



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

João Vítor Alves Hoepers

**REFINAMENTO ANESTÉSICO-ANALGÉSICO PARA APLICAÇÃO EM ENSAIOS
NÃO CLÍNICOS QUE UTILIZAM PROCEDIMENTOS INVASIVOS EM
CAMUNDONGOS**

FLORIANÓPOLIS

2022

João Vítor Alves Hoepers

**REFINAMENTO ANESTÉSICO-ANALGÉSICO PARA APLICAÇÃO EM ENSAIOS
NÃO CLÍNICOS QUE UTILIZAM PROCEDIMENTOS INVASIVOS EM
CAMUNDONGOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à disciplina de TCC II do Curso de Graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Farmacêutico

Orientador: Prof. Dr. Juliano Ferreira.

FLORIANÓPOLIS

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Hoepers, João Vítor

Refinamento Anestésico Analgésico para aplicação em
ensaios não clínicos que utilizam procedimentos invasivos
em camundongos / João Vítor Hoepers ; orientador, Juliano
Ferreira, 2022.

48 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Camundongos. 3. Ensaio não clínicos. 4.
Anestesia . 5. Analgesia. I. Ferreira, Juliano . II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em
Farmácia. III. Título.

João Vítor Alves Hoepers

**Refinamento Anestésico – Analgésico para aplicação em ensaios não clínicos
que utilizam procedimentos invasivos em camundongos**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do grau de Farmacêutico, e aprovado em sua forma final pelo Curso de Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 16 de dezembro de 2022.

Prof. Dra. Liliete Canes Souza.

Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Juliano Ferreira

Orientador

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Alfeu Zanotto Filho (Membro titular)

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dra. Beatriz Garcia Mendes Borba (Membro titular)

Universidade Federal do Amazonas

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo apoio desde que entrei na graduação, por ter dado toda ajuda e suporte necessário sempre. Edgar, Nélida, Carol e Helena, vocês são muito importantes para mim. Pai, obrigado por me fazer ter gosto por ajudar as pessoas, você como farmacêutico com certeza é minha inspiração e já estarei feliz sendo 1% do profissional que você é. Mãe, obrigado por toda a educação que foi me dada, todo o seu esforço com certeza valeu a pena para me fazer uma pessoa melhor.

À minha namorada, Maria Eduarda, por me fazer tão feliz em todos os momentos, pelos conselhos, pela companhia e pela vida prazerosa que quero dividir contigo. Amor, saiba que te amo muito, e que teremos um futuro incrível pela frente!

Aos meus avós, vovó, vovô e nona, por sempre acreditarem em mim e quererem meu melhor.

Ao meu professor e orientador, Juliano, por me mostrar o caminho da ciência e por me fazer pensar como um pesquisador, sempre de forma leve e didática.

Aos meus amigos, Vitor, Matheus, Maria Claudia, Douglas, Elison, André e todos os outros amigos e colegas que me proporcionaram momentos incríveis e me ajudaram ao longo da graduação.

Às integrantes do LAFEX, Maria Claudia, Manuella, Marcella, Roberta, Ana, Clarice e Mainara, as quais me abriram várias portas e que me integraram ao meio científico.

Aos integrantes da banca avaliadora, pelo interesse em minha pesquisa e disponibilidade.

À Equipe Biocelltis, pelos conhecimentos adquiridos durante meu estágio final e apoio ao meu projeto.

À Universidade Federal de Santa Catarina, por ter me dado um ensino de qualidade e proporcionado a minha formação no curso de Farmácia.

RESUMO

Introdução - Ensaios não-clínicos, especialmente utilizando camundongos, são essenciais para a definição de eficácia e segurança durante o desenvolvimento de novos fármacos ou produtos médicos. Muitos desses ensaios usam procedimentos invasivos, como cirurgias e queimaduras que podem causar dor e sofrimento duradouros nos animais envolvidos. Nesses casos, o manejo inadequado da dor afeta o bem-estar animal e a validade dos dados científicos em ensaios não-clínicos. Infelizmente, a anestesia e analgesia em procedimentos invasivos em camundongos é pouco satisfatória, com uso de anestésicos gerais injetáveis (p.ex. cetamina + xilazina), anestésicos locais de curta duração (p.ex. lidocaína), analgésicos opioides administrados repetidamente (buprenorfina subcutânea) e/ou analgésicos não-opioides com baixa eficácia e curta duração (p.ex. paracetamol). Além disso, a avaliação de dor e bem-estar dos animais de laboratório durante procedimentos invasivos é muito limitada. **Objetivo** - Refinar a anestesia e a analgesia multimodal aplicadas em ensaios não-clínicos que utilizam procedimentos invasivos em camundongos. **Métodos** – Foi mimetizado um grupo com um falso procedimento, que recebeu a anestesia (isoflurano) e os medicamentos analgésicos (morfina, buprenorfina, carprofeno, lidocaína). Verificamos por até 14 dias a eficácia anestésica (profundidade anestésica, duração), analgésica (Teste de Hargreaves e Escala Grimace) e o bem-estar de camundongos machos e fêmeas (escores de nidificação, peso corporal e consumo de água e comida) C57Bl/6 adultos e saudáveis. Uma vez confirmada anestesia e analgesia satisfatória em animais saudáveis, outro grupo de camundongos foi submetido a um modelo de queimadura de terceiro grau, avaliando-se também a anestesia, a analgesia e o bem-estar animal (por até 14 dias). **Resultados** – Foi constatada uma eficácia anestésica (plano anestésico cirúrgico mantido durante todo o período de anestesia) e analgésica (antinocicepção no Teste de Hargreaves) por até 72 horas pós procedimento, junto com a não expressão facial de dor (escores baixos na Escala Grimace durante todo o experimento), mantendo-se o bem-estar animal durante todo o procedimento (escores altos no Teste de Nidificação, perda de no máximo 15% do peso corporal, consumo de água e de comida mantidos ou aumentados) nos grupos com o falso procedimento e o Grupo Queimado, em machos e fêmeas. **Conclusão** – O protocolo anestésico - analgésico foi eficaz, seguro e de longa duração, podendo ser usado em ensaios não clínicos que utilizam procedimentos invasivos em camundongos.

Palavras-chave: camundongos; ensaios não clínicos; procedimentos invasivos; anestesia; analgesia, bem-estar;

ABSTRACT

Introduction – Non-clinical trials, especially using mice, are essential to define efficacy and safety during new drug and medical products development. A lot of these trials use invasive procedures such as surgery and burns, which can cause lasting pain and suffering in the animals involved. In these cases, the inadequate pain management affects animal well-being and scientific data validity in non-clinical trials. Unfortunately, mice anesthesia and analgesia in invasive procedures is not quite satisfactory, using general injectable anesthetics (ketamine + xilazine), low duration local anesthetics (lidocaine), repeated administered opioids (subcutaneous buprenorphine) and/or non-opioid analgesics with low efficacy and low duration (paracetamol). Furthermore, pain evaluation and laboratory animal well-being during invasive procedures is very limited.

Objective – Refine anesthesia and multimodal analgesia applied in non-clinical trials using invasive procedures in mice. **Methods** – First, a False Procedure Group was mimicked, receiving anesthesia (isoflurane) and analgesics (morphine, buprenorphine, carprofen and lidocaine). We verified for 14 days the anesthetic efficacy (anesthetic depth, duration), analgesic efficacy (Hargreaves Test and Grimace Scale) and C57Bl/6 adult and healthy male and female mice well-being (Nest Building, body weight, water and food consumption). Once confirmed satisfactory anesthesia and analgesia, another mice group was submitted to a third degree burn model, also assessing anesthesia, analgesia and animal well-being (for 14 days).

Results – An anesthetic (surgical anesthetic plan was maintained during the entire anesthesia) and analgesic (antinociception on the Hargreaves Test) efficacy was verified for at least 72 hours post procedure, together with the non pain facial expressions (low scores on the Grimace Scale during all the experiments), sustaining animal well-being during all times evaluated (high Nest Building scores, maximum 15% of body weight loss, water and food consumption maintained or increased) on False Procedure and Burnt Groups, male and female. **Conclusion** – The anesthetic – analgesic protocol was effective, safe and long lasting, and could be used in non-clinical trials that use invasive procedures in mice.

Keywords: mice, non-clinical trials; invasive procedures; anesthesia; analgesia; well-being;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – As vias da dor e a ação analgésica dos medicamentos.....	14
Figura 2 – Aparelho do Teste de Hargreaves.....	17
Figura 3 – Categorias da Escala Grimace.....	19
Figura 4 – Escores de Nidificação.....	27
Figura 5 – Teste de Hargreaves.....	32
Figura 6 – Escala Grimace.....	34
Figura 7 – Teste de Nidificação.....	36
Figura 8 – Variação do Peso Corporal.....	38
Figura 9 – Variação do consumo de água e comida.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Doses recomendadas para cada tipo de analgésico.....	16
Tabela 2 - Substâncias utilizadas para assepsia, analgesia e anestesia dos camundongos.....	24
Tabela 3 – Tempos de indução, recuperação e duração da anestesia do grupo que não recebeu o procedimento de queimadura (azul) e o grupo queimado (laranja).....	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADH	Hormônio Antidiurético
NMDA	N-metil D-Aspartato
GABA	Ácido gama-aminobutírico
SNC	Sistema Nervoso Central
SC	Subcutâneo
AINES	Anti-inflamatórios não Esteroidais
COX	Ciclo-oxigenase
COX-1	Ciclo-oxigenase 1
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
EMP	Efeito Máximo Possível
CONCEA	Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 ANESTESIA EM PROCEDIMENTOS INVASIVOS.....	13
1.2 ANALGESIA.....	14
1.3 AVALIAÇÃO DA DOR E BEM-ESTAR ANIMAL EM PROCEDIMENTOS INVASIVOS.....	19
2 OBJETIVOS	22
2.1 OBJETIVO GERAL	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
3 JUSTIFICATIVA	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1 PROCEDIMENTO ANESTÉSICO E ANALGÉSICO	25
4.2 PROCEDIMENTO INVASIVO: QUEIMADURA.....	26
4.3 TESTE DE HARGREAVES.....	27
4.4 ESCALA GRIMACE	27
4.5 TESTE DE NIDIFICAÇÃO	28
4.6 PESO CORPORAL E CONSUMO DE ÁGUA E COMIDA	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 VALIDAÇÃO DA ANESTESIA PARA O PROCEDIMENTO DE QUEIMADURA	31
5.2 AVALIAÇÃO DA ANALGESIA EM 24H, 48H, 72H, 7 DIAS E 14 DIAS APÓS O PROCEDIMENTO.....	32
5.3 AVALIAÇÃO DAS EXPRESSÕES FACIAIS	35
5.4 AVALIAÇÃO DO BEM – ESTAR ANIMAL	37
5.5 AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL	39
5.6 AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE ÁGUA E DE COMIDA	41
6 CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novos medicamentos é um processo longo e necessita de responsabilidade e ética do desenvolvedor. Dividido em várias etapas, esse processo se inicia com o descobrimento de uma nova molécula, sintética ou derivada de plantas, até os estudos não-clínicos e clínicos finais, que definirão a aprovação do medicamento pelo órgão regulatório do país (ANDRADE *et al.*, 2016a).

A fase de desenvolvimento não clínica tem como objetivo verificar se o fármaco ou produto médico está sendo realmente eficaz no que foi proposto, gerando informações muito relevantes para a continuidade ou não com os estudos (ANDRADE *et al.*, 2016a, 2016b), no caso de uma ineficácia ou alta toxicidade. Tal fato torna a fase não clínica (especialmente com camundongos) essencial (ANDRADE *et al.*, 2016a) para o início do desenvolvimento de novos fármacos ou produtos médicos, com resultados de eficácia e segurança, guiando os pesquisadores para as fases clínicas.

