor moderadamente potente da fosfolipase A; e inibidor fraco e reversível da COX. Em doses terapêuticas, o CP não inibe igualmente a COX ou a lipoxigenase (WHEELER, 2009; MITCHEL, 2005; ZHU, 2003; RUSSEL, 1999). Além disso, possui pequeno efeito na inibição da síntese de PGE, mas é um potente inibidor da liberação dela, com bom efeito antiinflamatório e analgésico (ALENKA, 2005). Por causa de sua inibição seletiva sobre a COX-2, o CP provoca menor toxicose renal e gastrointestinal quando comparado a outras classes (GUÉRIUS et al., 2002). O grau de inibição da cicloxigenase promovido pelo CP não permite prever por completo a eficácia clínica da droga. O bloqueio desta conversão resulta em menos ácido araquidônico disponível como substrato para a ação da cicloxigenase.

Neste trabalho foi representante dos AINES utilizado foi o CP, porque normalmente esse fármaco é indicado para dor leve a moderada e sua eficácia é equivalente à do ibuprofeno (PIMPÃO, 2009; CAVALCANTE, 2008; STEAGALL, 2007). A dose utilizada foi de 5 mg/kg (POMPEU, 2010), administrado por via subcutânea imediatamente após a cirurgia, e posteriormente a cada 24 h até o dia da eutanásia.

2.3.2. O TRAMADOL

Opióides são fármacos que produzem analgesia sem a perda da propriocepção ou consciência e que se ligam aos receptores opióides no sistema nervoso. Inibem a liberação de neurotransmissores excitatórios no encéfalo e medula espinhal e previnem a dor sem interferir com a função motora. Apesar dos efeitos colaterais, tais como vômito, náusea, bradicardia, hipertermia, salivação e depressão respiratória, são os analgésicos que apresentam maior eficácia no pós-operatório imediato ou na dor aguda (TRESCOT, 2006).

O TM é um analgésico opióide de ação central. É um agonista puro não-seletivo dos receptores opióides μ (μ), δ (delta) e κ (kappa), com uma afinidade maior pelo receptor μ (μ). Outros mecanismos que contribuem para o efeito analgésico de TM são a inibição da recaptação neuronal de noradrenalina e o aumento da liberação de serotonina. O TM tem um efeito antitussígeno. Em contraste com a morfina, de uma maneira geral, doses analgésicas de TM não apresentam efeito depressor sobre sistema respiratório. A motilidade gastrointestinal também não é afetada. Os efeitos no sistema cardiovascular tendem a ser leves (FARSHCHI, 2010).

É um analgésico eficaz no pós-operatório e pode ser utilizado durante muito mais tempo do que a morfina. Porém, tem como efeitos adversos náuseas e vômitos. Parece que seu mecanismo de ação envolve a potencialização da transmissão serotoninérgica, podendo sua eficácia analgésica ser bloqueada pela coadministração do antagonista do receptor $5HT_3$ da serotonina, a ondansetrona. Ele também inibe a função do transportador da norepinefrina, sendo um fraco agonista do receptor μ . A toxicidade do TM inclui convulsões, sendo o fármaco contraindicado aos pacientes com histórico de epilepsia e para o uso com outros fármacos que reduzem o limiar convulsivo (PANUS, 2011; BAMIGBADE, 1997).

Após administração intramuscular em humanos, TM é rápida e completamente absorvido: o pico médio de concentração sérica ($C_{máx}$) é atingido após 45 minutos, e a biodisponibilidade é quase 100%. O TM tem um perfil farmacocinético linear dentro da faixa de dose terapêutica. A relação entre concentrações séricas e o efeito analgésico é dose-dependente, mas varia consideravelmente em casos isolados (BAMIGBADE, 1997).

A dose de TM administrada aos animais nesse trabalho foi de 10 mg/kg, por via subcutânea, imediatamente após a CE, e posteriormente a cada 12 h até o dia da eutanásia dos animais (CARPENTER, 2013; MORRISEY, 2012; SILVA, 2007).

Portanto, após discorrer sobre todos os assuntos abordados no presente trabalho, não restam dúvidas de que a CE provoca um processo álgico nos animais de experimentação. Além disso, sabe-se que animais com dor ficam estressados e isso, conseqüentemente, vai gerar alterações comportamentais nos mesmos. Assim, para a prática de uma boa ciência, que vise não somente os resultados desejados, devemos oferecer bem-estar aos animais através de protocolos de analgesia sempre que a ocasião exigir. Sendo assim, para verificar se os analgésicos interferem nos resultados dos estudos na área da neurociência, em animais submetidos ao modelo de CE, analisamos os testes comportamentais da Tarefa de Campo Aberto, o Teste de Motricidade em Haste Elevada e o Teste de Motricidade em Grade. Além disso, avaliamos o peso dos animais, bem como o consumo diário de ração durante o período experimental.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL:

-Investigar o efeito da administração de analgésicos no pós-operatório de ratos *Wistar* submetidos ao modelo de cirurgia estereotáxica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

-Investigar se a dor causada pela cirurgia estereotáxica causa e se os analgésicos CP e TM conseguem reverter:

- alteração na ingestão de ração;
- alteração no peso dos animais;
- alteração no comportamento motor dos animais;
- alteração na astrogliose reativa.

Manuscrito

Manuscrito a ser submetido ao periódico Lab Animal

CAPÍTULO 1

Effect of analgesics in the postoperative recovery of male Wistar rats submitted to the model of intracerebral surgery

Maria Fernanda Dorrego Antunes¹, Suellen de Azevedo Ribeiro², Marcos Freitas Cordeiro², Magno da Silva Marques², Débora Camacho Luz², Aline Ribeiro Galho¹, Ana Paula Horn^{1,2}.

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas - Fisiologia Animal Comparada,

²Laboratório de Histologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, 96210-900, Brazil.

Corresponding author:

Ana Paula Horn - Laboratório de Histologia, Instituto de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Rio Grande (FURG) – Av Itália, Km 8 - Rio Grande, RS,
96210-900, Brazil. Phone number: +55 53 3293 5185. Fax number: +55 53 3293-6848.

e-mail: anapaulahorn@pq.cnpq.br

Abstract: Pain is a phenomenon that induces physiological changes that alter and may even invalidate the results of an experiment. Stereotaxic surgery (SS) in rodents is a worldwide used protocol in neuroscience, which certainly induce pain. However, the literature shows us that the use of an analgesic protocol is not a routine after SS, with the argument that they interfere with the results. Our objective in this work was to investigate the effect of two common groups of analgesics in the postoperative recovery of rats subjected to SS model. Parameters such as changes in food intake, weigh of the animals, motor behavioral changes and possible reactive astrogliosis were investigated. The surgery was performed in male Wistar rats using the coordinates for the left striatum. Tramadol (TM), representative of the opioid class of drugs, was administered every 12 h and carprofen (CP), representative of the non-steroidal antiinflammatory class of drugs, every 24 h until 72 h postsurgery. Results showed that all animals that underwent surgery consumed less food than their control groups and both analgesics were not able to reverse these findings. Also, animals submitted to SS that received TM and CP lost more weigh than their controls. Behavioral motor tests (open field, foot fault and beam walking) showed no statistical difference, suggesting that SS and the drugs do not interfere in the locomotor activity of the animals. GFAP was not different among groups, suggesting that SS and the analgesics do not influence reactive astrogliosis. Our study shows that, apart from a slight weigh loss, there was no disadvantage or damage to animals that received analgesia after surgery. So, based on our results, we recommend that neuroscientists take painkillers administration into routine after SS.

Keywords: animal welfare, pain, analgesia, carprofen, tramadol

The use of animals in scientific discoveries is of great importance in the investigation of treatment to several diseases, new drugs, antibiotics and vaccines. Previously, many scientists believed that the research animals were not able to feel pain. Fortunately, today this view has been modified and the welfare of animals is an eminent concern. Worldwide there are already laws established for the application of a more humane treatment of animals for experimentation. In Brazil since 2008 we have a specific law which effectively regulates the creation and use of animals for research and teaching nationally¹, meaning a great advance in research in our country.