Muitos ensaios não clínicos utilizam procedimentos invasivos para reproduzir situações necessárias para o desenvolvimento de medicamentos. Tais procedimentos, como cirurgias e queimaduras, podem gerar dor e sofrimento nos animais, fazendo com que os dados recolhidos dos experimentos não retratem a realidade e não sejam reprodutíveis (CARBONE; AUSTIN, 2016).

Quando não tratada, a dor dificulta a regeneração tecidual, produz alterações cardiovasculares, afeta a secreção e produção de vários hormônios (aumento na secreção de corticoides, glucagon, ADH), neurotransmissores (aumento na secreção de catecolaminas) e enzimas (JIRKOF, 2017). Além disso, o manejo inadequado da dor afeta o bem-estar animal, interferindo na alimentação, consumo de água, construção de ninho e redução do sono (JIRKOF, 2017). Todas essas alterações fisiológicas e de bem-estar animal impedem com que o estudo tenha validade científica e dificultam a reprodutibilidade dos dados não clínicos (JIRKOF, 2017).

1.1 ANESTESIA EM PROCEDIMENTOS INVASIVOS

Os agentes anestésicos produzem alterações de estado de consciência no animal, como a perda de movimento, reflexo de endireitamento, que são correlacionadas com a perda de consciência nos humanos (NAVARRO *et al.*, 2021). É importante que haja pleno controle da profundidade anestésica, pois através dela, pode-se mensurar o quão profunda a anestesia tem de ser para que o procedimento possa ocorrer sem o reflexo do animal (NAVARRO *et al.*, 2021).

A combinação de cetamina com xilazina é a mais popular no âmbito da anestesia injetável. Isso se dá devido ao índice terapêutico dessa combinação (considerada segura pois preserva ou até aumenta a pressão arterial), junto com a flexibilidade de doses possíveis para se obter anestesia (HE *et al.*, 2010). O mecanismo de ação anestésico da cetamina, agonista dos receptores NMDA, se baseia nos efeitos simpatomiméticos, que ultrapassam o leve efeito cardiodepressivo (NAVARRO *et al.*, 2021). Já a xilazina é um agonista alfa-2 adrenérgico, produzindo sedação e analgesia (HE *et al.*, 2010; NAVARRO *et al.*, 2021).

Embora tal combinação consiga chegar em um plano anestésico para cirurgia, muitas vezes a inibição dos movimentos em resposta a um estímulo nociceptivo se torna um desafio, gerando muitas mortes de animais até chegar em uma dose adequada (NAVARRO *et al.*, 2021). Além disso, há muita variabilidade da duração da anestesia injetável, necessitando de redose, fator também causador de muitas mortes caso não haja monitoramento intensivo da pressão arterial, saturação de oxigênio no sangue e frequência cardíaca durante a anestesia (NAVARRO *et al.*, 2021).

O isoflurano é o agente anestésico inalatório mais utilizado, trazendo várias vantagens em comparação aos injetáveis. O anestésico é agonista dos receptores GABA e de glicina e inibidor dos receptores NMDA, gerando perda de movimento, hipnose e amnésia, devido à inibição da atividade neural no SNC (NAVARRO *et al.*, 2021).

A anestesia inalatória permite com que quase 100% dos animais cheguem no plano anestésico cirúrgico, pois o isoflurano atua em diversos receptores, fazendo com que não haja necessidade de uma dose alta para se obter a resposta necessária (HE *et al.*, 2010; NAVARRO *et al.*, 2021). Além disso, esse tipo de anestesia produz

uma rápida indução anestésica, devido à baixa solubilidade dos inalantes no sangue, sendo eles rapidamente absorvidos pelos alvéolos, chegando ao SNC (NAVARRO *et al.*, 2021). Há também uma rápida remoção do isoflurano do SNC quando o procedimento acaba, possibilitando uma recuperação rápida do animal após a anestesia (HE *et al.*, 2010; NAVARRO *et al.*, 2021). O contraponto de uma anestesia inalatória é a falta de efeito analgésico desse tipo de fármaco, necessitando do uso de analgésicos, como opioides, antes do procedimento, para que quando o efeito anestésico acabar, a analgesia já esteja presente, fazendo com que o animal não sinta dor e desconforto (NAVARRO *et al.*, 2021).

1.2 ANALGESIA

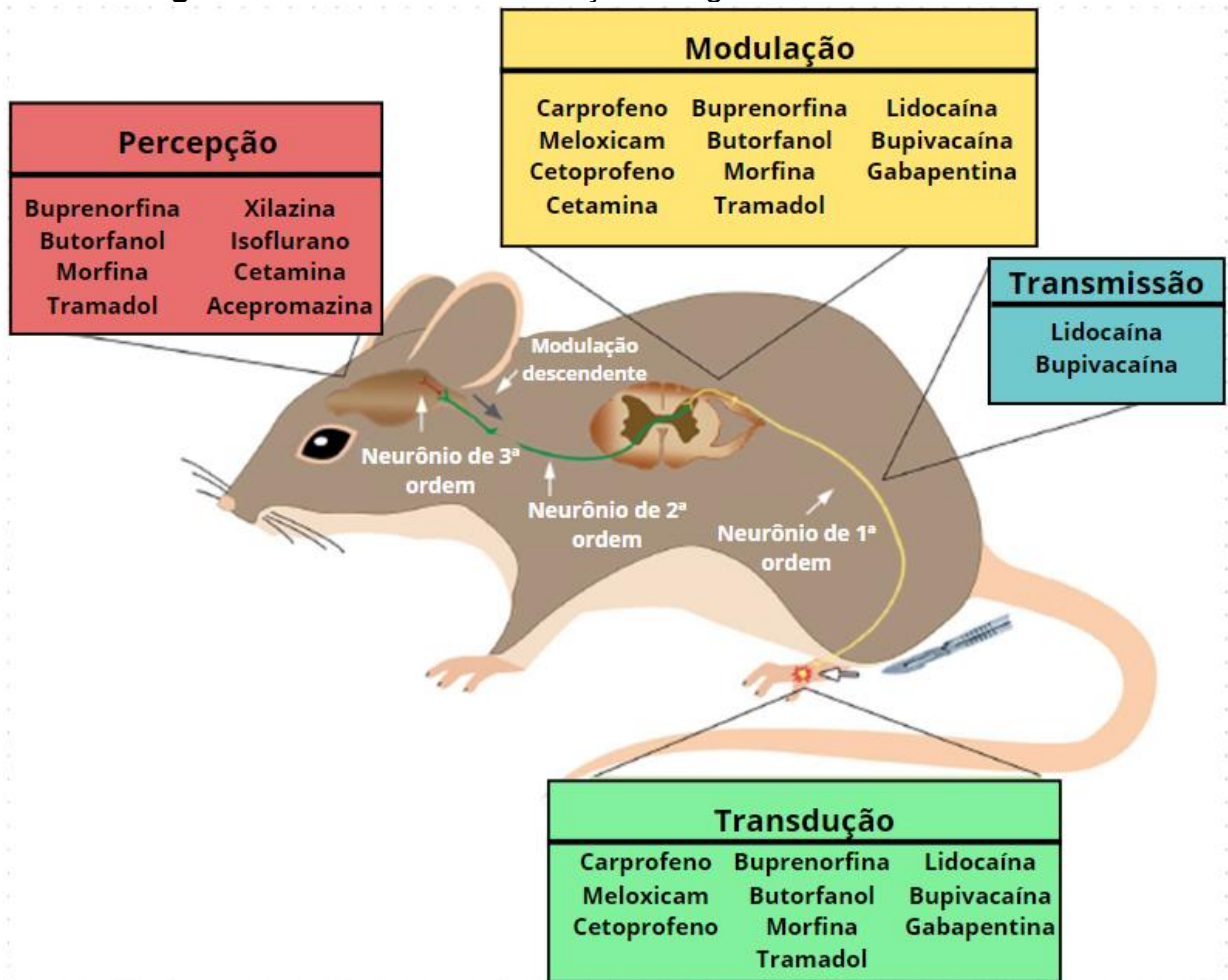
A dor é um dos fatores mais importantes a serem considerados quando há a necessidade de um procedimento, invasivo ou não, em experimentos com animais (JIRKOF, 2017). As consequências geradas pela dor vão além do bem-estar animal, podendo até invalidar os dados científicos da pesquisa (CARBONE; AUSTIN, 2016). Por isso, é de suma importância que haja um planejamento analgésico para procedimentos que gerem dor e desconforto em animais.

Quando há um estímulo nociceptivo (mecânico, térmico ou químico) como uma cirurgia ou lesão, ocorre a ativação dos canais de transdução, nos terminais de neurônios periféricos primários aferentes (nociceptores) (RINGKAMP; DOUGHERTY; RAJA, 2018). Nessa etapa de transdução, atuam alguns anti-inflamatórios, opioides e anestésicos locais, segundo a Figura 1. O potencial de ação gerado pela ativação dos canais de transdução, quando suficiente, será transmitido para o Sistema Nervoso Central, na etapa de transmissão (RINGKAMP; DOUGHERTY; RAJA, 2018). A transmissão do sinal da dor começa nos neurônios sensoriais periféricos (neurônios de primeira ordem), que levam o sinal até a medula espinhal, através de fibras A δ e C, local de atuação dos anestésicos locais, como a lidocaína e bupivacaína (Figura 1). Na medula espinhal, os neurônios de segunda ordem levam o sinal até o tálamo, tronco encefálico e diencefalo, sendo que os neurônios do tronco encefálico e diencefalo levam o sinal até diversos locais do córtex, sendo considerados neurônios de terceira ordem (RINGKAMP; DOUGHERTY; RAJA, 2018).

A etapa de modulação, de maneira resumida, pode ocorrer ao longo da via de transmissão, principalmente no corno dorsal da medula espinhal (KIRKPATRICK *et al.*, 2015). A modulação da dor caracteriza um aumento da atividade das vias da dor ou diminuição delas, podendo ser ascendente ou descendente. A modulação ascendente (de neurônios periféricos para o corno dorsal da medula espinhal) se dá principalmente por opioides, que inibem a nível periférico (inibição da liberação de substância P, bloqueando a via da dor) e no SNC (mudança na eletrofisiologia dos neurônios) (MENDELL, 2014), mas também pode ser feita por anti-inflamatórios e anestésicos (Figura 1). Já a modulação descendente acontece do SNC para a medula espinhal, através da liberação de endorfinas na substância cinzenta periaquedutal, estresse (analgesia induzida por estresse) e por estimulação periférica ou central (PORRECA, 2002). Os opioides atuam extensamente na modulação descendente, devido à alta distribuição de receptores opioides por toda a via.

A percepção da dor, último estágio do processo nociceptivo, é uma sensação subjetiva, que ocorre através da ativação dos córtex somatossensorial (primário e secundário) e límbico (RINGKAMP; DOUGHERTY; RAJA, 2018). Opioides alteram a percepção da dor, assim como os anestésico, quando em plano anestésico cirúrgico (NAVARRO *et al.*, 2021).

Figura 1 – As vias da dor e a ação analgésica dos medicamentos



Fonte: Adaptado de NAVARRO, K. L., 2021.

A analgesia multimodal, que utiliza diversos agentes analgésicos, tem como objetivo a minimização dos efeitos adversos, diminuição do estresse pós-operatório e a melhora do bem-estar animal (FURUMOTO *et al.*, 2021). Quando se utilizam muitos medicamentos diferentes, muitas vezes há o aumento da percepção e a indução da dor através dos próprios anestésicos e analgésicos, junto com a via e a frequência de administração, gerando ainda mais estresse (FURUMOTO *et al.*, 2021). Tal fato faz com que seja necessário a diminuição de repetidas aplicações, a administração oral forçada e a melhor escolha dos medicamentos para que o animal tenha seu bem-estar mantido e não haja interferência da dor e estresse nos dados científicos.

Os opioides atuam no organismo por meio de receptores localizados em diversas partes do corpo, incluindo o SNC, trato gastrointestinal, articulações, participando da modulação da dor e das emoções (NAVARRO *et al.*, 2021). A ação

analgésica dos opioides se dá nos receptores mu dos camundongos, podendo ser agonistas parciais ou totais, como a morfina (agonista total), buprenorfina (agonista parcial) e o tramadol (agonista parcial) (NAVARRO *et al.*, 2021). Em relação aos efeitos adversos, os opioides normalmente geram uma diminuição da motilidade gastrointestinal, sedação e diminuição do consumo de água e comida (NAVARRO *et al.*, 2021).

A morfina é considerada um excelente analgésico em ratos e camundongos (KENDALL *et al.*, 2014) sendo o medicamento de escolha para controle de dor severa e moderada. O efeito analgésico da morfina é grande, mas com duração entre 2 e 3 horas nos camundongos (KENDALL *et al.*, 2014), fazendo com que a redose seja frequente.

A buprenorfina, utilizada amplamente no pós-cirúrgico de roedores (JIRKOF *et al.*, 2015), é um potente opioide de longa duração (entre 3 e 7 horas) (JIRKOF *et al.*, 2015). Entretanto, em sua forma injetável, ainda que seu tempo de ação seja mais longo que o da morfina, é necessário que haja várias aplicações diárias, gerando estresse para o animal (JIRKOF *et al.*, 2015). O adesivo transdérmico de buprenorfina possibilita o não estresse animal e a redução de efeitos adversos, devido à absorção constante do opioide, sem picos de concentração (MASTRANGELO *et al.*, 2021). Entretanto, opioides podem ser de difícil acesso para muitos pesquisadores, devido a requisitos legais para sua compra, receitas médicas e necessidade de armazenamento correto com armários trancados (NAVARRO *et al.*, 2021).

A classe dos AINES obtém o efeito anti-inflamatório e analgésico através de um mecanismo inibitório no metabolismo do ácido araquidônico, principalmente inibição das enzimas ciclooxigenases (COX-1 e COX-2) (NAVARRO *et al.*, 2021). O carprofeno, por exemplo, é um inibidor COX-2 preferencial, enquanto o cetoprofeno é um inibidor de COX não seletivo (NAVARRO *et al.*, 2021). Este possui um tempo de meia vida de 8 horas, podendo ser administrado até 1 vez por dia em roedores, devido a sua longa duração de ação (em torno de 24 horas) (KENDALL *et al.*, 2014), possivelmente pela habilidade de penetração em tecidos inflamados (CANNON *et al.*, 2011).

Os anestésicos locais atuam por meio do bloqueio dos canais de sódio, impedindo com que haja transmissão do sinal para os nociceptores no SNC

(NAVARRO *et al.*, 2021). É importante que haja uma infiltração com anestésicos locais no local onde será feito o procedimento invasivo, para que quando o efeito anestésico geral acabe, ainda haja o bloqueio da transmissão do sinal doloroso no local (NAVARRO *et al.*, 2021).

A lidocaína é um agente anestésico local de ação rápida, com início do efeito em até 5 minutos e duração total de até 2 horas (DURST *et al.*, 2021). Já a bupivacaína tem uma ação mais lenta, podendo começar em 15 minutos e durar até 8 horas (DURST *et al.*, 2021). Os dois podem fazer parte de uma analgesia multimodal, sendo muito efetivos em bloquear a sensação de dor no local. As doses recomendadas estão na Tabela 1, sendo importante não ultrapassar a dose máxima de 10mg/kg de lidocaína e de 2mg/kg de bupivacaína, para prevenir toxicidade sistêmica (TORP; METHENY; SIMON, 2022).

Tabela 1 - Doses recomendadas para cada tipo de analgésico

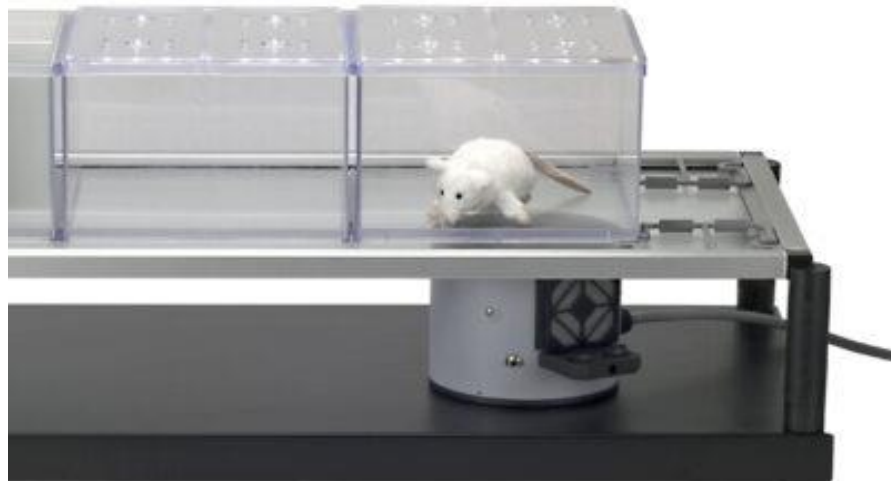
Categoria	Medicamento	Dose recomendada e posologia
Opioides	Morfina	2-5 mg/kg SC, a cada 2-4 horas
	Buprenorfina	0,5-1,0 mg/kg SC (Bup-SR), a cada 48-72 horas 3,25 mg/kg SC (Ethiq-XR), a cada 48-72 horas
AINES	Carprofeno	2,5-5 mg/kg SC, a cada 24 horas
	Meloxicam	1-5 mg/kg SC, a cada 24 horas
Anestésicos locais	Lidocaína	2-4 mg/kg, não exceder 10 mg/kg, no local do procedimento
	Bupivacaína	1-2 mg/kg, não exceder 2 mg/kg, no local do procedimento

Fonte: Adaptado de NAVARRO, K. L., 2021.

1.3 AVALIAÇÃO DA DOR E BEM-ESTAR ANIMAL EM PROCEDIMENTOS INVASIVOS

A dor é um estímulo transmitido por meio de diferentes nociceptores, podendo ser térmica, mecânica e química. A dor térmica pode ser avaliada por meio de testes de comportamento como o teste de Hargreaves (CHEAH; FAWCETT; ANDREWS, 2017), que foi desenvolvido para ratos e camundongos, com uma proposta de ser simples e eficiente. O teste funciona com base no tempo de resposta de retirada da pata ao estímulo térmico produzido pelo equipamento. O animal (rato ou camundongo) é colocado em cima de uma superfície de vidro, separado dos outros animais por divisórias transparentes. Então, o feixe térmico é posicionado embaixo da pata do animal (Figura 2) e acionado, sendo medido o tempo no qual o animal deixa sua pata naquele lugar, seguido por um movimento de retirada da pata, podendo ser acompanhado de observação da pata pelo animal ou lambedura da pata (CHEAH; FAWCETT; ANDREWS, 2017).

Figura 2 – Aparelho do Teste de Hargreaves



Fonte: <https://ugobasilebrasil.com.br/categorias-produtos/the-original-plantar-test-for-thermal-stimulation-hargreaves-apparatus/>

Outra maneira de se avaliar a dor animal é através da escala Grimace (MATSUMIYA *et al.*, 2012), um método para estimar a dor espontânea em camundongos. Tal metodologia tem a vantagem de não ser invasiva, necessitando somente da captação de imagens das expressões faciais dos camundongos. A composição do escore das expressões faciais, como mostra a Figura 3, se divide em 5 categorias: estreitamento ocular, arqueamento nasal, arqueamento da bochecha, posição auricular e posição das vibrissas (MATSUMIYA *et al.*, 2012). Cada uma dessas categorias pode receber o escore 0 (ausente) ou 1 (moderadamente presente) ou 2 (severa), sendo os escores somados ao fim (MATSUMIYA *et al.*, 2012).

Espécies de roedores são conhecidas por formarem ninhos (nidificação) como forma de proteção (térmica, predadores, reprodução) (JIRKOF *et al.*, 2013). Em um biotério de laboratório, com temperatura ambiente menor que a dos animais, a motivação de um camundongo para construção de um ninho vem de termorregulação, proteção contra humanos e luz (JIRKOF *et al.*, 2013). Uma mudança nesse tipo de comportamento indica que o animal pode estar motivacionalmente afetado, sem o conforto necessário e possivelmente com dor, no caso de uma avaliação depois de um procedimento invasivo (JIRKOF *et al.*, 2013).

Outros parâmetros que ajudam a verificar o bem-estar animal são o peso corporal e o consumo de água e comida. Fatores comportamentais como medo e estresse influenciam diretamente em tais parâmetros (BRASIL, 2015), principalmente quando os animais estão isolados uns dos outros. Como forma de minimizar a dor e sofrimento animal, é importante que haja um fim humanitário quando se detecta alguma alteração grave no peso corporal, consumo de água e comida e fisionomia do animal. Perdas rápidas de peso corporal entre 15-20% indicam a necessidade de um fim humanitário, necessitando de frequente monitorização de tal parâmetro, conforme a Resolução Normativa do CONCEA nº 25, de 29 de setembro de 2015.

Figura 3 – Categorias Escala Grimace

NC 3R^s National Centre for the Replacement, Refinement & Reduction of Animals in Research

A Escala Grimace de camundongos

Categorias	Ausente (0)	Moderadamente presente (1)	Severo (2)
Estreitamento ocular			
Arqueamento nasal			
Arqueamento da bochecha			
Posicionamento auricular			
Posicionamento das vibrissas			

Fonte: Adaptado de nc3rs.org.uk/3rs-resources/grimace-scales

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Refinar a anestesia e a analgesia multimodal aplicadas em ensaios não-clínicos que utilizam procedimentos invasivos em camundongos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Manter a anestesia em plano cirúrgico durante todo o procedimento;
- b) Garantir analgesia significativa por até 72h após o procedimento;
- c) Assegurar o bem-estar animal no período pós procedimento.

3 JUSTIFICATIVA

Segundo a Resolução Normativa Nº 33 CONCEA, de 18 de novembro de 2016, a dor implica em diversas alterações fisiológicas, bioquímicas e comportamentais, podendo invalidar os dados científicos da pesquisa. Além disto, esta resolução recomenda o uso de opioides com anestésicos para garantir analgesia por até 72 horas em procedimentos invasivos.

Infelizmente, a anestesia e analgesia em procedimentos invasivos em camundongos é pouco satisfatória, com uso de anestésicos gerais injetáveis, como a combinação de cetamina e xilazina (NAVARRO *et al.*, 2021), anestésicos locais de curta duração (NAVARRO *et al.*, 2021) (lidocaína), analgésicos opioides administrados repetidamente (NAVARRO *et al.*, 2021) (buprenorfina subcutânea) e/ou analgésicos não-opioides com baixa eficácia e curta duração, como o paracetamol (DICKINSON; LEACH; FLECKNELL, 2009). Além disso, a avaliação de dor e bem-estar dos animais de laboratório durante procedimentos invasivos é muito limitada (CHEAH; FAWCETT; ANDREWS, 2017; DICKINSON; LEACH; FLECKNELL, 2009; JIRKOF *et al.*, 2013; MATSUMIYA *et al.*, 2012), sendo que dificilmente os estudos demonstram como foi feita a analgesia pós-operatória, indicando que a maioria dos pesquisadores não está atenta para tal problema (CARBONE; AUSTIN, 2016).