Molento (2005)² points out that for the many of the proposed definitions for wellness, the most accepted in the scientific environment has been published by Broom (1988)³, according to which well-being of an individual is its state in relation to their attempts to adapt to their environment. One factor that threatens the well-being of animals is pain. Molony and Kent (1997)⁴ defined animal pain as "*an aversive sensory and emotional experience representing an awareness by the animal of damage or threat to the integrity of its tissues.*" The reduction or alleviation of pain is regarded as an improvement in animal care. We must know how to assess and monitor pain, if we want the animals are treated humanely and ethically. In addition to the ethical concerns, the pain causes undesirable variables for research, which can significantly interfere with the interpretation of studies⁵. There are already studies showing that inflammatory pain can cause changes in the permeability of the blood-brain barrier, a fact that may have a significant and large impact on distribution studies of therapeutic agents into the brain^{6,7}.

A procedure that generates pain in experimental animals is stereotaxic surgery (SS), a wide used technique in neuroscience research^{8,9,10}. It is a form of minimally invasive surgery that uses a three-dimensional coordinate system to locate small targets within the body^{11,12}. The vast majority of experimental animals did not receive a protocol of analgesia after a surgical procedure, so pain control configures a matter of great concern. Research shows that a postoperative protocol without the presence of pain determines a better quality of recovery and the animal returns to a normal diet and lost less weigh¹³. Among the available analgesics for the treatment of pain are NSAIDs (non-steroidal anti-inflammatory drugs) and opioids.

Opioids are indicated for the treatment of moderate to severe pain. However, are short-lived. TM for example, has a similar mechanism to that of morphine, and does not release histamine^{13,14,15}. On the other hand, NSAIDs such as CP (indicated for mild to

moderate pain), act by inhibiting enzymes COX1 and COX2 and therefore the synthesis of prostaglandins. So we know that act directly on microgliosis and astrogliosis, which are consequences of an inflammatory response and cause increased levels of COX2 and PGE2^{16,17,18}.

For pain control it is important to note factors such as the selection of appropriate drugs and doses, the choice of the correct route of administration and knowledge of the adverse effects that may cause certain drug¹⁹.

Therefore, our objective was to investigate the effect of analgesics in postoperative rats that underwent stereotactic surgery. More specifically, we aimed to investigate whether the pain caused by this surgery could be reversed by the analgesics CP and TM and if they alone could cause side effects to the animals that could interfere in neuroscience research.

METHODS

Animals

72 male Wistar heterogenic rats weighing 250-300 g were used for the experiments. The animals were maintained in standard conditions of temperature ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), relative humidity (60-80%) and with a regular 12 h light/ 12 h dark cycle. Up to five animals were kept per cage with water and food *ad libitum*. At the end of the recovery time (3 days) the animals were anesthetized intraperitoneally with a lethal dose (75 mg/kg) of thiopental sodium²⁰. This experimental protocol was approved by the ethics Committee in Animal Use (Comitê de Ética em Uso Animal - CEUA) of the University under the number P002/2012.

Stereotaxic surgery

On the day of the experiment, the animals were anesthetized with an intraperitoneal (IP) injection of ketamine (90 mg/Kg; Dopalen) and xylasin (13 mg/kg; Anasedan) and placed in the stereotactic apparatus, where they had their head immobilized. After shaving and incision in the skin of the animal, the bone was exposed for viewing Bregma (union of the bones). From there were traced coordinates from the striatum: 3 mm middle lateral and ventral and 5 mm from Bregma²¹. Using a microsyringe (Hamilton) at the coordinates mentioned above, the animals received 2 μL saline (PBS) into striatal parenchyma. The infusion of liquid was performed to simulate intratissue drug infusion, a very common protocol used by neuroscientists to induce several disease

models, such as intracerebral hemorrhage²², Parkinson's²³ and Alzheimer's disease²⁴. After infusion, the needle was gently removed and wound was sutured.

Treatment with analgesics

We used two different analgesics, CP (Pfizer) as the representative of the group of the non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and TM (Sigma Pharma) as a representative of the group of the opioids. CP dose was 5 mg/kg, injected subcutaneously. The first dose was administered immediately after SS and every 24 h postoperatively to complete 72 h, at which time the animals were euthanized.

TM dose was 10 mg/kg²⁵, injected subcutaneously. The first dose was applied immediately after SS and subsequently every 12 h, to complete 72 h postoperatively when finally the animals were euthanized. It was therefore a dose in the morning and another at night.

Behavioral assessment

The animals were submitted to three behavioral tests to investigate motor deficits, which were Open Field, Foot Fault and Beam Walking.

1) Open Field

The open field test was used to evaluate the locomotor activity of the rats. The test was performed 24 and 72 h after SS. The apparatus consists of a wooden box (60 x 40 x 50 cm) with 12 equal squares drawn on the floor. The total number of crossings (passage of the animal with the four limbs from one square to another) within five minutes was counted^{26,27}. Also, the number of rearings (position exploratory) were observed during 5 minutes.

2) Foot Fault Test

It is a behavioral test used to show functional asymmetry between motor hemisphere, found in animals with hemiparesis after unilateral lesion of the motor and sensory areas. Can highlight differences between the hemisphere for both forelimbs and for the hind limbs. The test was performed 24 e 72 h after SS. It consists of placing the rat above a metallic grid with openings measuring 3 square cm. The number of times that the animal fails to place a paw on the grid, letting it go through its openings, was counted. The percentages of motricity errors considering each side of the body were compared²⁸.

3) Beam Walking Test

The apparatus consists of a wooden cylindrical bar with 70 cm of length and 4 cm of diameter suspended 1 m above a soft surface. The animals were trained 24 h before SS to enter the dark box parting from the enlightened spot, having to cross the entire length of the bar to complete the task. This test was used to evaluate the locomotor activity of the animals 24 and 48 h after SS. The time taken by the animal to cross the bar was measured (with a maximum time of 2 minutes) and the number of times the animal slipped with a limb contralateral to the SS was counted, resulting in a score^{29,30}. The following score values were used: **0**: the animal fell off the beam or did not cross it within the given time; **1**: the animal slipped three or more times with the contralateral side to the lesion; **2**: the animal slipped two times with the contralateral side to the lesion; **3**: none to one single slip while crossing the beam.

Body Weigh and Food intake

The animals were weighed 24 h before the SS and at the end of the experimental procedures (72 h after SS). Pellets with which the animals were fed during the experimental period were weighed (g) daily from the day of SS, 24, 48 and 72 h postoperatively to measure the amount of food consumed per box treatment.

Western Blotting

To investigate GFAP immunocontent samples of the ipsilateral striatum were separated and homogenized in lysis buffer (4% SDS, 2.1 mM EDTA, 50 mM Tris). Aliquots were taken for protein determination and β -mercaptoethanol was added to a final concentration of 5%. Samples containing 75 μ g of protein were resolved by 12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). After electrophoresis, minigels were blotted onto a nitrocellulose membrane. The membranes were blocked overnight with 5% powdered milk in tween-Tris-buffered saline (M-T-TBS). Primary antibody (Anti-GFAP, 1:2000, Sigma) was incubated overnight at 4°C in M-T-TBS. After washing, the membranes were incubated for 2 h with secondary antibody (anti-mouse IgG peroxidase-conjugated, 1:1000, Cell Signaling). The 3,3',5,5' - tetramethylbenzidine (TMB-Sigma) was used to develop the reaction. After stripping, membranes were incubated overnight with anti- β -actin (1:1000, Cell Signaling), followed by 2 h with the secondary antibody (anti-rabbit IgG peroxidase-conjugated,

1:1000, Cell Signaling). After TMB reaction, membranes were scanned and the percentage of band intensity was analyzed using ImageJ. For each experiment, the content of GFAP was divided by the content of β -actin and control (without SS, TM or CP) was considered 100%.