Para isso, o nosso estudo busca, através de uma anestesia e analgesia satisfatória, assegurar a manutenção do bem-estar animal, estabelecendo um novo protocolo de anestesia e analgesia para procedimentos invasivos utilizando camundongos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos realizados durante este trabalho foram conduzidos segundo a normatização atual do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), do Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA/UFSC) e premissas protocolares do ARRIVE Guidelines 2.0 (do inglês, Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments) (PERCIE DU SERT *et al.*, 2020). Os experimentos com animais foram conduzidos no Laboratório de Farmacologia Experimental (LAFEX), no Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Utilizamos camundongos machos (n = 5) e fêmeas (n = 5) C57BL/6-UFSC, entre 18 e 30 g, com idade entre 9 e 12 semanas, separados em caixas individuais e transparentes. Durante todo o período experimental os animais receberam água filtrada e ração *ad libitum*, sendo mantidos em ciclos claro/escuro (12/12h) e temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ \text{C}$). Um dia antes do procedimento, foram detectados os valores basais de latência de retirada da pata para estímulo térmico (teste de Hargreaves), capturadas as expressões faciais para avaliação dos escores da Escala Grimace, registrado o peso corporal, consumo de água e comida e escores de nidificação.

Na primeira fase do projeto, mimetizamos um grupo sem o procedimento invasivo (queimadura de terceiro grau). Esse grupo teve o objetivo de garantir uma anestesia em plano cirúrgico e analgesia satisfatória durante pelo menos 3 dias após a anestesia, sendo possível a realização do próximo grupo com a segurança de uma analgesia satisfatória no período pós procedimento.

Na segunda fase, os animais foram submetidos a um procedimento de queimadura de terceiro grau, padronizado no laboratório, junto com a anestesia e analgesia multimodal. Como no primeiro grupo, detectamos valores basais dos mesmos testes para verificar se a analgesia multimodal foi eficaz em animais que sofreram um procedimento invasivo.

Os procedimentos apresentados aqui foram aprovados pelo CEUA/UFSC, sob o número 4926230522.

4.1 PROCEDIMENTO ANESTÉSICO E ANALGÉSICO

Administramos morfina pela via subcutânea 5 minutos antes da anestesia, na concentração de 3 mg/kg de animal (NAVARRO *et al.*, 2021). Para a anestesia inalatória, utilizamos um cilindro de oxigênio, um vaporizador universal, e máscaras adaptadas para camundongos, além de uma caixa de acrílico para indução da anestesia. A anestesia geral foi induzida com isoflurano a 3%. Verificamos os tempos de indução e duração da anestesia, além da profundidade, avaliada mediante a presença ou ausência do reflexo pedal e reflexo de endireitamento. Os animais foram anestesiados até ser atingido o plano anestésico cirúrgico, caracterizado pela ausência de ambos os reflexos.

Durante a anestesia, o animal esteve em uma manta térmica a aproximadamente 30°C e os olhos foram lubrificados com colírio lubrificante para manter a hidratação da córnea. Após induzida a anestesia, os pelos do dorso do animal foram raspados com um aparador de pelos, seguido pela aplicação de creme depilatório, para maior remoção dos pelos. Para assepsia do local, utilizamos Tintura de Benjoim (20%), que possui propriedades antissépticas e é facilitadora da adesão de adesivos. Além disso, infiltramos lidocaína (50 ul de solução 0,2%, 5 mg/kg) subcutaneamente em uma pequena área (NAVARRO *et al.*, 2021). Após, aplicamos um adesivo transdérmico de buprenorfina (Restiva®) com 1 cm² (5 ug/hora) (NAVARRO *et al.*, 2021) a 1 cm de distância da área infiltrada, seguido de uma cobertura de curativo transparente. Além do adesivo, os camundongos foram tratados com carprofeno (5 mg/kg subcutâneo) (NAVARRO *et al.*, 2021). Por último, cada animal recebeu 200 uL de soro fisiológico isotônico estéril, para prevenir desidratação. A duração total da anestesia geral foi entre 15 e 30 minutos e o adesivo de buprenorfina permaneceu no animal liberando o opioide por 72h (3 dias).

Tabela 2 - Substâncias utilizadas para assepsia, analgesia e anestesia dos animais

Medicamento / Produto	Dose	Via de administração
Morfina	3 mg/kg	Subcutânea
Isoflurano	3% (0.10ml/L)	Inalatória
Lidocaína	5 mg/kg	Subcutânea
Buprenorfina (Restiva®)	5 ug/hora	Adesivo Transdérmico
Carprofeno	5 mg/kg	Subcutânea
Tintura de Benjoim	20% (1 swab)	Tópica
Soro fisiológico isotônico estéril	200 uL	Subcutânea
Lubrificante ocular (Hyo- Comod,Pfizer)	1 gota	Tópica

4.2 PROCEDIMENTO INVASIVO: QUEIMADURA

Para validar a eficácia do novo protocolo anestésico-analgésico em um procedimento invasivo, os animais foram submetidos a um modelo de queimadura de terceiro grau (BLAISE *et al.*, 2020), padronizado no laboratório. Nesse grupo, após a infiltração no dorso do animal com lidocaína, os animais foram queimados com uma máquina de hotstamping adaptada (FRANTECH, modelo FR01), com uma área de queimadura de 1 cm². A queimadura de terceiro grau foi feita a 100 graus por 30 segundos, a uma pressão constante. Após 24 horas, o grupo queimado foi submetido ao debridamento, para retirar a epiderme queimada, ajudando na cicatrização da ferida. Nesse procedimento, o animal permaneceu anestesiado com isoflurano a 3%, além da administração de morfina na dose de 3 mg/kg, para reforçar a analgesia devido à invasividade do procedimento.

4.3 TESTE DE HARGREAVES

Antes do teste acontecer, os animais foram ambientados na sala do teste, divididos em compartimentos transparentes, por 30 minutos (CHEAH; FAWCETT; ANDREWS, 2017). Após a ambientação, cada animal teve sua pata exposta ao feixe térmico 2 vezes para registro das latências, sendo feito a média dessas medidas. Foram feitas as medidas: basal, 24h, 48h, 72h, 7 dias e 14 dias.

Para possibilitar um melhor entendimento do potencial analgésico do protocolo, as latências medidas no teste de Hargreaves foram convertidas para %EMP, utilizando a seguinte fórmula:

$$\%EMP = \left(\frac{\text{latência medida} - \text{latência basal}}{\text{latência máxima possível} - \text{latência basal}} \right) \times 100$$

Estabeleceu-se a latência de 20 segundos como a máxima possível, para não causar danos à pata do animal durante a exposição ao feixe térmico do aparelho de Hargreaves durante o teste.

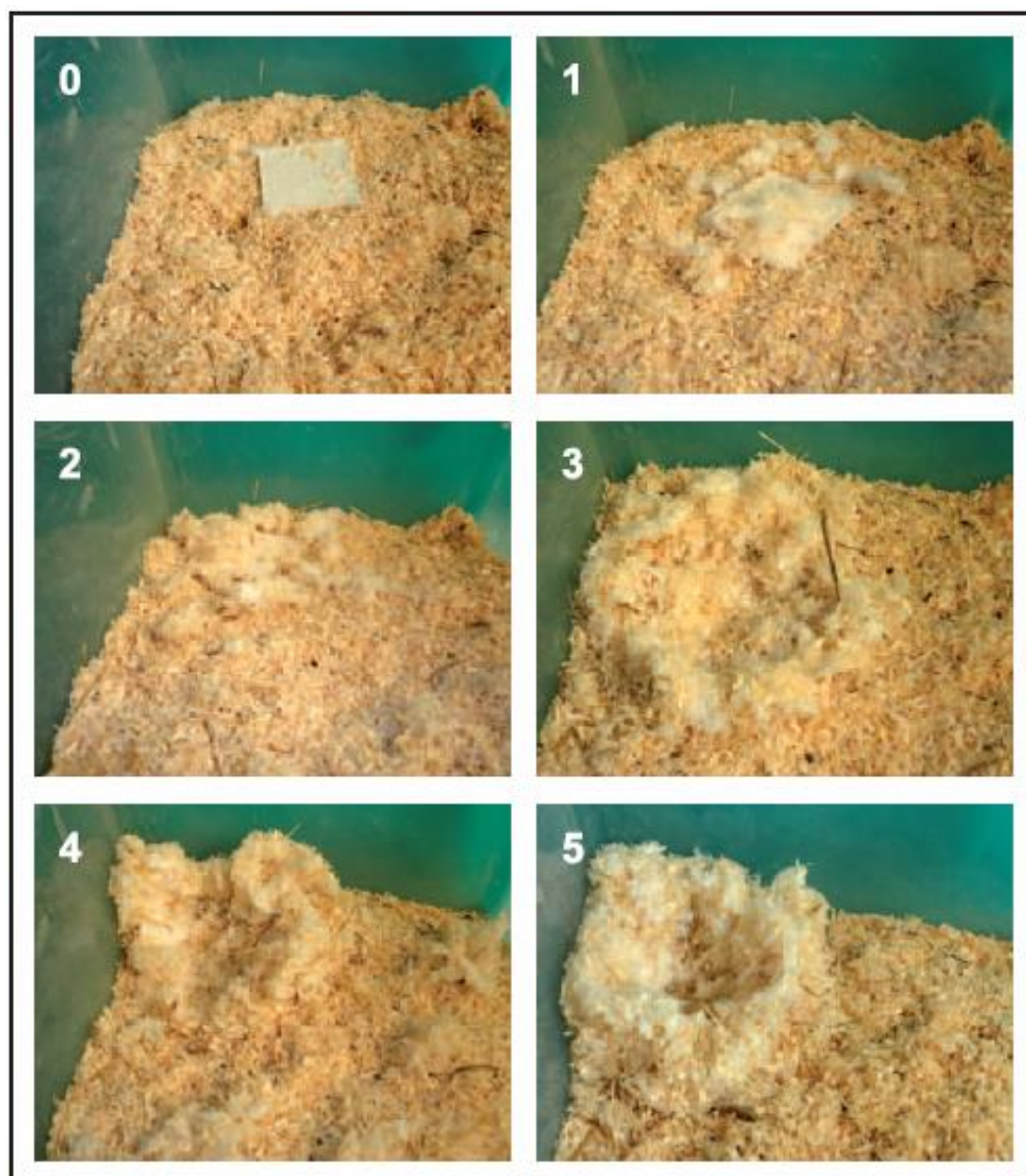
4.4 ESCALA GRIMACE

Foram capturadas 3 imagens de ângulos diferentes, possibilitando a visualização de todas as categorias (estreitamento ocular, posição das vibrissas, arqueamento nasal, arqueamento das bochechas e posição auricular) avaliadas pela Escala Grimace. Os escores foram registrados conforme gravidade de dor (MATSUMIYA *et al.*, 2012), sendo 0 (ausente), 1 (moderadamente presente) e 2 (severa). Dado o escore para cada categoria, os escores foram somados, sendo que o escore máximo da escala é 10 e o mínimo 0. Foram avaliadas as expressões faciais no dia pré anestesia, 24h, 48h, 72h, 7 dias e 14 dias depois da anestesia.

4.5 TESTE DE NIDIFICAÇÃO

Os ninhos foram compostos de dois discos de algodão (3 gramas), trocados diariamente para as medidas de nidificação diária. As pontuações foram feitas um dia antes da anestesia, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 7 dias e 14 dias depois da anestesia. A pontuação utilizada é de 0 a 5, segundo a Figura 4, sendo (JIRKOF *et al.*, 2013):

- a. (0) indicou que o material não foi manipulado;
- b. (1) indicou que havia sido manipulado, mas nenhum local de ninho claro estava presente;
- c. (2) um local de nidificação estava presente, mas o ninho era plano;
- d. (3) uma forma de taça rasa estava presente;
- e. (4) a parede do ninho era da altura dos camundongos, fundo raso;
- f. (5) a parede do ninho era maior que os camundongos, ninho complexo;

Figura 4 – Escores de Nidificação

Fonte: JIRKOF, P., 2013

4.6 PESO CORPORAL E CONSUMO DE ÁGUA E COMIDA

Os animais foram pesados no dia da anestesia, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 7 e 14 dias depois da anestesia. Para o consumo de água e comida, foi pesada a ração e a água 2 dias antes da anestesia, 1 dia antes, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 7 dias, 8 dias, 14 dias e 15 dias após a anestesia, para cálculo do consumo diário pré anestesia e no período pós anestesia.

4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados experimentais foram expressos como média \pm SEM de n observações, onde $n=5$ para machos ou fêmeas e $n=10$ para machos e fêmeas, como demonstrado nos valores individuais dos gráficos.

O teste de ROUT foi utilizado para a verificação da existência de valores outliers entre os dados e os valores identificados como tal foram excluídos das análises estatísticas.

Os conjuntos de dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de duas vias (tempo x queimadura ou tempo x sexo) com medidas repetidas (para o fator tempo), seguidas pelos testes post-hoc de Dunnett ou Sidak conforme necessário, indicado nas legendas das figuras.

O Software GraphPad versão 8.0, San Diego, Califórnia, EUA (GraphPad Software, USA) foi utilizado para fazer as análises. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas com valores de “P” menores que 0,05 ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 VALIDAÇÃO DA ANESTESIA PARA O PROCEDIMENTO DE QUEIMADURA

Em ambos os grupos, todos os animais atingiram o plano anestésico cirúrgico (Tabela 3), inferindo-se que a anestesia com isoflurano foi satisfatória para uma cirurgia, bem como para um procedimento invasivo. A duração média da anestesia foi menor no grupo sem o procedimento invasivo de queimadura quando comparado ao grupo com o procedimento, devido ao tempo necessário para se realizar a queimadura de forma precisa. Os tempos para indução do animal à anestesia foram similares nos dois grupos, em torno de 2 minutos, em machos e fêmeas, o que torna o protocolo mais prático e fácil de ser utilizado. Em relação aos tempos de recuperação, também foram similares, sendo necessário poucos minutos para o animal estar completamente recuperado da anestesia, com todos os reflexos (reflexo de endireitamento e reflexo pedal).

Tabela 3: Tempos de indução, recuperação e duração da anestesia do grupo que não recebeu o procedimento de queimadura (azul) e do grupo queimado (laranja)

Sexo	Atingiu o plano anestésico cirúrgico?	Duração da anestesia (minutos)	Tempo de indução (minutos)	Tempo de recuperação (minutos)
Machos	Sim	11,4 ± 0,9	2,4 ± 0,4	2,4 ± 0,5
Fêmeas	Sim	12,2 ± 0,8	2,0 ± 0	1,8 ± 0,3
Machos + Fêmeas	Sim	11,8 ± 0,5	2,2 ± 0,2	2,1 ± 0,3

Tabela 3 Cont. Tempos de indução, recuperação e duração da anestesia do grupo que não recebeu o procedimento de queimadura (azul) e do grupo queimado (laranja)

Machos	Sim	21,0 ± 0,7	2,6 ± 0,6	2,0 ± 0
Fêmeas	Sim	17,0 ± 1,2	1,4 ± 0,2	2,0 ± 0
Machos + Fêmeas	Sim	19,0 ± 1	2,0 ± 0,3	2,0 ± 0

A anestesia com isoflurano permitiu com que os experimentos fossem realizados com mais praticidade, agilidade e segurança, evitando o desgaste dos experimentadores em relação ao tempo ocioso no caso de uma longa indução anestésica e recuperação do animal. Em relação à segurança, nenhum animal morreu durante todo o período experimental, bem como todos obtiveram uma boa recuperação, gerando menos estresse ao animal.

Durante todo o período experimental, os animais não apresentaram características de letargia, piloereção, tremores, exsudato periorbital, dificuldade respiratória, medidas que compõem o escore clínico das diretrizes do ARRIVE (PERCIE DU SERT *et al.*, 2020), reconhecida pelo National Centre for the Replacement, Refinement & Reduction of Animal Research (NC3Rs), para indicar desconforto e estresse. O procedimento anestésico obteve sucesso em todos os parâmetros analisados para que o animal fosse submetido ao procedimento de queimadura sem dor e desconforto.

5.2 AVALIAÇÃO DA ANALGESIA EM 24H, 48H, 72H, 7 DIAS E 14 DIAS APÓS O PROCEDIMENTO

De acordo com a Resolução Normativa Nº 33 do CONCEA de 18 de novembro de 2016, é recomendado, em procedimentos mais invasivos (laparotomia, por exemplo), a administração de analgésicos sistêmicos (AINE e opioide) por pelo menos

72 horas para animais de experimentação. Além disto, nas diretrizes clínicas em seres humanos, permanece o consenso esmagador de que a terapia com opioides é uma ferramenta essencial para o controle da dor em lesões térmicas, combinados com outros fármacos analgésicos, como anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) (ROMANOWSKI *et al.*, 2020). Visto que o procedimento aqui realizado foi uma queimadura de terceiro grau, classificada procedimento com grau de invasividade 3 (que causa dor de intensidade intermediária), se tornou necessário a verificação do efeito tipo analgésico produzido pelo nosso protocolo analgésico em todos os dias por 72 horas e 1 vez por semana após 7 dias.

Para validar tal eficácia analgésica do protocolo, inicialmente verificamos se ele poderia produzir um efeito tipo analgésico no teste de Hargreaves, um teste sensível a fármacos opioides, em animais controle (Figura 5A). De fato, verificamos que o protocolo analgésico foi capaz de produzir efeito tipo analgésico (aumento do efeito máximo possível em relação aos valores basais do dia 0) tanto em animais (machos e fêmeas) que sofreram falso procedimento quanto em animais queimados, mas com variações conforme o dia analisado ($F(5,90) = 3,51$; $P < 0,01$ para a interação entre os fatores tempo x procedimento) (Figura 5A). A eficácia do protocolo analgésico foi similar entre os grupos nos dias 2 e 3, mas foi maior nos animais queimados no dia 1 após o procedimento. Por outro lado, o efeito tipo analgésico foi mais duradouro em animais submetidos ao falso procedimento, sendo significativo após 7 dias. Os resultados obtidos por nós contrastam, pelo menos em parte, com dados da literatura que demonstram que ocorre uma redução da potência dos opioides morfina e oxicodona em camundongos queimados em relação à animais que sofrem falso procedimento, um efeito relacionado à indução de tolerância pelo opioides (EMERY *et al.*, 2017). Esta discrepância pode ser explicada pela utilização conjunta do AINE carprofeno junto aos opioides em nosso estudo, pois é bem conhecido na literatura que a coadministração de AINEs reduzem os efeitos deletérios do opioides, incluindo a tolerância (LI, 2019).

Quando os dados dos animais machos e fêmeas foram avaliados isoladamente, o fator sexo não foi significativo para o efeito tipo analgésico observado em animais submetidos ao falso procedimento (Figura 5B) ($F(1,8) = 0,03$; $P = 0,86$) ou em animais queimados (Figura 5C) ($F(1,8) = 0,01$; $P = 0,92$), ou seja, não ocorreu dimorfismo

sexual nesta resposta. De acordo com nossos resultados, dados em seres humanos demonstram que não existe diferença na analgesia aos opioides entre sexos em pacientes queimados (RICHARDS *et al.*, 2021).

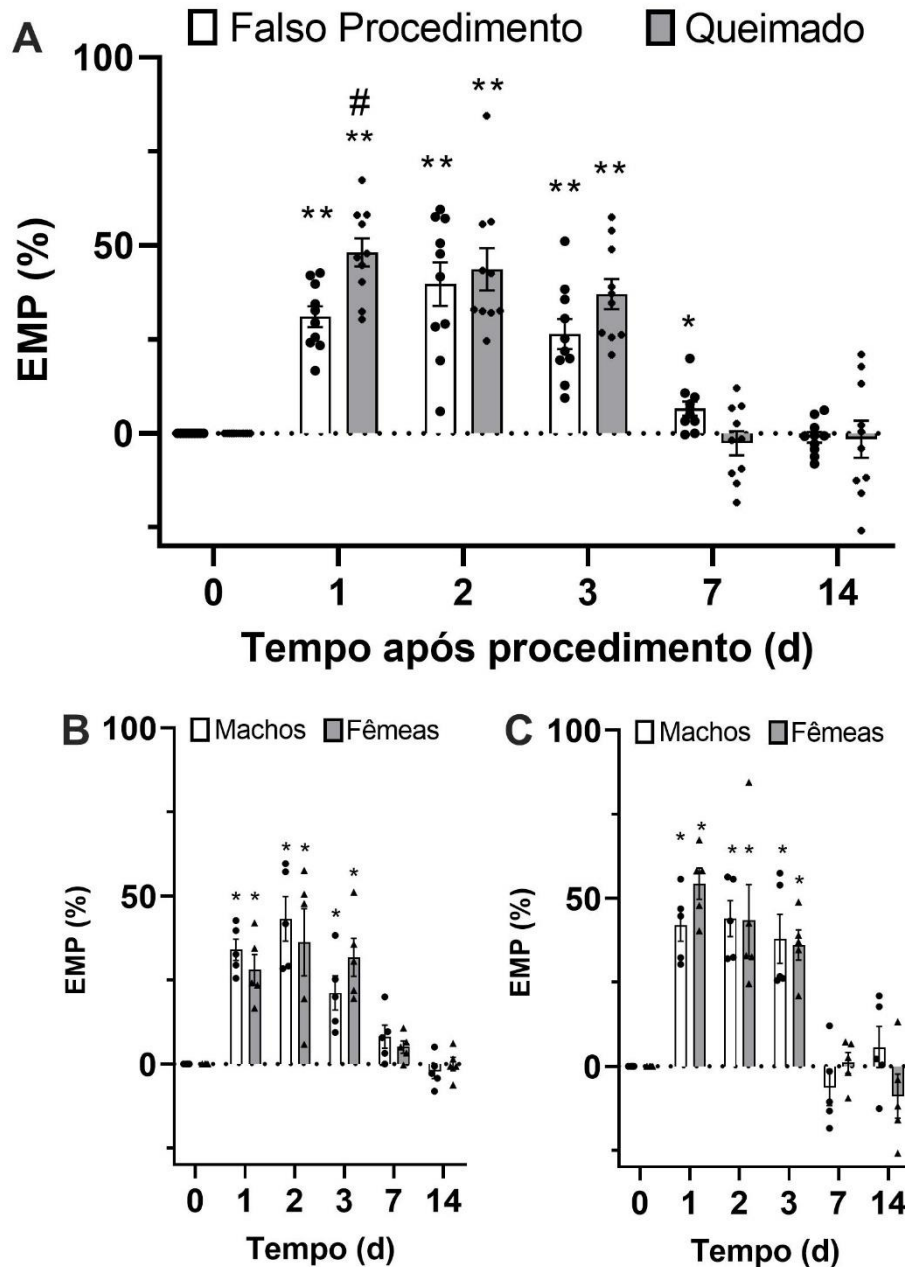


Figura 5. Decurso temporal da antinociceção produzida pelo protocolo anestésico-analgésico em camundongos machos e fêmeas em animais submetidos ao falso procedimento ou queimados (A). Decurso temporal da antinociceção produzida pelo protocolo anestésico-analgésico em camundongos machos ou fêmeas em animais submetidos ao falso procedimento (B) ou queimados (C). Dados expressos em média \pm S.E.M. ($n=10$ por grupo em A e $n=5$ em B e C), obtidos de 4 diferentes blocos

experimentais independentes. ANOVA de duas vias com medidas repetidas (tempo) seguida pelo post hoc de Dunnett (A) ou Sidak (B e C), onde: * $P < 0,05$ ou ** $P < 0,01$ quando comparado aos valores basais (dia 0) ou # $P < 0,05$ quando comparado à animais submetidos ao falso procedimento.