Statistical Analysis

The results were tested for normality and analyzed by ANOVA with post-test of Newman-Keuls. All the results are specified as Mean \pm SEM. In all cases a significance level of at least 5% was used ($p < 0.05$)³¹.

RESULTS

Open Field

In this task, we quantified the number of crossings (locomotor activity) and the number of rearings (exploratory position) performed by animals in 24 and 72 h after SS (Figure 1). Locomotor activity, both in 24 (Figure 1A) and 72 h (Figure 1B) was not statistically different. This result demonstrates that neither SS neither the drugs used in this study affected locomotor activity. Regarding to exploratory position, we found a significant difference in SS+TM group compared to its control in the time of 24 h (Figure 1C). It is possible to observe that there is a significant decrease in the number of rearings only in SS+TM group after 24 h, although we see a tendency to decrease in all animals submitted do SS. Figure 1D shows us that 72 h after SS the number of rearings are the same among groups submitted or not to SS. Comparing the results from 24 (Figures 1A and 1C) and 72 h (Figures 1B and 1D) we notice that after 72 h the number of crossings and rearings were less than in 24 h. This may be because the animals already recognize the box where the test is performed, and therefore have no interest in exploring the environment.

Foot Fault Test

In this test performed to evaluate the animal motricity, no significant difference among the groups regarding the number of falls from both the right and the left limbs was observed. Neither at 24 h (Figure 2A) nor at 72 h (Figure 2B) after SS and exposed to the different analgesics the animals worst their performance in walking on the grid. This information highlights the fact that both drugs used in the study did not affect animal motricity.

Beam Walking Test

This test was performed to evaluate the animal balance and no statistical difference in score which evaluates the slip of the animal while crossing the bar was found. All the animals presented scores between 2 and 3, meaning that they presented at maximum two slips while crossing the bar. This occurred in both times that the test was carried out: 24 h (Figure 3A) and 48 h after SS (Figure 3B). Similarly to results found in the open field and in the foot fault test, TM and CP were not able to interfere with the activity of balance and equilibration of the animals.

Food intake and body weigh

To investigate if SS causes a decrease in food intake and in body weigh and if the analgesics could reverse these decrease, we investigated daily food consumption. In Figure 4A, we observe that in 24 h after SS there was no significant difference among the groups. However, 48 h (Figure 4B), and 72 h (Figure 4C) after SS there was a significant decrease in food intake in SS groups, that could not be reversed by TM nor by CP. When investigating animal weigh variation during the recovery period, we note that animals submitted to SS that received TM and CP lost more weigh than their controls. Also, animals submitted to SS that received TM lost more weigh than animals exposed to SS that did not receive analgesics (Figure 5). In addition to body weigh, we also investigated classical signal of pain such as general physical condition, vocalization when the lesion is gently touched, hunched posture and piloerection. None of these paramethers differed among groups (data not shown).

Western Blotting

Glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunocontent, an astrocytic marker, was measured to investigate a possible role of analgesics in inducing or reducing astrogliosis. The results in Figure 6 show that there was no significant difference between the groups, showing that neither SS alone nor the painkillers used in this work interfered in astrocyte activation.

DISCUSSION

The search for limited official use of laboratory animals for research and teaching led Brazil to adopt, in 2008, the Law 11.794/08³², which regulates the use of animals in scientific research and practical classes. The official Brazilian law requires adaptation on the part of higher education institutions (HEIs), immediately on some issues,

establishing deadlines for the adequacy. Currently, we experience an historic moment in our country with regard to this issue.

Nowadays, there is no more need to discuss the evidence for the ability of the animals to suffer pain and fear, because such discussions have become irrelevant. The development of scientific knowledge in the area of physiology does not allow more that stance. It is necessary that all the scientists and animal handlers understand that any stimulus that activates nociceptors or similar structures that produce aversive response must be understood as painful. And the concern for minimizing these painful stimuli would be ethically proper attitude, regardless of the animal species³³.

In this context, our study evaluated the effect of a postoperative protocol for analgesia in rats, using behavioral motor tests, food intake and body weigh and reactive astrogliosis as parameters that could change after analgesic administration. To assess the locomotor activity of animals, we performed behavioral tests 24, 48 and 72 h after SS (Figures 1-3). According to the results found here only one significant difference regarding rearings in the open field test was observed in animals from group SS + TM in the time of 24 h. In lesioned animals, TM was able to decrease their exploratory performance. This could be explained by the fact that one of the side effects known to TM is that they may cause motor weakness. When TM was used in control animals these effect was not evident, but when combined with SS, that is a debilitating condition, it probably caused a muscle weakness in those animals, that had more difficult to stay in a biped position. When analyzed 72 h after SS animals demonstrated the same numbers of rearings than controls, maybe because the effect of SS was not evident after 3 days.

Our results are in accordance with the ones published by Tubbs and colleagues³⁴, in 2011, which also found no statistical difference in crossings of the task of open field in animals that suffered nociceptive processes and were treated with nanoencapsulated or the free form of meloxicam. A study performed by Lekic and collaborators in 2011³⁵, shows that the locomotor activity through the open field is not different between naive and animals submitted to SS, suggesting that these cirurgical procedure alone is not able to interfere with locomotor capacity.

Another behavioral test used in our study to evaluate the motor activity of animals was foot fault test (Figure 2). According to the results presented no statistical difference between the experimental groups. This is in agreement with the study of Zhang et al. (2005)³⁶, in which he used the model of cerebral ischemia and after the

behavioral tests conducted on days 1, 7, 14, 21 and 30 after injury. In this case, he used two control groups (who also suffered the process of ischemia), one he called "young group", in which the animals were 8-12 weeks of age, and the other group he called "aged group", in which the animals had 18 months of life and can realize that these animals did not have statistically significant difference in the times analyzed when the test was applied. In discussing their results on the foot fault test he suggests that maybe the test is not sensitive enough to identify motor deficits that can cause ischemia.

In addition to the open field test and foot fault, we also conducted the beam walking test. In this test, shown in figure 3, we did not find statistically significant differences between the experimental groups both at 24 h after the SS, as in the time of 48 h after SS. There is a study in which animals were subjected to a sensory motor cortex brain injury by an ablation method and were subjected to the beam walking test after surgery to test the resilience of the hind legs of the animal. The results showed no significant difference³⁷.

Another significant result we found in our study is in relation to the weigh of the animals, assessed 24 h before and 72 h after the surgery (Figure 5). We observed that groups SS+TM and SS+CP lost significantly more weigh than the controls, moreover, specifically SS+TM group lost more weigh than SS group, that did not received analgesics. This may be due to the fact that TM can cause changes in the appetite of animals as one of its side effects. There is also another study in which the results of weigh loss are similar to our findings. They evaluated different opioids and found that, when given only a single dose of the painkiller the animal does not lose weigh. Otherwise, all opioids tested in more than one dose, caused changes in food intake, and consequently resulted in a weigh loss³⁸. These data may explain why the food intake decreased with time (Fig. 4B and C).

To investigate if astrocytes could be reactive after SS or after TM and CP administration we have investigated GFAP immunocontent (Figure 6). We found that neither SS nor the drugs were able to induce astrocyte reaction, which is an important finding to neuroscientists. It is well known that reactive astrocytes increase after injuries and that this activation is related to scar formation, release of trophic factors, blood-brain-barrier repairment, neovascularization and neurogenesis stimulation³⁹. The reactive astrogliosis is a major component of cellular response to injury of the brain and has been suggested as an attempt to restore cellular homeostasis through the insulation

of the damaged region⁴⁰ in an attempt to reconstruct the BBB and facilitate axonal regeneration around the damaged area⁴¹.

The fact that GFAP is not affected by SS, TM and CP suggests us that, at least for this parameter, the processes cited above are not being modified. However, we can not discharge that, in the presence of a lesion model, analgesics do interfere in astrogliosis. The fact that lesions in general causes inflammation^{42,43,44,45} and that CP is an anti-inflammatory agent need to be taken into account^{41,46,47,48}. In the same direction of our results, a study performed by Roman and colleagues in 2011⁴⁹ showed that in spinal cord injury CP administered for 7 days to manage the pain of the animals treated with nanotubes did not present evidence of reactive astrogliosis⁴⁹.

The study by Hutchinson in 2011⁵⁰ investigating the effects of opioids in neuroimmunofarmacology reports showed that long-term (five days) opioids may increase the expression of GFAP in astrocytes. This fact, which differs from the results found in our study, may be explained because in our experiments TM, was not managed by long-term, but only for a period of three consecutive days after the SS.

In conclusion, both analgesics used in this study did not significantly harmed the parameters we have investigated and are a good choice of drugs to be used in the routine in laboratories that performs SS. However, more studies are necessary to investigate other specific parameters and other experimental models, mainly acute and chronic lesion models.

ACKNOWLEDGMENTS

Maria Fernanda Dorrego Antunes was a fellow from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). The authors thank to Alice Teixeira Meirelles Leite for technical assistance providing animal care and Luiza Maria Macedo Braga and Daniela Marti Barros for critical reviewing of the manuscript.

REFERENCES

- 1-Cardoso C. Legislação brasileira para o uso de animais em pesquisa. *Cuidado e Manejo de animais de laboratório* 2010; 11-28.
- 2-Molento CFM. Animal welfare and production: economic aspects – Review. *Arch of Vet Sci* 2005; 10: 1-11.
- 3-Broom DM. The scientific assessment of animal welfare. *Applied Animal Behaviour Science. Amsterdam* 1988; 20: 5-19.
- 4-Molony V and Kent E. Assessment of acute pain in farm animals using behavioral and physiological measurements. *J Anim Sci* 1997, 75: 266-272.
- 5-Flecknell P. Refinement of animal use-assessment and alleviation of pain and distress. *Lab Anim* 1994; 28: 222-231.
- 6-Willis CL and Davis TP. Chronic Inflammatory Pain and the Neurovascular Unit: A Central Role for Glia in Maintaining BBB Integrity? *Current Pharmaceutical Design* 2008; 14: 1625-43.
- 7-Huber JD, Witt KA, Hom S, et al. Inflammatory pain alters blood-brain barrier permeability and tight junctional protein expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280: H1241–H1248.
- 8-Sikes RW, Vogt LJ, Vogt BA. Distribution and Properties of Visceral Nociceptive Neurons in Rabbit Cingulate Cortex. *Pain* 2008; 135(1-2): 160–174.
- 9-Hampshire VA, Davis JA, McNickle CA, et al. Retrospective comparison of rat recovery weights using inhalation and injectable anaesthetics, nutritional and fluid supplementation for right unilateral neurosurgical lesioning. *Lab Anim* 2001; 35: 223-229.
- 10-Baumans V, Brain PF, Brugère H, et al. Pain and distress in laboratory rodents and lagomorphs: Report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) Working Group on Pain and Distress accepted by the FELASA Board of Management November 1992. *Lab Anim* 1994, 28: 97-112.
- 11-Paxinus G. and Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Elsevier Academic Press. Sixth ed., Amsterdam. 2007.
- 12-Tindall B. The importance of post-operative analgesia. Guest Editorial. *Br Vet J* 1993.
- 13-Miller GC, Valenti L, Britt H, et al. Drugs causing adverse events in patients aged 45 or older: a randomised survey of Australian general practice patients. *BMJ Open* 2013; 3: e003701.

- 14-Banerjee M, Pal S, Bhattacharya B, et al. A comparative study of efficacy and safety of gabapentin versus amitriptyline as coanalgesics in patients receiving opioid analgesics for neuropathic pain in malignancy. *Indian J Pharmacol* 2013; 45(4): 334-8.
- 15-Busse JW, Schandelmaier S, Kamaleldin M, et al. Opioids for chronic non-cancer pain: a protocol for a systematic review of randomized controlled trials. *Syst Rev* 2013, 2:66.
- 16-Gao HM, Liu B, Zhang W, et al. Novel anti-inflammatory therapy for Parkinson's disease. *Pharmacoll Sci* 2003; vol.24 No.8.
- 17-Andreasson K, Savonenko A, Videnky S, et al. Age-Dependent Cognitive Deficits and Neuronal Apoptosis in Cyclooxygenase-2 Transgenic Mice. *J Neurosci* 2001; 21(20): 8198–8209.
- 18-Nogawa S, Zhang F, Ross ME, et al. Cyclo-Oxygenase-2 Gene Expression in Neurons Contributes to Ischemic Brain Damage. *J Neurosci* 1997; 17(8): 2746–55.
- 19-Vonkeman HE and Laar VMA. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: Adverse Effects and Their Prevention. *Elsevier Inc. Semin Arthritis Rheum* 2010; 39: 294-312.
- 20-Leary S, Underwood W, Lilly E, et al. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition. *American Veterinary Medical Association* 2013; 5-98.
- 21-Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Sydney: Academic Press; 1998.
- 22-Rosenberg GA, Mun-Bryce S, Wesley M, et al. Collagenase-Induced Intracerebral Hemorrhage in Rats. *Stroke* 1990; 21: 801-807.
- 23-Dauer W, Kholodilov N, Vila M, et al. Resistance of a-synuclein null mice to the Parkinsonian neurotoxin MPTP. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002; 99: 14524-29.
- 24-Roberson ED, Scarce-Levie K, Palop J, et al. Reducing Endogenous Tau Ameliorates Amyloid b-Induced Deficits in an Alzheimer's Disease Mouse Model. *Science* 2007; 316: 750.
- 25-Carpenter JW, *Exotic animal formulary*. Elsevier, Fourth Edition. 2013, p. 724.
- 26-Barros DM, Ramirez MR, Reis EA, Izquierdo I. Participation of hippocampal nicotinic receptors in acquisition, consolidation and retrieval of memory for one trial inhibitory avoidance in rats. *Neurosci* 2004; 126: 651-6.
- 27-Vianna MR, Izquierdo LA, Barros DM. Pharmacological differences between memory consolidation of habituation to an open field and inhibitory avoidance learning. *Bras J Med Biol Res* 2001; 34: 233-240.
- 28-Nishibe M, Barbay S, Guggenmos D, et al. Reorganization of Motor Cortex after Controlled Cortical Impact in Rats and Implications for Functional Recovery. *J Neurotrauma* 2010; 27: 2221-32.

- 29-Beray-Berthat V, Delifer C, Besson VC, et al. Long term histological and behavioural characterisation of a collagenase induced model of intracerebral haemorrhage in rats. *J. Neurosci. Methods* 2010; 191: 180-190.
- 30-Jover R, Rodrigo R, Felipe V, et al. Brain Edema and Inflammatory Activation in Bile Duct Ligated Rats with Diet-Induced Hyperammonemia: A Model of Hepatic Encephalopathy in Cirrhosis. *Hepatol* 2006; 43: 1257-66.
- 31-Zar JH. *Biostatistical analysis*. 2ª ed. Prentice Hall, New Jersey, 1984.
- 32-Brasil. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. Diário Oficial da União. 9 out 2008;(196):Seção 1; p.1-4.
- 33-Rivera EAB. “Bem-estar animal.” *Cuidado e manejo de animais de laboratório*. 2010, p. 59-69.
- 34-Tubss JT, Kissling GE, Travlos GS, et al. Effects of Buprenorphine, Meloxicam, and Flunixin Meglumine as Postoperative Analgesia in Mice. *J of the Am Assoc for Lab Animal Sci* 2011; 50: 185–191.
- 35-Lekic T, Rolland W, Hartman R, et al. Characterization of the brain injury, neurobehavioral profiles, and histopathology in a rat model of cerebellar hemorrhage. *Exp Neurol* 2010; 227: 96–103.
- 36-Zhang L, Zhang RL, Wang Y, et al. Functional Recovery in Aged and Young Rats After Embolic Stroke. *Stroke* 2005; 36: 847-852.
- 37-Goldstein LB. Right vs. left sensorimotor cortex suction-ablation in the rat: no difference in beam-walking recovery. *Brain Res* 1995; 674 (1): 167-170.
- 38-Liles JH and Flecknell PA. The effects of buprenorphine, nalbuphine and butorphanol alone or following halothane anaesthesia on food and water consumption and locomotor movement in rats. *Lab Anim* 1992; 26: 180-189.
- 39-Liberto CM, Albrecht PJ, Herx LM, et al. Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *J Neurochemistry* 2004 89: 1092–1100.
- 40-Zhang D, Hu X, Qian L, et al. Astroglialosis in CNS pathologies: is there a role for microglia? *Mol. Neurobiol* 2010, 41: 232–241.
- 41-Pekny M, et al. The role of astrocytes and complement system in neural plasticity. *Int Rev Neurobiol*. 2007, 82: 95-111.
- 42-Pérez-Álvarez MJ, Maza MC, Anton M, et al. Post-ischemic estradiol treatment reduced glial response and triggers distinct cortical and hippocampal signaling in a rat model of cerebral ischemia. *J Neuroinflammation* 2012; 9:157.