Em conjunto, nossos resultados demonstram que a analgesia multimodal foi eficaz e duradoura, podendo-se inferir que os animais estiveram sob efeito do analgésico opioide sistêmico por pelo menos 3 dias após o procedimento anestésico e a queimadura. Pode-se entender também que o adesivo de buprenorfina foi efetivo para liberar o opioide (buprenorfina) por pelo menos 72 horas, suprimindo a necessidade de reaplicação de medicamentos injetáveis e evitando com que haja mais estresse dos animais no período pós-procedimento.

É importante ressaltar a administração de morfina na dose de 3 mg/kg, 24 horas após o procedimento no Grupo Queimado, no momento do desbridamento. Tal procedimento pode ser doloroso ao animal, apesar de estar anestesiado, sendo necessário a administração do opioide, assim como é utilizado na prática clínica, em uma analgesia multimodal (CHINCHILLA; MOYANO, 2022).

5.3 AVALIAÇÃO DAS EXPRESSÕES FACIAIS

Sabendo que a expressão facial é amplamente utilizada como medida de dor em bebês, foi desenvolvida uma escala Grimace para camundongos, onde ensaios envolvendo estímulos nocivos (incluindo procedimentos invasivos, como cirurgias) são acompanhados por expressões faciais de dor (LANGFORD *et al.*, 2010). Esta medida de dor emitida espontaneamente pode fornecer informações sobre a experiência de dor subjetiva em animais de laboratório. De fato, estudo prévio demonstrou altos escores de expressão facial em ratos queimados sem tratamento com fármacos analgésicos (GODER *et al.*, 2022). Assim, utilizamos a escala de expressões faciais para verificar se ocorreria dor espontânea após a queimadura, além de verificar a eficácia do protocolo analgésico.

Em animais submetidos ao falso procedimento ou queimados (Figura 6), não houve aumento significativo dos escores da Escala Grimace, quando comparado aos valores basais, em todos os dias avaliados ($F(5,90) = 1,81$; $P = 0,12$ para a interação entre os fatores tempo x procedimento). Isso indica que os animais não expressaram

dor espontânea através de suas expressões faciais, inferindo-se que ambos os grupos não sofreram com dor ou desconforto durante todo o procedimento. Além disso, o grupo com o procedimento de queimadura não apresentou aumento significativo dos escores quando comparado ao grupo com o falso procedimento, indicando que a queimadura não causou dor no animal devido a eficácia do protocolo anestésico-analgésico.

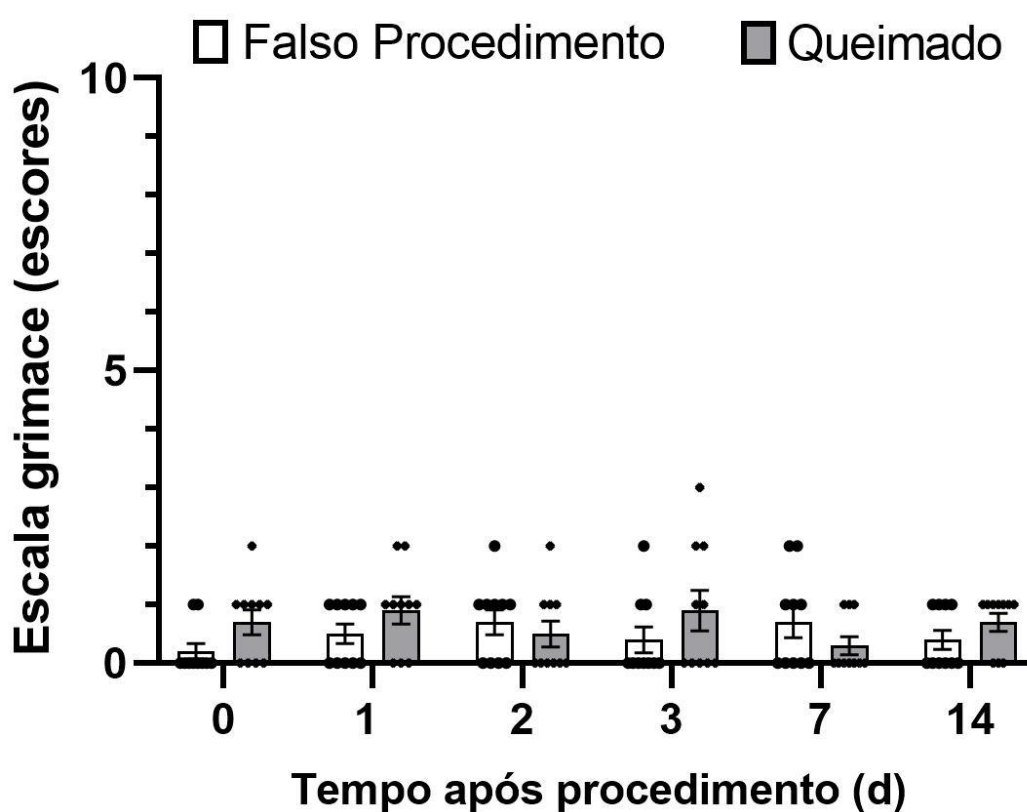


Figura 6. Decurso temporal dos escores da Escala Grimace em camundongos machos e fêmeas submetidos ao falso procedimento ou queimados. Dados expressos em média \pm S.E.M. (n=10 por grupo), obtidos de 4 diferentes blocos experimentais independentes.

Apesar de não se ter verificado a dor através da Escala Grimace durante todo o período experimental, a avaliação somente por meio da Escala é limitada, e necessita de outros parâmetros (antinocicepção e bem-estar) para assegurar a eficácia do protocolo. Há mais dificuldade em capturar a expressão facial de

camundongos com pelagem escura, quando comparado a camundongos de pelagem clara, além da experiência do experimentador necessária para que o escores dados tenham maior veracidade (MOTA-ROJAS *et al.*, 2020). Além disso, a utilização de mais avaliadores da Escala Grimace, junto com o cegamento desses, será feita posteriormente para garantir a avaliação correta da dor através das expressões faciais. De qualquer forma, a utilização desse método para avaliar dor em animais foi de grande utilidade, por não ser invasiva ao animal e trazer rapidez para se detectar dor, gerando a possibilidade de uma administração de analgésicos caso a dor seja detectada em meio ao experimento.

Os resultados da Escala Grimace (Figura 6) junto com a antinocicepção registrada no Teste de Hargreaves (Figura 5), aumentam a possibilidade de que os animais não sentiram nem expressaram dor em todo o experimento, apesar da invasividade do experimento (queimadura de terceiro grau).

5.4 AVALIAÇÃO DO BEM – ESTAR ANIMAL

A construção de ninhos em roedores é muito comum, sendo que ela aumenta o tempo de vida reprodutivo e é utilizada para termorregulação e proteção contra predadores (JIRKOF, 2014). Camundongos machos e fêmeas, quando fornecidos materiais adequados para construção, constroem ninhos para dormir, com proteção contra humanos e luz direta, em ambiente de laboratório (JIRKOF, 2014). A nidificação tem sido utilizada como uma medida de bem-estar animal impactada negativamente por dor e distresse nos animais. Para avaliação da construção de ninho em camundongos, pode ser utilizado parâmetros de complexidade do ninho, com escores de 0 a 5 (Figura 4) e comparar com o grau de complexidade do ninho antes do experimento (basal).

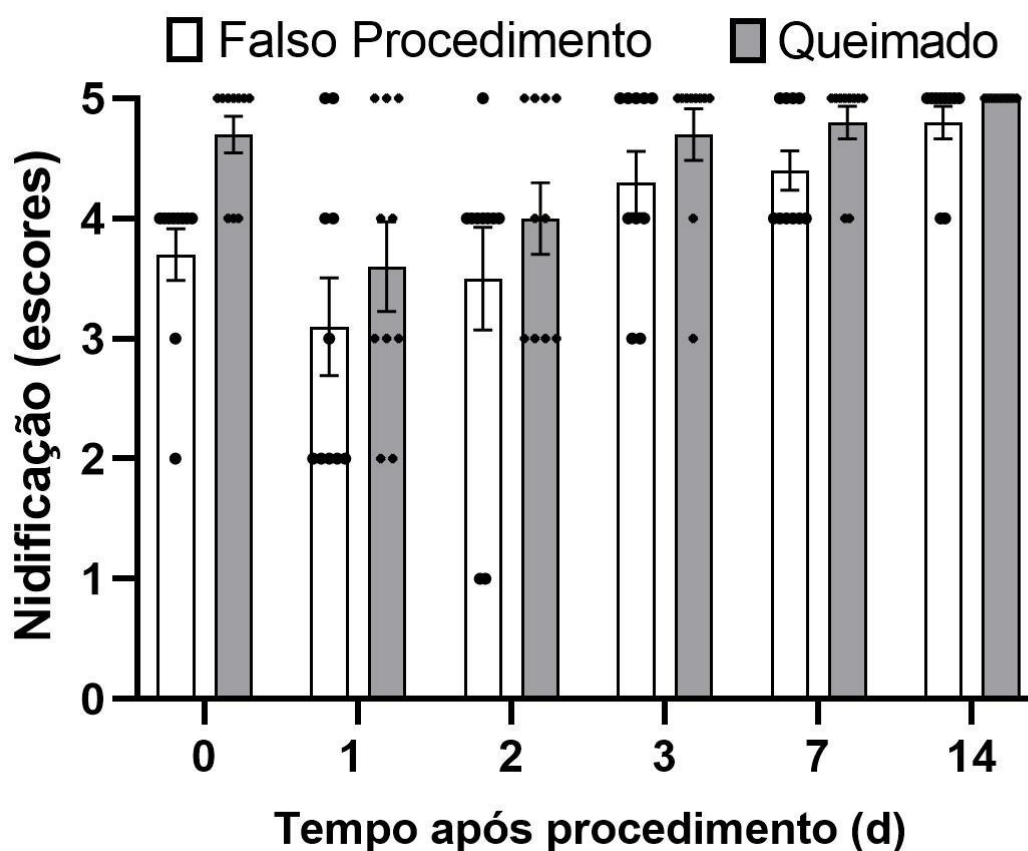


Figura 7. Decurso temporal dos escores de nidificação em machos e fêmeas nos camundongos do Grupo com o Falso Procedimento e do Grupo Queimado. Dados expressos em média \pm S.E.M. ($n=10$ por grupo), obtidos de 4 diferentes blocos experimentais independentes.