- 43-Ekdahl CT, Claassen JH, Bonde S, et al. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *PNAS* 2003; 100 (23): 13632–37.
- 44-Ryu JK, Cho T, Yyu TW, et al. Neural progenitor cells attenuate inflammatory reactivity and neuronal loss in an animal model of inflamed AD brain. *J Neuroinflammation* 2009; 6:39.
- 45-Benvenisti-Zarom L and Fegan RF. Astrocyte-Specific Heme Oxygenase-1 Hyperexpression Attenuates Heme-Mediated Oxidative Injury. *Neurobiol Dis* 2007; 26(3): 688–695.
- 46-Béraud D, Hannah A, Hathaway JT, et al. Microglial Activation and Antioxidant Responses Induced by the Parkinson's Disease Protein α -Synuclein. *J Neuroimmune Pharmacol* 2013; 8:94–117.
- 47-Penta A, Moreno B, Reix S, et al. Oxidative Stress and Proinflammatory Cytokines Contribute to Demyelination and Axonal Damage in a Cerebellar Culture Model of Neuroinflammation. *PLOS One* 2013; 8(2): e54722.
- 48-Whitton PS. Inflammation as a causative factor in the aetiology of Parkinson's disease. *British Journal of Pharmacology* 2007; 150: 963–976.
- 49-Roman JA, Niedzielko TL, Haddon RC, et al. Single-Walled Carbon Nanotubes Chemically Functionalized with Polyethylene Glycol Promote Tissue Repair in a Rat Model of Spinal Cord Injury. *J of Neurotrauma* 2011, 28:2349–62.
- 50-Hutchinson MR, Shavit Y, Grace PM, et al. Exploring the Neuroimmunopharmacology of Opioids: An Integrative Review of Mechanisms of Central Immune Signaling and Their Implications for Opioid Analgesia. *Pharmacol Rev* 2011, 63:772–810.

Legends to the figures

Figure 1: Open field test performed 24 and 72 h after stereotaxic surgery. The number of crossings at 24 (A) and 72 h (B) and the number of rearings at 24 (C) and 72 h (D) after SS are shown (n = 8-12, * means $p < 0.05$).

Figure 2: Foot fault test performed 24 and 72 h after stereotaxic surgery. The percentage of motricity errors with the right and left limbs were quantified 24 (A) and 72 h (B) after the SS. Both figures demonstrate that there was not statistical difference among experimental groups (n = 7-12, $p > 0.05$). RS: right limbs falls; LS: left limbs falls.

Figure 3: Beam walking test performed 24 and 48 h after stereotaxic surgery. The locomot capacity and the beam of the animals were scored as described in Methods section at 24 (A) and 72 h (b) after the SS. Both figures show that there was not no statistical difference among groups (n = 7-10, $p > 0.05$).

Figure 4: Food intake 24, 48 and 72 h after the stereotaxic surgery and the analgesics administration. This figure shows the food intake in grams (g) per animal 24 h (A), 48 (B) and 72 h (C) after the SS and the analgesics treatment. (n = 4, ** = $p < 0.01$ and * = $p < 0.05$).

Figure 5: Body weigh is influenced by tramadol and carprofen administration. This figure shows the weigh of the animals 72 h after SS and the analgesics administration. (n = 8-11, * means different from the respective control: * = $p < 0.05$ and ** = $p < 0.01$; ## means different from SS, $p < 0.01$).

Figure 6: Stereotaxic surgery ,tramadol and carprofendo not interefere in GFAP content. GFAP immunocontent in the striatum of animals was measured by Western blotting. This figure shows that there was no statistical difference between the groups (n = 6-7, $p > 0.05$).

Figures

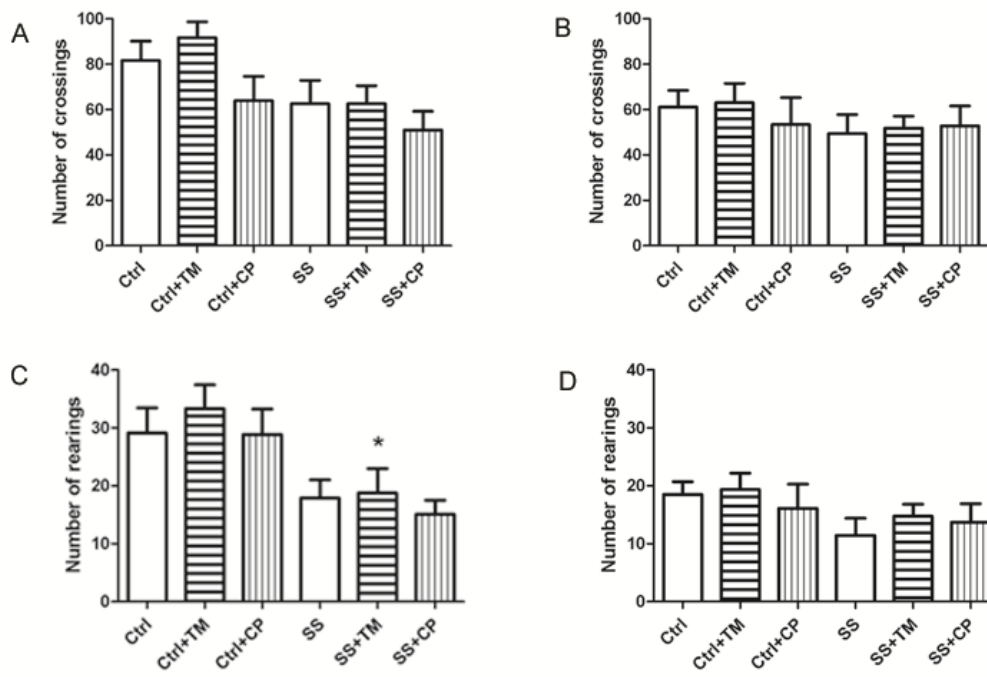


Figure 1

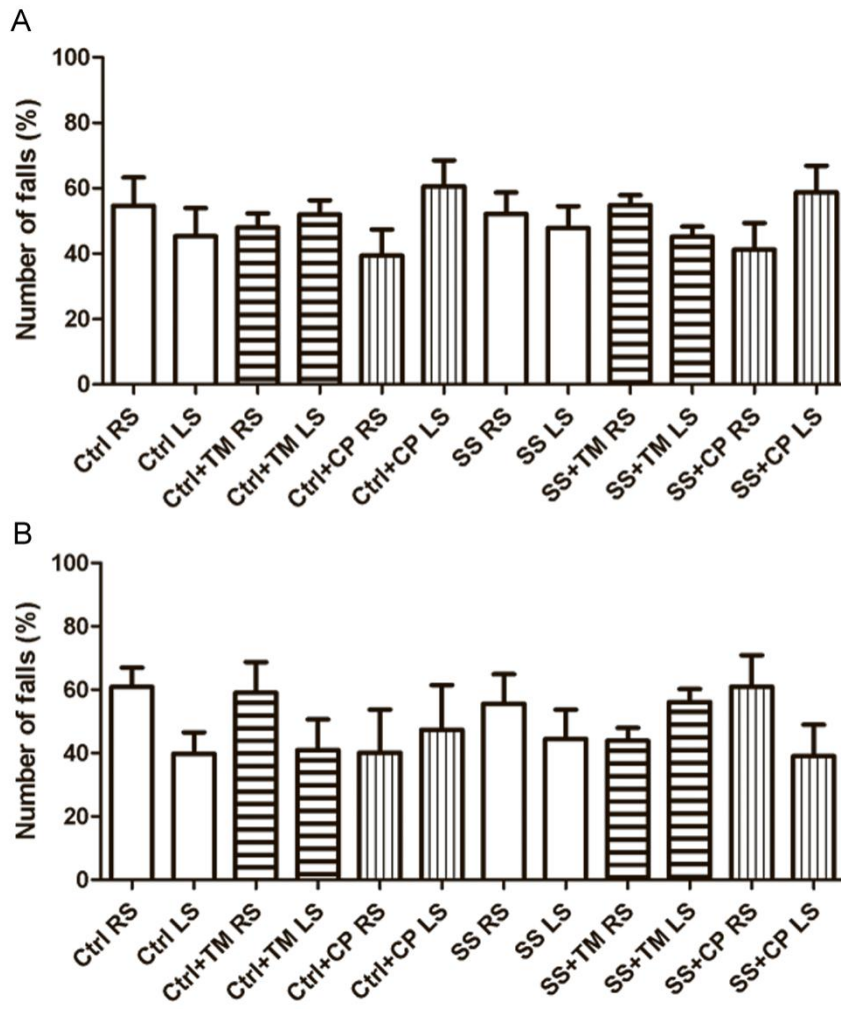


Figure 2

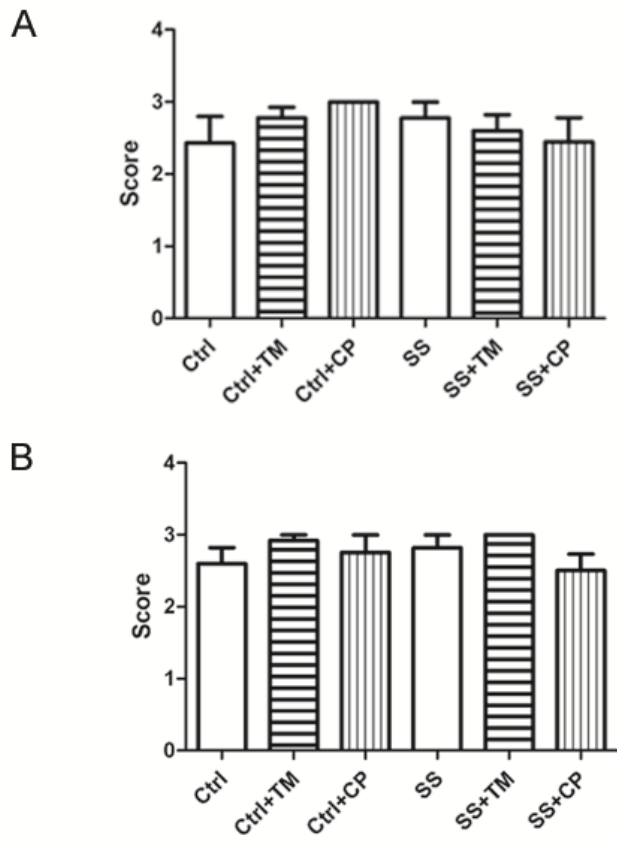


Figure 3

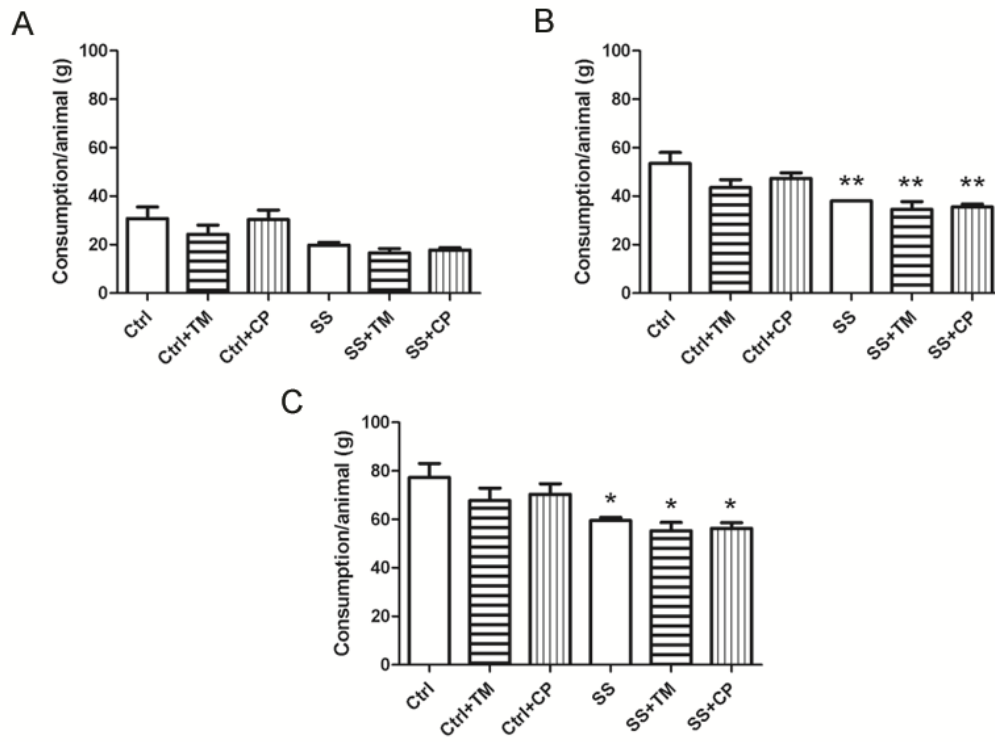


Figure 4

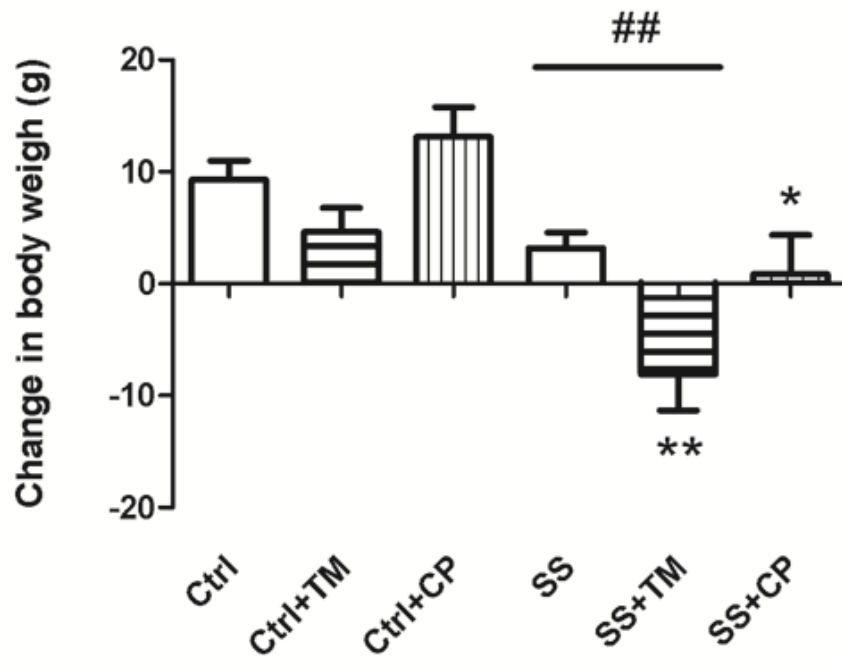


Figure 5

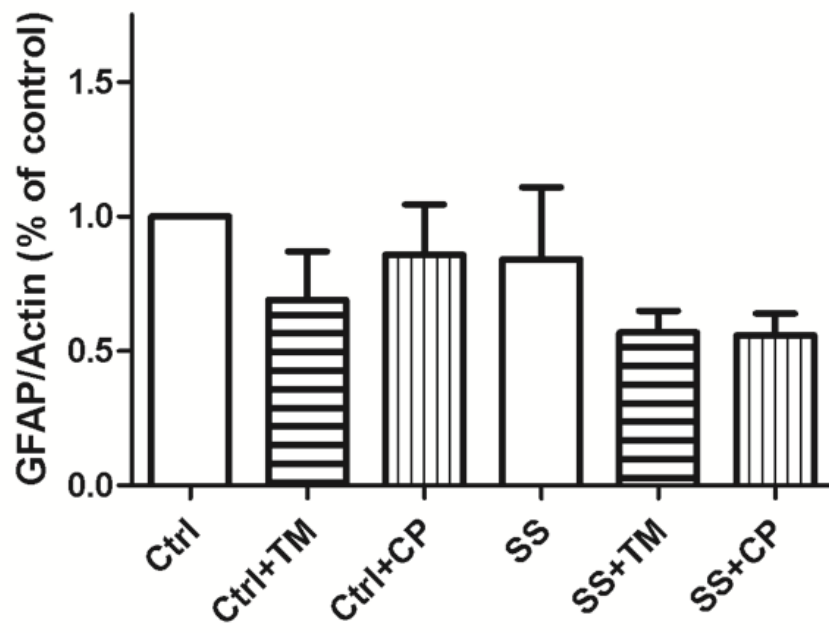


Figure 6

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Durante a execução desse trabalho, padronizamos dois testes comportamentais motores, o *Beam Walking* (Teste de Motricidade em Haste Elevada) e o *Foot Fault* (Teste de Motricidade em Grade). Analisando os resultados obtidos, podemos concluir que os analgésicos utilizados, Carprofeno (CP) e Tramadol (TM), são uma boa opção para a dor pós-operatória em roedores, visto que não afetam a atividade locomotora dos animais. Porém, mais estudos ainda são necessários para verificar a viabilidade de outras vias de administração, além da aplicação de um tratamento crônico, ou seja, com mais tempo de aplicação dos analgésicos.

1. PERSPECTIVAS

- Avaliar o efeito dos analgésicos na ativação microglial através da imunohistoquímica para as proteínas CD11b e ED-1;
- Investigar possíveis oscilações nos níveis de citocinas pró-inflamatórias causadas pelo estresse do processo algico e se os analgésicos testados interferem nesses níveis;
- Avaliar o efeito de outros analgésicos e outras vias de administração para verificar seus efeitos na análise visual do animal estudado, tais como: piloereção, postura encurvada, automutilação, vocalizações em presença de toque ou não;
- Estudar o efeito dos analgésicos no modelo de Hemorragia Intracerebral (HIC);
- Investigar se a administração dos analgésicos é capaz de diminuir o hematoma, o tamanho da lesão e o edema causado pela HIC em ratos;
- Investigar se a HIC causa mudanças na ingestão de ração e no peso dos animais e se os analgésicos são capazes de interferir nessa possível alteração;
- Investigar se a HIC causa possíveis alterações na locomoção, coordenação motora e equilíbrio nos animais e se os analgésicos são capazes de interferir nessas possíveis mudanças.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALENKA S.K., *et al.*, “Intra-and post-operative analgesic effects of carprofen in medetomidine premedicated dogs undergoing ovariectomy.” **Acta Veterinaria (Beograd)**. 2005, v. 55, No. 5-6, p. 435-448.
- ANDRADE, A. *et al.*, “O bioterismo: evolução e importância.” **Animais de Laboratório Criação e Experimentação**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2002, cap. 1, p. 19-22.
- BAMIGBADE T.A., *et al.*, “Actions of tramadol, its enantiomer and principal metabolite O-desmethyltramadol, on serotonin (5-HT) efflux and uptake in the rat dorsal raphe nucleus.” **British Journal of Anaesthesia**. 1997, v. 79, p. 352-356.
- BOTTING, R.M. “Cyclooxygenase: Past, present and future. A tribute to John R. Vane(1927–2004).” **Journal of Thermal Biology**. 2006, v. 31, p. 208–219.