Em animais submetidos ao falso procedimento ou queimados (Figura 7), não houve redução significativa dos escores de nidificação, quando comparado aos valores basais, em todos os dias avaliados ($F(5,90) = 0,59$; $P = 0,71$ para a interação entre os fatores tempo x procedimento). Isso indica que os animais não tiveram redução de bem-estar, inferindo-se que ambos os grupos não sofreram com dor ou desconforto durante todo o procedimento. Já que a nidificação pode ser reduzida pela presença de dor (GASKILL *et al.*, 2013), estes resultados confirmam nossos achados anteriores e comprovam a eficácia do nosso protocolo analgésico. Salienta-se também que a própria disponibilização de material de nidificação pode facilitar o processo de cicatrização de feridas por queimadura em ratos (VITALO *et al.*, 2009).

5.5 AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL

O bem-estar animal é de suma importância para a veracidade dos dados obtidos em um experimento científico *in vivo* (TALBOT *et al.*, 2020). Quando se avalia o bem-estar animal, é necessário definir fins humanitários, com medidas objetivas que irão estabelecer um limite de estresse ao animal, não trazendo prejuízo ético e científico.

Uma dessas medidas é a perda de peso corporal, com a redução de mais de 20% do peso inicial, segundo o CONCEA, considerada item obrigatório para eutanásia do animal. Além disso, são necessários parâmetros de consumo de água e comida para ajudar a determinar a causa da perda de peso, assim como foi feito em nossos experimentos.

Em animais (machos e fêmeas) submetidos ao falso procedimento ou à queimadura houve alterações do peso corporal significativas após o procedimento ($F(5,90) = 3,42$; $P < 0,01$ para a interação entre os fatores tempo x procedimento) (Figura 8A). Os animais de ambos os grupos tiveram perdas de peso nos dias 2 e 3 após o procedimento, mas somente os animais submetidos ao falso procedimento tiveram ganho de peso 14 dias após o procedimento.

Quando os dados dos animais machos e fêmeas foram avaliados isoladamente, o fator sexo foi significativo para a variação do peso corporal em animais submetidos ao falso procedimento (Figura 8B) ($F(5,40) = 3,05$; $P = 0,02$) ou em animais queimados (Figura 8C) ($F(5,40) = 2,38$; $P = 0,05$). De fato, somente fêmeas submetidas ao falso procedimento tiveram ganho de peso nos dias 7 e 14 após o procedimento e somente fêmeas queimadas tiveram perda de peso no dia 2.

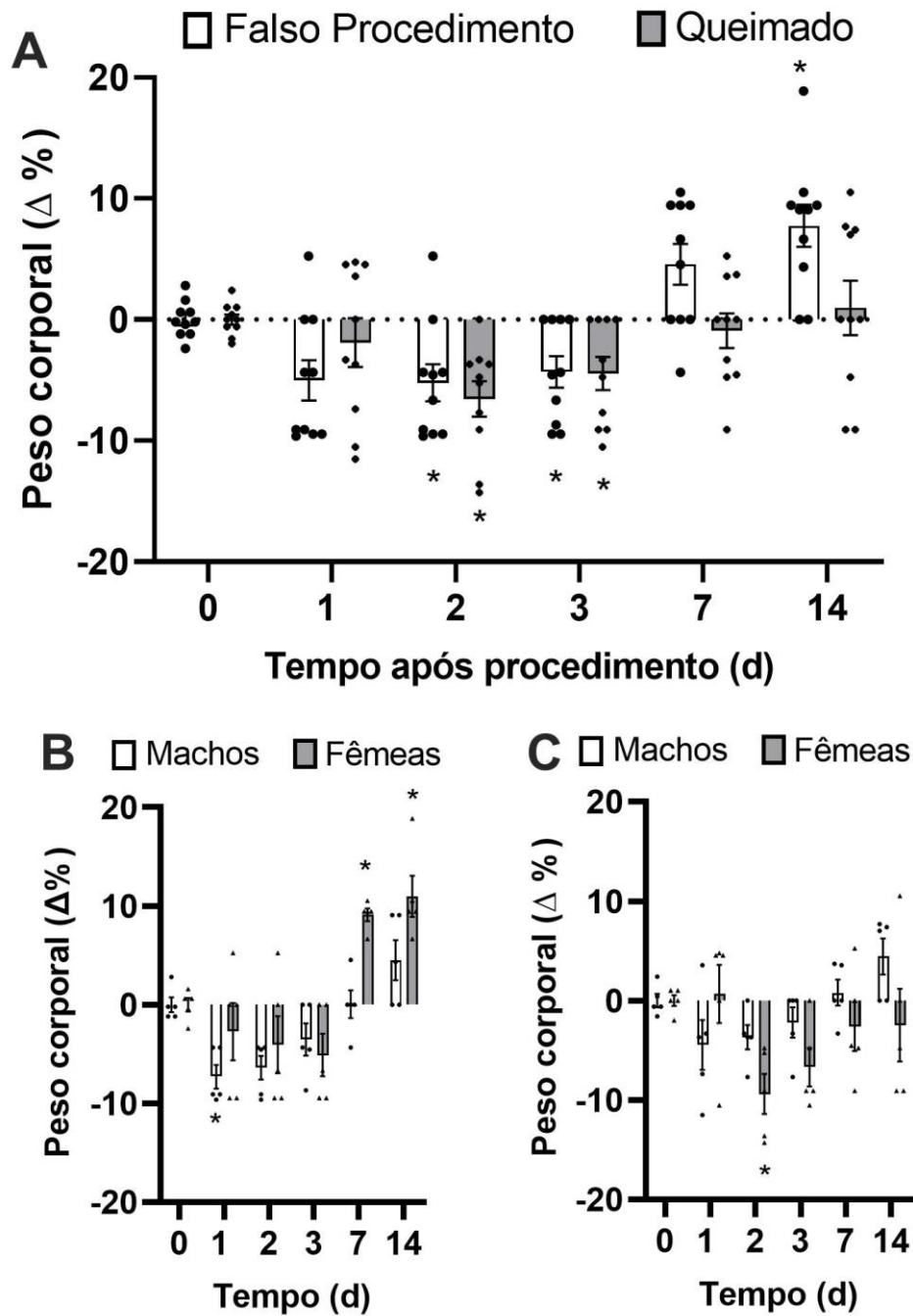


Figura 8. Decurso temporal variação do peso corporal de camundongos machos e fêmeas, no Grupo com o Falso Procedimento e no Grupo Queimado (A). Decurso temporal da variação de peso em camundongos machos ou fêmeas em animais submetidos ao falso procedimento (B) ou queimados (C). Dados expressos em média \pm S.E.M. ($n=10$ por grupo em A e $n=5$ em B e C), obtidos de 4 diferentes blocos experimentais independentes. ANOVA de duas vias com medidas repetidas (tempo) seguida pelo post hoc de Dunnet (A) ou Sidak (B e C), onde: * $P < 0,05$ ou ** $P < 0,01$ quando comparado aos valores basais (dia 0).

Apesar da redução do peso corporal nos dias iniciais após o procedimento, nenhuma redução ultrapassou 15% em comparação ao peso inicial dos animais, não sendo necessário nenhum fim humanitário durante todo o experimento, segundo a Resolução Normativa do CONCEA nº 25, de 29 de setembro de 2015.

5.6 AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE ÁGUA E DE COMIDA

O consumo de água em animais de laboratório varia conforme a evaporação, excreção pela urina e fezes. Como a água está disponível ao animal a todo momento, seu consumo é facilmente detectado, sem a necessidade de equipamentos específicos, pesando a fonte de água diariamente (HUNTER *et al.*, 2014). Os animais consomem comida para suprir as demandas energéticas diárias, como a movimentação e o metabolismo basal. Animais de laboratório, como camundongos, quando estão sentindo dor, tendem a diminuir o seu consumo diário de alimento e água, sendo tais consumos importantes para detecção de dor, sofrimento e distresse nesses animais (BAUMANS *et al.*, 1994).

Diferentemente do peso corporal, não ocorreram mudanças significativas do consumo de água ($F(5,90) = 1,42$; $P < 0,22$ para a interação entre os fatores tempo x procedimento) (Figura 9A) ou de ração ($F(5,90) = 0,80$; $P < 0,49$ para a interação entre os fatores tempo x procedimento) (Figura 9B) entre os animais machos e fêmeas submetidos ao falso procedimento ou queimados, em relação aos valores basais (dia 0). Estes resultados estão de acordo com nossos dados anteriores que demonstraram que nosso procedimento analgésico preveniu o desenvolvimento de dor e a redução do bem-estar animal, incluindo a habilidade dos animais beberem água e se alimentarem.

Além disso, cabe salientar que a perda de peso corporal observada anteriormente parece não decorrer da redução do consumo de água e ração. Como a perda de peso nos dias iniciais ao procedimento ocorreu tanto no grupo falso-procedimento quanto no grupo queimado, a causa da perda de peso pode estar relacionada com o uso de anestésicos gerais. De fato, observou-se em roedores que a perda de peso pós-anestésica persiste por até 3 dias 48 horas e é inespecífica em relação ao uso de agentes inalantes ou parenterais (DHOLAKIA *et al.*, 2017).

Finalmente, verificamos que animais queimados não conseguem ganhar peso 2 semanas após o procedimento. De acordo com nossos dados, queimaduras resultam em um estado hipermetabólico e hipercatabólico que persiste por muito tempo após a lesão inicial e a cicatrização da ferida (PEDROSO *et al.*, 2012). Assim, semelhante aos nossos camundongos, os seres humanos sobreviventes de queimaduras experimentam uma perda profunda e prolongada de massa corporal magra, massa gorda e densidade mineral óssea, associada a morbidade significativa e redução da qualidade de vida.

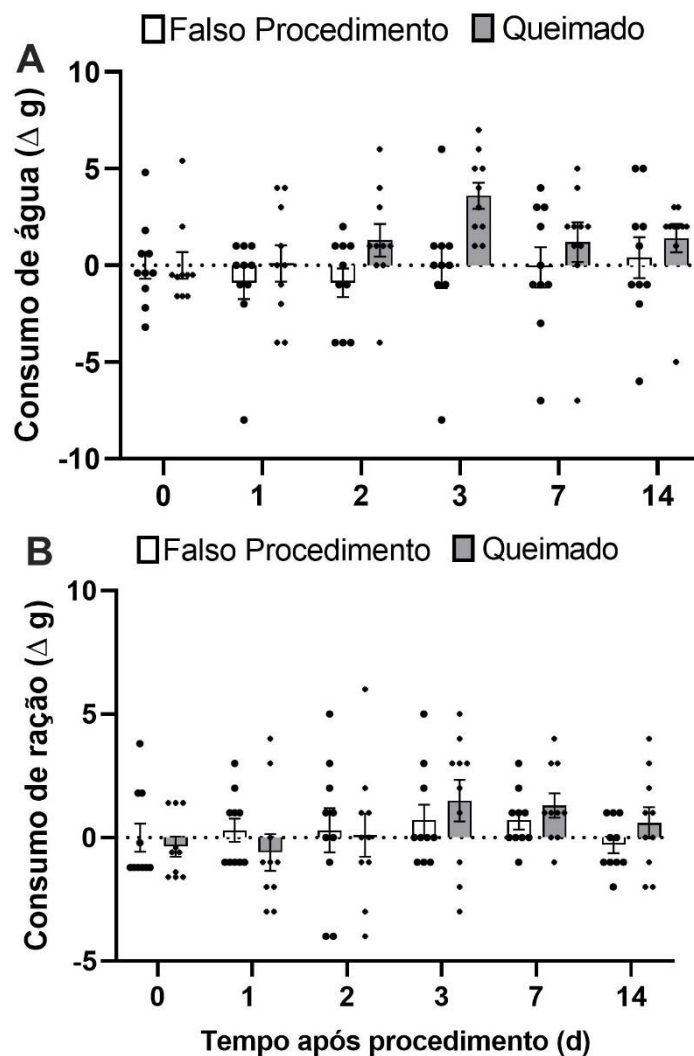


Figura 9. Decurso temporal da variação do consumo de água (A) ou ração (B) em camundongos machos e fêmeas, no Grupo com o Falso Procedimento e no Grupo Queimado. Dados expressos em média \pm S.E.M. ($n=10$ por grupo), obtidos de 4 diferentes blocos experimentais independentes.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados do procedimento anestésico, a anestesia foi satisfatória em todos os animais, permanecendo no plano anestésico cirúrgico durante todo o procedimento. A anestesia também foi de grande praticidade, visto que os tempos de indução e recuperação dos animais foram baixos, não prejudicando o experimentador em relação ao cansaço e tempo ocioso.