- BRICKS L.F., “Analgesics, antipyretics and antiinflammatory drugs: Toxicity.” **Pediatrics (São Paulo)**. 1998, v. 20(2), p. 126-136.
- BROOM, D.M., “The scientific assessment of animal welfare.” **Applied Animal Behaviour Science**. Amsterdam. 1988, v.20, p.5-19.
- BROOM, D.M., “Animal welfare: concepts and measurement.” **Journal of Animal Science**. U.S.A. 1991, v. 68, p.4167-4175.
- BROOM, D.M., “Animal welfare defined in terms of at tempts to cope with environment.” **Acta Agriculturae Scandinavica**, Section A Animal Science Suppl., Ireland. 1996, v. 27, p. 22-28.
- CARBONE L., “Pain in Laboratory Animals: The Ethical and Regulatory Imperatives.” **PLoS ONE**. 2011, v. 6, p. 1-6.
- CARDOSO C., “Legislação brasileira para o uso de animais em pesquisa.” **Cuidado e Manejo de animais de laboratório**. 2010, p. 11-28.
- CARPENTER J.W., “Exotic animal formulary.” **Elsevier, Fourth Edition**. 2013, p. 724.
- CASTRO S.O., “Reconhecimento do comportamento de dor.” **Cuidado e Manejo de Animais de Laboratório**. 2010, p. 549-559.
- CAVALCANTE L.F.H., *et al.*, ” Intoxicação por carprofeno em cães.” **Revista da FZVA**. 2008, v. 15, p. 160-171.
- CLARK A.K., *et al.*, “Inhibition of spinal microglial cathepsin S for the reversal of neuropathic pain.” **PNAS**. 2007, v. 104, p. 10655–10660.
- CLARK, J.D., *et al.*, “Animal well-being II. Stress and Distress.” **Laboratorial Animal Science**, U.S.A. 1997, v. 47, n.6, p.571-579.

-CRISSIUMA, A.L., “A importância da bioética no ensino superior.” **Monografia (especialização) –Universidade Gama Filho**, Rio de Janeiro. 2002, p.66.

-CUNHA, T.M., *et al.*, “A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice.” **Proceedings of the National Academy of Science of United States of the North American**. 2005, v. 102, p. 1755-1760.

-DBCA (Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos), **Conselho nacional de controle de experimentação animal resolução normativa no-12, de 20 de setembro de 2013**. Marco Antonio Raupp. Disponível em: <http://www.in.gov.br/imprensa/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=52&data=25/09/2013>.

-ENGELHARDT G., “Pharmacology of meloxicam, a new non-steroidal anti-inflammatory drug with an improved safety profile through preferential inhibition of cox-2.” **British Journal of Rheumatology**. 1996, v.35, p. 4-12.

-FARSCCHI A., *et al.*, “Comparison the Analgesic Effects of Single Dose Administration of Tramadol or Piroxicam on Postoperative Pain after Cesarean Delivery.” **Acta Medica Iranica**. 2010, v. 48(3), p. 148-153.

-FLECKNELL P., “Analgesia from a veterinary perspective.” **British Journal of Anaesthesia**. 2008, v. 101, n. 1, 121–124.

-FLECKNELL P., “Refinement of animal use-assessment and alleviation of pain and distress.” **Laboratory Animals**. 1994, v. 28, p. 222-231.

-GUÉRIOS S.D., *et al.*, “Exame gastroscópico após administração oral de anti-inflamatório não esteroidais em cães.” **Archives of Veterinary Science**. 2002, v. 7, n. 2, p. 53-58.

-HUBER J.D., *et al.*, “Inflammatory pain alters blood-brain barrier permeability and tight junctional protein expression.” **Heart and Circulatory Physiology - American Journal of Physiology**. 2001, v. 280, n. H1241–H1248.

-KATZUNG, B. G., “Farmacologia Básica e Clínica.” **Porto Alegre, AMGH Editora**, 2010, 10 ed., P. 1060.

-HARTMANN B. *et al.*, “The AMPA Receptor Subunits GluR-A and GluR-B Reciprocally Modulate Spinal Synaptic Plasticity and Inflammatory Pain.” **Neuron**. 2004, v. 44, p. 637–650.

-HILÁRIO, M.O.E., *et al.*, “Antiinflamatórios não-hormonais: inibidores da ciclooxigenase 2.” **Jornal de Pediatria**. 2006, v. 82, n.5.

-HUCHO T.B., *et al.*, “Epac Mediates a cAMP-to-PKC Signaling in Inflammatory Pain: An Isolectin B4(+) Neuron-Specific Mechanism.” **The Journal of Neuroscience**. 2005, v. 25(26), p. 6119–6126.

- LEE, S., CHO, B.K., KIM, M.D. "Hypertensive Encephalopathy with Reversible Brainstem Edema." **Journal Korean Neurosurgery Society**. 2013, v. 54, p. 139-141.
- LEE J.L., MUKHTAR H., BICKERS D.R. KOPELOVICH L., ATHAR M. "Cyclooxygenase in the skin: pharmacological and toxicological implications." **Toxicology and Applied Pharmacology**. 2003, v. 192, p. 294-306.
- LEMKE, K.A. "Understanding the pathophysiology of perioperative pain." **Canadian Veterinary Journal**. 2004, v. 45, p. 405-413.
- McMILLAN, F.D., "Influence of mental states on somatic health in animals." **Journal of the American Veterinary Medical Association**, U.S.A. 1999, v. 214, n. 8, p. 1221-1225.
- MITCHELL M.A., "Carprofen." Therapeutic Review. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**. 2005, v. 14, No. 1, p. 61–64.
- MERSKEY H., "Pain terms: a list with definitions and a note on usage." **Recommended by the International Association for the Study of Pain (IASP) Subcommittee on Taxonomy**. 1979, v. 6, P. 249-252.
- MOLENTO, C.F.M., "Animal welfare and production: economic aspects – Review." **Archives of Veterinary Science**. 2005, v. 10, n. 1, p. 1-11.
- MORRISEY J.K., *et al.*, "Ferrets, rabbits and rodents: clinical medicine and surgery." **Third edition, Elsevier**. 2012, p. 566-575.
- MUNFORD R.S. and PUGIN J., "Normal Responses to Injury Prevent Systemic Inflammation and Can Be Immunosuppressive." **American Journal Respiratory Critical Care Medicine**. 2001, v. 163. P. 316–321.
- OLFERT E., "Guidelines on: choosing and appropriate endpoint in experiments using animals for research, teaching and testing." **Canadian Council on Animal Care**. 1998, p. 1-33.
- PAIXÃO, R.L., *et al.*, "Ethics and animal experimentation: what is debated?" **Caderno de Saúde Pública**. Rio de Janeiro. 1999, v. 15(Sup. 1), p. 99-110.
- PANUS P.C., *et al.*, "Farmacologia para fisioterapeutas." **AMGH Editora Ltda**. 2011, p. 241-258.
- PERRY J.H., *et al.*, "Stereotactic surgery apparatus and method." **United States Patent**. 1982.
- PIMPÃO C.T., *et al.*, "Avaliação do carprofeno e do meloxicam como antipiréticos em cães." **Revista Acadêmica Ciência Agrária Ambiental**. 2009, v. 7, p. 331-339.
- POMPEU E. "Analgesia e anestesia." **Cuidado e Manejo de Animais de Laboratório**. 2010, p. 561-674.

- RAEKALLIO M., *et al.*, “Pain Alleviation in Animals: Attitudes and Practices of Finnish Veterinarians.” **The Veterinary Journal**. 2003, v. 165, p. 131–135.
- RANG, H.P., *et al.*, “Farmacologia.” **Elsevier Editora Ltda**, RJ, 5. ed., 904 p., 2003.
- RIVERA E.A.B., “Bem-estar animal”. **Cuidado e manejo de animais de laboratório**. 2010, p. 59-69.
- RIVERA E.A.B., “Bem-estar na experimentação animal.” **Animais na pesquisa e no ensino: aspectos éticos e técnicos**. 2010, P. 74-88.
- RIVERA E.A.B., “Estresse em animais de laboratório.” **Editora Fiocruz**. 2002, p. 263-273.
- RUSSEL R.I., “COX-2 inhibitors.” **The Lancet**. 1999, v. 353, p. 1439.
- WALDER R.Y., *et al.*, “ASIC1 and ASIC3 Play Different Roles in the Development of Hyperalgesia Following Inflammatory Muscle Injury.” **Journal of Pain**. 2010, v. 11(3), p. 210–218.
- WHEELER B.W., *et al.*, “Population impact of regulatory activity restricting prescribing of COX-2 inhibitors: ecological study.” **British Journal of Clinical Pharmacology**. 2009, v. 68:5, p. 752–764.
- WILLIS C.L. and DAVIS T.P. “Chronic Inflammatory Pain and the Neurovascular Unit: A Central Role for Glia in Maintaining BBB Integrity?” **Current Pharmaceutical Design**. 2008, v. 14, p. 1625-43.
- WOOLF, C.J. “Somatic pain – Pathogenesis and prevention.” **British Journal Anaesthesia**. 1995, v.75, p.169-176.
- SANDKUHLER J., “Models and Mechanisms of Hyperalgesia and Allodynia.” **American Physiological Society**. 2009, p. 707-741.
- SCHOFFNEGGER D., *et al.*, “Spread of excitation across modality borders in spinal dorsal horn of neuropathic rats.” **Pain**. 2008, p. 300-310.
- SHOELSON S.E .; LEE, J. “Inflammation and the IKK beta/I kappa B/NF-kappa B axis in obesity- and diet-induced insulin resistance.” **International Journal of Obesity**. 2003, v. 27, n.3, p. 49-52.
- SILVA G.M.A., “World cong. Altern. Animal Use life Sci.” **AATEX**. 2007, v. 14, p. 91-92.
- STEAGALL P.V.M., “Efeitos do carprofeno e da buprenorfina no limiar nociceptivo mecânico com ou sem a presença de foco inflamatório em gatos.” **Tese UNESP Botucatu**. 2007.
- TINDALL B., “The importance of post-operative analgesia.” **Guest Editorial. British Veterinary Journal**. 1993.

-TRECOT A.M., *et al.*, “Opioid Guidelines in the Management of Chronic Non-Cancer Pain.” **Pain Physician**. 2006, v. 9, p. 1-40.

-TSAGARELI M.G., “Pain and memory: Do they share similar mechanisms?” **World Journal of Neuroscience**. 2013, v. 3, p. 39-48.

-VERGNOLLE, N. “Protease-activated receptors and inflammatory hyperalgesia.” **Memorial Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**. 2005, v. 100(Suppl. I): 173-176.

-VONKEMAN H.E., *et al.*, “Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: Adverse Effects and Their Prevention.” **Seminars Arthritis Rheumatology**. 2010, v. 39, p. 294-312.

-ZHAO J., *et al.*, “Small RNAs Control Sodium Channel Expression, Nociceptor Excitability, and Pain Thresholds.” **Journal of Neuroscience**. 2010, v. 30(32), p. 10860–10871.

-ZHU Y. *et al.*, “Cyclooxygenase-2 Expression and Prostanoid Biogenesis Reflect Clinical Phenotype in Human Colorectal Fibroblast Strains.” **Cancer Research**. 2003, v. 63, p. 522-526.