Além disso, segundo os gráficos do Teste de Hargreaves, a analgesia foi efetiva nas primeiras 72 horas em ambos os grupos, sendo registrada uma antinocicepção significativa, juntamente com os baixos escores da escala Grimace, inferindo-se que os animais não expressaram dor espontânea através das suas expressões faciais em todo o período experimental.

O bem-estar foi mantido, com a manutenção dos escores de nidificação ao longo dos dias e o consumo de água e de comida sendo mantidos ou aumentados, junto com a perda de no máximo 15% do peso corporal inicial, não sendo necessária a eutanásia de nenhum animal.

Em conclusão, o protocolo anestésico-analgésico aqui apresentado foi eficaz, de longa duração e seguro para aplicação em ensaios que utilizam procedimentos invasivos em camundongos.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, E. L. *et al.* Non-clinical studies in the process of new drug development - Part II: Good laboratory practice, metabolism, pharmacokinetics, safety and dose translation to clinical studies. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, n. 12, p. e5646, 2016.

ANDRADE, E. L. *et al.* Non-clinical studies required for new drug development - Part I: early in silico and in vitro studies, new target discovery and validation, proof of principles and robustness of animal studies. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, n. 11, p. e5644, 2016.

BAUMANS, V. *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. **Laboratory Animals**, v. 28, n. 2, p. 97–112, 1 abr. 1994.

BLAISE, O. *et al.* A Murine Model of a Burn Wound Reconstructed with an Allogeneic Skin Graft. **Journal of Visualized Experiments**, n. 162, p. 61339, 8 ago. 2020.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações/Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. **Resolução Normativa Nº 25, de 29 de setembro de 2015**. Procedimentos - Roedores e Lagomorfos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica. Diário Oficial da União. Brasília, 02 de outubro de 2015. Disponível em: <<https://www.gov.br/mcti/pt-br/acompanhe-o-mcti/concea/arquivos/pdf/legislacao/resolucao-normativa-no-25-de-29-de-setembro-de-2015.pdf/view>> Acesso 16 nov. 2022.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações/Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. **Resolução Normativa Nº 33, de 18 de novembro de 2016**. Procedimentos - Roedores e Lagomorfos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica. Diário Oficial da União. Brasília, 21 de novembro de 2016. Disponível em: <https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/22073702/do1-2016-11-21-resolucao-normativa-n-33-de-18-de-novembro-de-2016-22073453> Acesso 07 jul. 2022.

CANNON, C. Z. *et al.* Analgesic effects of tramadol, carprofen or multimodal analgesia in rats undergoing ventral laparotomy. **Lab Animal**, v. 40, n. 3, p. 85–93, mar. 2011.

CARBONE, L.; AUSTIN, J. Pain and Laboratory Animals: Publication Practices for Better Data Reproducibility and Better Animal Welfare. **PLOS ONE**, v. 11, n. 5, p. e0155001, 12 maio 2016.

CHEAH, M.; FAWCETT, J.; ANDREWS, M. Assessment of Thermal Pain Sensation in Rats and Mice Using the Hargreaves Test. **BIO-PROTOCOL**, v. 7, n. 16, 2017.

CHINCHILLA, P. A.; MOYANO, J. Efficacy of opioids and non-opioid analgesics in the treatment of post procedure pain of burned patients: a narrative review. **Brazilian Journal of Anesthesiology (English Edition)**, v. 72, n. 5, p. 637–647, set. 2022.

DHOLAKIA, U. *et al.* Anesthetic effects and body weight changes associated with ketamine-xylazine-lidocaine administered to CD-1 mice. **PLOS ONE**, v. 12, n. 9, p. e0184911, 14 set. 2017.

DICKINSON, A. L.; LEACH, M. C.; FLECKNELL, P. A. The analgesic effects of oral paracetamol in two strains of mice undergoing vasectomy. **Laboratory Animals**, v. 43, n. 4, p. 357–361, out. 2009.

DURST, M. S. *et al.* Lidocaine and bupivacaine as part of multimodal pain management in a C57BL/6J laparotomy mouse model. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 25 maio 2021.

EMERY, M. A. *et al.* Burn injury decreases the antinociceptive effects of opioids. **Behavioural Pharmacology**, v. 28, n. 4, p. 285–293, jun. 2017.

ERNST, L. *et al.* Semi-automated generation of pictures for the Mouse Grimace Scale: A multi-laboratory analysis (Part 2). **Laboratory Animals**, v. 54, n. 1, p. 92–98, 29 out. 2019.

EVANGELISTA-VAZ, R. *et al.* Analgesic Efficacy of Subcutaneous–Oral Dosage of Tramadol after Surgery in C57BL/6J Mice. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 57, n. 4, p. 368–375, 1 jul. 2018.

FURUMOTO, K. *et al.* Effects of Multimodal Analgesic Protocol, with Buprenorphine and Meloxicam, on Mice Well-Being: A Dose Finding Study. **Animals**, v. 11, n. 12, p. 3420, 30 nov. 2021.

GADES, N. M.; DANNEMAN, P. J.; WIXSON, S. K.; TOLLEY, E. A. The magnitude and duration of the analgesic effect of morphine, butorphanol, and buprenorphine in rats and mice. **Contemporary topics in laboratory animal science**, v. 39, n. 2, p. 8–13, mar. 2000.

GASKILL, B. N. *et al.* Nest Building as an Indicator of Health and Welfare in Laboratory Mice. **Journal of Visualized Experiments**, n. 82, p. 51012, 24 dez. 2013.

GODER, D. *et al.* In vivo study of the efficacy of bupivacaine-eluting novel soy protein wound dressings in a rat burn model. **Burns**, v. 48, n. 3, p. 623–632, maio 2022.

HE, S. *et al.* Ketamine-xylazine-acepromazine compared with isoflurane for anesthesia during liver transplantation in rodents. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS**, v. 49, n. 1, p. 45–51, jan. 2010.

HERNÁNDEZ-AVALOS, I. *et al.* Clinical evaluation of postoperative analgesia, cardiorespiratory parameters and changes in liver and renal function tests of paracetamol compared to meloxicam and carprofen in dogs undergoing ovariohysterectomy. **PLOS ONE**, v. 15, n. 2, p. e0223697, 14 fev. 2020.

Humane Endpoints in Animal Research. **Animal Resource Program**, 2022. Disponível em: <<https://www.research.psu.edu/newanimal/experimental-guidelines/defining-humane-endpoints>>. Acesso em: 28 de jul. de 2022.

HUNTER, J. E. *et al.* Using body temperature, food and water consumption as biomarkers of disease progression in mice with E μ -myc lymphoma. **British Journal of Cancer**, v. 110, n. 4, p. 928–934, fev. 2014.

JIRKOF, P. Burrowing and nest building behavior as indicators of well-being in mice. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 234, p. 139–146, ago. 2014.

JIRKOF, P. *et al.* Assessment of postsurgical distress and pain in laboratory mice by nest complexity scoring. **Laboratory Animals**, v. 47, n. 3, p. 153–161, 7 maio 2013.

JIRKOF, P. *et al.* Buprenorphine for pain relief in mice: repeated injections vs sustained-release depot formulation. **Laboratory Animals**, v. 49, n. 3, p. 177–187, 8 dez. 2014.

JIRKOF, P. Side effects of pain and analgesia in animal experimentation. **Lab Animal**, v. 46, n. 4, p. 123–128, abr. 2017.

KENDALL, L. V. *et al.* Pharmacokinetics of Sustained-Release Analgesics in Mice. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 53, n. 5, p. 478–484, set. 2014.

KIRKPATRICK, D. R. *et al.* Therapeutic Basis of Clinical Pain Modulation: Modulation of Clinical Pain. **Clinical and Translational Science**, v. 8, n. 6, p. 848–856, dez. 2015.

KUMMER, C. L.; COELHO, T. C. R. B. Antiinflamatórios não esteróides inibidores da ciclooxygenase-2 (COX-2): aspectos atuais. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 52, n. 4, jul. 2002.

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

LI, J.-X. Combining opioids and non-opioids for pain management: Current status. **Neuropharmacology**, v. 158, p. 107619, nov. 2019.

MASTRANGELO, S. *et al.* Opioid transdermal delivery system: a useful method for pain management in children. **Annals of Translational Medicine**, v. 9, n. 2, p. 185–185, jan. 2021.

MATSUMIYA, L. C. *et al.* Using the Mouse Grimace Scale to Reevaluate the Efficacy of Postoperative Analgesics in Laboratory Mice. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 51, n. 1, p. 42–49, jan. 2012.

MENDELL, L. M. Constructing and deconstructing the gate theory of pain. **Pain**, v. 155, n. 2, p. 210–216, fev. 2014.

MOTA-ROJAS, D. *et al.* The Utility of Grimace Scales for Practical Pain Assessment in Laboratory Animals. **Animals**, v. 10, n. 10, p. 1838, 9 out. 2020.

NAVARRO, K. L. *et al.* Mouse Anesthesia: The Art and Science. **ILAR Journal**, v. 62, n. 1–2, p. 238–273, 31 dez. 2021.

PEDROSO, F. E. *et al.* Inflammation, organomegaly, and muscle wasting despite hyperphagia in a mouse model of burn cachexia. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 3, n. 3, p. 199–211, set. 2012.

PERCIE DU SERT, N. *et al.* Reporting animal research: Explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0. **PLOS Biology**, v. 18, n. 7, p. e3000411, 14 jul. 2020.

PORRECA, F. Chronic pain and medullary descending facilitation. **Trends in Neurosciences**, v. 25, n. 6, p. 319–325, 1 jun. 2002.

RICHARDS, H. W. *et al.* Assessing opioid administration in pediatric burn patients with nonsurgical management. **Burns**, v. 47, n. 2, p. 322–326, mar. 2021.

RINGKAMP, M.; DOUGHERTY, P. M.; RAJA, S. N. Anatomy and Physiology of the Pain Signaling Process. Em: **Essentials of Pain Medicine**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 3-10. e1.

ROMANOWSKI, K. S. *et al.* American Burn Association Guidelines on the Management of Acute Pain in the Adult Burn Patient: A Review of the Literature, a Compilation of Expert Opinion, and Next Steps. **Journal of Burn Care & Research**, v. 41, n. 6, p. 1129–1151, 30 nov. 2020.

TALBOT, S. R. *et al.* Defining body-weight reduction as a humane endpoint: a critical appraisal. **Laboratory Animals**, v. 54, n. 1, p. 99–110, fev. 2020.

TORP K.D. *et al.* Lidocaine Toxicity. **StatPearls [Internet]**, 2022. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482479/>>. Acesso em: 28 de jul. de 2022.

VITALO, A. *et al.* Nest Making and Oxytocin Comparably Promote Wound Healing in Isolation Reared Rats. **PLoS ONE**, v. 4, n. 5, p. e5523, 13 maio 2009.